

**Karoline Silva Paulussi**

**DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL  
DE EMBRIÕES EQUINOS**

**Araçatuba**

**2014**

## **DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL DE EMBRIÕES EQUINOS**

Trabalho Científico, como parte do Trabalho de Conclusão de Curso, de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", campus de Araçatuba, para obtenção do grau de Médico Veterinário.

**Aluno:** Karoline Silva Paulussi

**Supervisor:** Prof. Dr. José Fernando Garcia

**Araçatuba**

**2014**

## **ENCAMINHAMENTO**

Encaminhamos o presente Trabalho Científico, como parte do Trabalho de Conclusão de Curso, para que o Conselho de Estádios Curriculares tome as providências cabíveis.

---

**Estagiária**

---

**Supervisor**

**Araçatuba**  
**Novembro de 2014**

À minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu pai Wagner Paulussi que sempre me incentivou a fazer o curso de Medicina Veterinária e pela paciência durante a minha ausência.

À minha mãe Cleonice Jorge Silva Paulussi e irmãos, que mesmo longe, sempre me proporcionaram todo amor e força para continuar a seguir meus sonhos.

Aos meus Padrinhos Wanderley Paulussi e Denise Speroni Paulussi e Tios Irineu Paulussi e Maria Lucia Paulussi que sempre me proporcionaram total apoio financeiro e imensa ajuda e incentivo para seguir nas minhas decisões.

Ao Diretor Executivo da Deoxi Biotecnologia e amigo, Rodrigo Vitório Alonso que tornou esse projeto realidade, com dedicada orientação, trabalho e ajuda financeira.

Ao técnico Altair Martins pela ajuda no projeto e experiência na técnica de biópsia de embriões.

Ao meu Professor Orientador José Fernando Garcia pela orientação e confiança dedicada a mim.

A minha supervisora de estágio Dra. Katrin Hinrichs e Dr. Young Ho por terem feito parte de meu sonho.

Aos Professores Carlos Antônio de Miranda Bomfim e Cássia Maria Barroso Orlandi pelo aprendizado, parceria e trabalho dispendido.

Aos Haras Prime Horse, Cria Reprodução Equina, Fazenda Betel e Central Araça - Reprodução Animal pela parceria, trabalho e confiança no projeto.

E a todos os meus colegas do Curso de Medicina Veterinária da UNESP e da Texas A&M University, os quais de certa forma, ajudaram e influenciaram na minha vida pessoal e profissional.

“O mistério da vida não é um problema para ser resolvido mas uma realidade para ser experimentada.”

Aart Van Der Leeuw

## SUMÁRIO

1	ÍNDICE DE QUADRO, FIGURA E TABELA.....	8
2	RESUMO.....	10
3	INTRODUÇÃO.....	11
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	14
4.1	COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE.....	14
4.2	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA.....	14
4.3	QUANTIFICAÇÃO.....	14
4.4	DILUIÇÃO.....	15
4.5	ENSAIOS DA PCR.....	15
4.6	AMPLIFICAÇÃO TOTAL DO GENOMA (WGA- WHOLE GENOME AMPLIFICATION).....	17
4.7	MICROMANIPULAÇÃO EMBRIONÁRIA.....	18
4.8	SEXAGEM DE EMBRIÕES EQUINOS À CAMPO.....	18
4.9	DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO E SEXAGEM FETAL.....	19
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.1	PADRONIZAÇÃO DOS TESTES DE PCR.....	19
5.2	PADRONIZAÇÃO DOS TESTES DE WGA(WGA- WHOLE GENOME AMPLIFICATION).....	24
5.3	PADRONIZAÇÃO DA MICROMANIPULAÇÃO EMBRIONÁRIA.....	24
5.4	PADRONIZAÇÃO DA SEXAGEM DE EMBRIÕES EQUINO.....	26
5.5	SEXAGEM DE EMBRIÕES EQUINOS A CAMPO.....	27
6	CONCLUSÃO.....	30
7	AGRADECIMENTOS.....	30
8	REFERÊNCIAS.....	32

## 1. ÍNDICE DE QUADRO, FIGURA E TABELA

### QUADRO

Quadro 1- Sequência da diluição seriada realizada com DNA extraído de sangue de equinos e asininos (macho e fêmea).....	15
Quadro 2-Sequência de primers para identificação do sexo de amostras de DNA de diferentes espécies.....	16
Quadro 3: Pares de primers selecionados para análise das PCRs.....	20

### FIGURA

Figura 1: Gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídeo. P = Peso Molecular (50pb); M= Produto de <i>Primer</i> Endógeno (S4B) macho; F= Produto de <i>Primer</i> Endógeno (S4B) fêmea; 1= 10ng; 2= 1ng; 3=0,1ng; 4=10pg de DNA de sangue equino.....	21
Figura 2: : Gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídeo. P = Peso Molecular (50pb); M= Produto de <i>Primer</i> Endógeno (S4B) macho; F= Produto de <i>Primer</i> Endógeno (S4B) fêmea; 1= 10ng; 2= 1ng; 3=0,1ng; 4=10pg de DNA de sangue asinino.....	22
Figura 3: : Gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídeo. P = Peso Molecular (50pb); M= Produto de <i>Primer</i> Y-específico (SRY/EQUI) macho; F= Produto de <i>Primer</i> Y-específico (SRY/EQUI) fêmea; 1= 10ng; 2= 1ng; 3=0,1ng; 4=10pg de DNA de sangue equino.....	23
Figura 4: : Gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídeo. P = Peso Molecular (50pb); M= Produto de <i>Primer</i> Y-específico (SRY/EQUI) macho; F= Produto de <i>Primer</i> Y-específico (SRY/EQUI) fêmea; 1= 10ng; 2= 1ng; 3=0,1ng; 4=10pg de DNA de sangue asinino.....	23
Figura 5: Fotos tiradas durante um dos procedimentos de biópsia embrionária. A) Mensuração do embrião; B) Perfurando a cápsula embrionária; C) Logo após a biópsia; D) 3 horas após a biópsia; E) 6 horas após a biópsia. F) 12 horas após a biópsia e mensuração do embrião.....	25



Figura 6: Gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídeo. P = Peso Molecular (50pb); X = *Primer* Endógeno (S4B); Y = *Primer* Y-específico (SRY); M = Produto de WGA com células de cavalo; F = Produto de WGA com células de égua; 1 a 4 = Produto de WGA de biópsias de embriões equinos.....26

Figura 7:Foto do gel de agarose a 2%, corado com Brometo de Etídeo, com o *Primer* Endógeno (S4B) e Y-específico (SRY). M = Produto de WGA com células de cavalo (Macho); F = Produto de WGA com células de égua (Fêmea); C- = Produto de WGA sem DNA (Controle Negativo); 1 a 12 = Produto de WGA com biópsias de embriões equinos. Embriões Fêmeas:1, 2, 5, 6, 8, 9 e 12; Embriões Machos: 3, 4, 7, 10 e 11.....27

Figura 8:Taxas de concepção de embriões equinos submetidos à biópsia de acordo com o diâmetro do embrião, Temperatura de cultivo após a biópsia e tempo de cultivo da biópsia até a transferência do embrião.....28

Figura 9: Sequência de micromanipulação e vitrificação de embrião equino.  
A) Blastocisto inicial (200µM); B) Biópsia pela técnica de microaspiração; C) Embrião pré-vitrificação; D) Embrião após reaquecimento.....29

## TABELA

Tabela 1:Taxa de concepção de embriões equinos biopsiados e não biopsiados no mesmo período, em 3 haras.....28

## 2. RESUMO

O diagnóstico genético pré-implantacional de embriões equinos já é uma realidade nos Estados Unidos e Argentina. Embora o Brasil seja líder mundial de transferência de embriões equinos, essa tecnologia ainda está em fase de desenvolvimento, com poucos grupos atuando nessa área no país. O objetivo do presente projeto foi desenvolver a metodologia de micromanipulação e identificação do sexo de embriões equinos a campo. Dessa forma, selecionamos sequências y-específicas para padronização laboratorial dos ensaios de PCR com amostras de DNA da espécie equina. Os primers que apresentaram maior sensibilidade foram selecionados para a realização da PCR em biópsias embrionárias. Além das análises de biologia molecular, foi desenvolvida a técnica de micromanipulação de embriões equinos. Foram realizadas 105 biópsias de embriões pela técnica de microaspiração, permitindo a identificação do sexo pela técnica de WGA (Whole Genome Amplification) e posteriormente PCR seguido de eletroforese. Os embriões sexados foram transferidos para receptoras sincronizadas, permitindo a avaliação da taxa de concepção dos embriões submetidos à biópsia. Além disso, um embrião foi biopsiado, vitrificado e sexado. Após a identificação do sexo (fêmea) o embrião foi desvitrificado e transferido em receptora criteriosamente selecionada, resultando em prenhez.

**Palavras-chave:** biópsia, PCR, WGA (Whole Genome Amplification), vitrificação.

### 3. INTRODUÇÃO

De acordo com levantamento realizado pelo Ministério da Agricultura, o Brasil possui o maior rebanho de equinos na América Latina e o terceiro mundial. Somados aos muares e asininos são 8 milhões de cabeças, movimentando R\$ 7,3 bilhões e responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos, somente com a produção de equídeos.

Segundo informações da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), o Brasil é líder mundial no emprego da técnica de transferência de embriões equinos. Em 2010, foram transferidos 12.422 embriões, o que equivale a cerca de 43% de todos os embriões transferidos no mundo (STROUD; BÓ, 2009).

Nos últimos anos, ocorreu um grande avanço nas biotecnologias de reprodução equina, tanto na área de coleta e transferência de embriões como na área de manipulação embrionária, criopreservação e diagnóstico genético pré-implantacional. Mortensen et al. (2009) e Kumar et al. (2008) reportaram avanços no percentual de recuperação embrionária de 63% (22/35) e 81,19% (95/117), respectivamente.

As biotecnologias da reprodução equina são limitadas pela dificuldade na indução de múltiplas ovulações. Esforços têm sido feitos nessa área a fim de aumentar o número de embriões obtidos por coleta com o uso de GnRH, extrato de pituitária equina (EPE), FSH, FSH suíno (FSH-p), FSH equino purificado (FSH-e) e a imunoneutralização da inibina (ARAUJO et al., 2009; DIPERT et al., 1992; MCCUE, 1996; SQUIRES et al., 1986; SQUIRES; SEIDEL JUNIOR, 1995).

Peippo et al. (1995) foi o primeiro autor a publicar o Diagnóstico genético pré-implantacional (PGD, do inglês: Preimplantation Genetic Diagnosis) em embriões equinos pela técnica de PCR. Anteriormente, outros autores estudavam testes de cariotipagem e o método de antígeno imunológico H-Y para a identificação do sexo de embriões. Entretanto, Peippo afirmou que, apesar de viáveis, os métodos de cariotipagem e de antígeno imunológico H-Y possuem baixa acurácia. Com isso, concluiu que o uso da biópsia embrionária seguida pela técnica da PCR pode ser a melhor alternativa para a identificação do sexo de embriões equinos.

Estudos recentes tem apresentado diversas técnicas de PGD que permitem a identificação do sexo associada com o diagnóstico de doenças genéticas ainda em

fase embrionária, ou até mesmo o teste de paternidade de embriões produzidos com pool de sêmen de dois ou mais garanhões (HINRICHS; CHOI, 2012).

Nas últimas décadas, diversos autores demonstraram a viabilidade da realização da biópsia de embriões bovinos, tanto pela técnica de microssecção quanto pela microaspiração (ALONSO et al., 2008; EL-GAYAR; HOLTZ, 2005; HASLER et al., 2002).

A tecnologia de microaspiração de embriões equinos foi apresentada por Huhtinen et al. (1997) com resultado de 21% de concepção. Choi et al. (2010) realizou a micromanipulação de embriões equinos auxiliada com o Piezo Drill, com taxas de 100% de concepção (3/3). De acordo com Hinrichs e Choi (2012), na ausência do Piezo Drill a biópsia dos embriões equinos pode ser realizada com micropipeta de 15 $\mu$ m de diâmetro.

As taxas de prenhez após realização da biópsia chegam a 83% de acordo com Choi et al. (2010), que comprovou em seu estudo que a perda da cápsula embrionária não impede a viabilidade do embrião equino, em contraste com estudos anteriores que mostram que a transferência de um embrião com perda da cápsula inviabilizaria o estabelecimento de uma prenhez (STOUT et al., 2005).

Atualmente, Herrera et al. (2014) conseguiu taxas de prenhez semelhantes as de embriões não biopsiados a campo, entre 58,6 a 63%. No Brasil, o primeiro nascimento de potro proveniente de embrião biopsiado foi descrito por Rascado et al (2014), que apresentou taxas de prenhez de 57,14%.

A primeira gestação de embrião equino vitrificado foi descrita por Hochi et al.(1994) e, atualmente, o principal avanço nessa área é a criopreservação dos blastocistos colapsados, após a biópsia do embrião. Trabalhos recentes chegaram a taxas de 46% de prenhez em embriões colapsados e vitrificados após biópsia, e observaram que o grau de colapso da blastocite afetou a taxa de prenhez. A correlação entre a diminuição da blastocite dos embriões biopsiados e as respectivas taxas de prenhez foi de 10% (0/3), 20-30% (2/5) e 70-100% (4/5) (HINRICHS; CHOI, 2012).

A criopreservação de grandes embriões equinos é problemática. Pequenos embriões com diâmetro menor que 300  $\mu$ m tem apresentado boas taxas de prenhez (45%-67%) após a criopreservação, tanto por congelamento convencional quanto por vitrificação (ELDRIDGE-PANUSKA et al., 2005; SLADE et. al., 1985). Em

contraste, taxas de prenhez após criopreservação e transferência de blastocisto expandido equino maior que 300  $\mu\text{m}$  de diâmetro são baixas (0%-38%), (BARFIELD et al., 2009; BASS et al., 2004; ELDRIDGE-PANUSKA et al., 2005; MACLELLAN et al., 2002; SLADE et al., 1985).

A produção *in vitro* de embriões equinos é realizada em poucos centros no mundo, mas ainda não se tem observado bons resultados, impedindo que o PGD seja realizado no mesmo modelo dos embriões humanos e bovinos produzidos *in vitro*.

Dessa forma, os trabalhos com PGD em embriões equinos estão sendo realizados com embriões produzidos *in vivo* e recuperados de éguas doadoras. Devido às dificuldades associadas com colheita de embriões no 6° dia, os métodos de PGD tem sido adaptados para embriões recuperados no 7° ou 8° dia, no estádiode blastocisto expandido (CHOI et al., 2010).

As hipóteses das baixas taxas de sucesso na criopreservação se devem possivelmente à presença da cápsula dificultando a penetração dos crioprotetores e pelo grande acúmulo de água na blastocele de embriões mais desenvolvidos como os blastocistos expandidos (SCOTT et al., 2012). A não penetração de crioprotetores gera a ruptura das organelas celulares, particularmente o citoesqueleto, como um resultado de formação de gelo intracelular (DOBRINSKY, 1996). Nesse sentido, a realização da biópsia embrionária minimiza os fatores que dificultam a congelação: rompe a cápsula permitindo a penetração dos crioprotetores, gera um colapso da blastocele, diminuindo o volume de líquido interno do embrião (HINRICHS; CHOI, 2012). A criopreservação de embriões biopsiados permitiriam o PGD de diferentes características, viabilizando somente a transferência dos embriões com as características genéticas desejadas. Além disso, há trabalhos mostrando que a realização da biópsia induzindo o colapso da blastocele antes da vitrificação pode aumentar a viabilidade de embriões equinos vitrificados (HINRICHS; CHOI, 2012;HIRAOKA et al., 2004; MUKAIDA et al., 2006).

Vários trabalhos demonstraram a identificação do sexo de embriões equinos pelo método de PCR. Peippo et al. (1995) utilizou *primers* usados para a sexagem de embriões de ratos, 5'-GAG CCT CTT TGG TAT CTG AGA AAG T'3 (P3-3MZ) e 5'-ATA ATC ACA TGG AGA GCC ACA AGC T-'3 (P1 -5EZ), com eficiência de 95%.

Em estudo mais recentes, o gene SRY tem sido utilizado com sequencia y-especifica (CHOI et al., 2010; CULLINGFORD et al., 2010).

Leon et al. (2012) utilizaram os genes SRY e GAPDH para a identificação do sexo fetal a partir de DNA obtido do soro de éguas prenhes.

Choi et al. (2010) e Cullingford et al.(2010) utilizaram a metodologia de “Duplex PCR” possibilitando a amplificação conjunta de uma sequencia Y-especifica com uma sequencia autossomica. Entretanto, essa metodologia pode diminuir a eficiencia da PCR, devido à competição entre os primers e diminuir a acurácia do teste.

A pequena quantidade de DNA genômico obtido na biópsia embrionária, inviabiliza a realização de uma segunda análise. Dessa forma, a solução para este problema pode ser a utilização de metodologias de amplificação total do genoma (WGA, do ingles: Wole Genome Amplification), capazes de aumentar centenas de vezes o DNA genômico obtido na biópsia embrionária (HINRICHS; CHOI, 2012), viabilizando a confirmação de resultados duvidosos e a realização de múltiplas análises genéticas a partir de uma única biópsia embrionária.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS:**

##### **4.1 COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE**

Foram coletadas amostras de sangue de um machos e uma fêmeas da espécie equina e asinina, em tubo vacuntainer com EDTA.

##### **4.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA**

Foi utilizado kit de purificação comercial (Machery-Nagel/Nucleo Spin Bood) para a extração de DNA das amostras de sangue, conforme instruções do fabricante.

##### **4.3 QUANTIFICAÇÃO**

A quantificação foi realizada através de espectrofotometria, utilizando equipamento NanoDrop 2.000.

#### 4.4 DILUIÇÃO

A concentração da amostra de DNA foi ajustada para 10ng/μl, para que fossem realizadas diluições seriadas, conforme o Quadro 1.

Quadro 1- Sequência da diluição seriada realizada com DNA extraído de sangue de equinos e asininos (macho e fêmea).

MACHO		FÊMEA	
M1	10ng	F1	10ng
M2	1ng	F2	1ng
M3	100pg	F3	100pg
M4	10pg	F4	10pg

#### 4.5 ENSAIOS DA PCR

O Quadro 2 descreve as sequências de *primersexistentes* na literatura utilizadas nas PCRs para a identificação do sexo. Os *primers*selecionados foram avaliados nas PCRs realizadas variando a concentração dos reagentes, tempos e temperaturas, de acordo com a exigência para cada par de *primers*. Para isso, foi empregado o ensaio em gradiente de temperatura de anelamento definindo-se a condição ótima para cada par de oligonucleotídeos iniciadores selecionados. A leitura e avaliação dos resultados foi realizada por eletroforese horizontal em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, sendo a visualização realizada sobre transiluminador ultra-violeta e os resultados registrados com sistema de fotografia digital. O sistema que apresentou sensibilidade satisfatória com a menor concentração de DNA foi selecionado para a realização dos testes com biópsias embrionárias.

Quadro 2- Sequência de *primers* para identificação do sexo de amostras de DNA de diferentes espécies..

REFERÊNCIA	SEQUÊNCIAS
ZF <sub>x</sub> /ZF <sub>y</sub> -(CULLINGFORD et al., 2010)	5'– ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT –'3
	5'– GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT5 –'3
SRY-1-(CULLINGFORD et al., 2010)	5'– ACAAACGGGAGGAGCGGTTA –'3
	5' – CAGGGACTCTGAAGCCACCA –'3
SRY-2-(CULLINGFORD et al., 2010)	5' – CCATTCGGGTAACGTTGGCTA –'3
	5' – CAGGGACTCTGAAGCCACCA –'3
(PEIPPO et al., 1995)	5'– GAGCCTCTTTGGTATCTGAGAAAGT –'3
	5'– ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT –'3
SRY-(CHOI et al., 2010)	5'– TGCATTCATGGTGTGGTCTC –'3
	5'– ATGGCAATTTTTTCGGCTTC –'3
GLIPR1-(CHOI et al., 2010)	5'– GCCTGGATGGTTTCTTTAGTC – '3
	5'– GATCGGAACTTGTTGTGCAT –'3
RBMV-(CHOI et al., 2010)	5'– TTCGGCCTTCTCTTTCACAT –'3
	5' – TGGAAGCAGTCGCTATGATG –'3
S4B (Kageyama et al, 2004)	5' – CAAGTGCTGCAGAGGATGTGGAG – 3'
	5'– GAGTGAGATTTCTGGATCATATGGCTACT– 3'
SRY (Peura et al., 1991; Griffiths and Tiware, 1993)	5'– CTCAGCAAAGCACACCAGAC – 3'
	5' – GAACTTTCAAGCAGCTGAGGC– 3'



BRY- 4A (Peuraet al., 1991; Griffiths and Tiware, 1993)	5'– CTCAGCAAAGCACACCAGAC– 3'
	5'– GAACTTTCAAGCAGCTGAGGC– 3'
SRY/EQUI (LEON et al., 2012)	5' –CGCCAGCATAGATCACAGAA– 3'
	5' – CGCAAGGTAGCTGAAAGACC – 3'

#### **4.6 AMPLIFICAÇÃO TOTAL DO GENOMA (WGA-WHOLE GENOME AMPLIFICATION)**

O Diagnóstico Genético Pré-implantacional (PGD, do inglês “Preimplantation Genetic Diagnosis”) compreende um conjunto de biotécnicas utilizadas para determinar características genéticas de células retiradas de embriões na fase anterior à implantação uterina. Entretanto, a pequena quantidade de gDNA obtida através do procedimento de biópsia embrionária é um fator que limita a aplicação de testes moleculares complexos. Recentemente, diferentes técnicas de Amplificação Total do Genoma (do inglês: Whole Genome Amplification – WGA) têm sido propostas com a finalidade específica de aumentar a quantidade de gDNA em amostras com pequenas quantidades de DNA.

No presente projeto, foi utilizada a metodologia de Amplificação por Deslocamento Múltiplo (do inglês, Multiple Displacement Amplification - MDA) com o Repli-g Mini Kit (Qiagen), com o objetivo de aumentar a quantidade de gDNA inicial da amostra, possibilitando a identificação do sexo de embriões equinos utilizando os *primers* selecionados SRY/Equi como Y-específico e o S4B como controle endógeno.

#### **4.7 MICROMANIPULAÇÃO EMBRIONÁRIA**

Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração com diferentes profissionais que atuam na área de coleta e transferência de embriões equinos, e por empresa especializada no diagnóstico genético pré-implantacional de embriões bovinos.

A biópsia dos embriões foi realizada conforme a técnica desenvolvida pelo Médico Veterinário Rodrigo Alonso (Deoxi Biotecnologia Ltda), pela microaspiração de células viáveis de embriões, utilizando dois micromanipuladores e dois microinjetores (Narishige) acoplados a microscópio invertido (Olympus, modelo IX51-III). Os embriões inicialmente foram mensurados por uma régua acoplada a lente do microscópio invertido. Cada biópsia foi devidamente identificada de acordo com o estágio do embrião (mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido) e com a quantidade de material aspirado. As micropipetas utilizadas na micromanipulação embrionária (Holding Plus - Vitrocell e Biópsia) foram fornecidas pela Deoxi Biotecnologia. Os embriões biopsiados foram mantidos em meio de manutenção, até que o resultado da PCR tenha sido obtido. Os embriões viáveis foram transferidos para receptoras equinas.

#### **4.8 SEXAGEM DE EMBRIÕES EQUINOS A CAMPO**

Os procedimentos relacionados com a coleta e transferência dos embriões foram realizados em colaboração com 3 haras (I, II e III), conforme a metodologia utilizada por cada um dos especialistas de cada Haras.

Os embriões foram classificados de acordo com seu estágio e medidos com uma régua acoplada ao microscópio invertido, logo após os embriões biopsiados foram mantidos em cultivo em meio Holding Plus (Vibrocell), a temperatura ambiente ou a 37°C, durante 3 a 24 horas, permitindo a avaliação da re-expansão da blastocelule antes da TE. Foram atribuídas notas de 1 a 5, sendo 1 para embriões totalmente colabados e 5 para os re-expandidos. Os embriões foram transferidos em receptoras sincronizadas (D3 a D7).

## **4.9 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO E SEXAGEM FETAL**

A taxa de concepção dos embriões biopsiados foi avaliada pelo diagnóstico de gestação por ultrassonografia com 16, 30 e 60 dias de gestação, a acurácia do diagnóstico pré-implantacional do sexo embrionário foi avaliada através da sexagem fetal.

### **4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A taxa de prenhez de embriões biopsiados e não biopsiados foram análises pelo Teste Exato de Fisher.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 PADRONIZAÇÃO DOS TESTES DE PCR**

Inicialmente, foram testados três pares de *primers* Y-específicos descritos por diferentes autores para a realização da sexagem de embriões bovinos (S4B, SRY e BRY- 4A). Os ensaios de PCR foram realizados conforme a descrição dos autores, respeitando as temperaturas de anelamento específicas de cada *primer*. Os resultados foram visualizados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, sendo a visualização realizada sobre transiluminador ultra-violeta e os resultados registrados com sistema de fotografia digital.

Quadro 3: Pares de *primers* selecionados para analisadas PCRs.

REFERÊNCIA	SEQUÊNCIAS
<b>S4B</b> (Kageyama et al, 2004)	5' –CAAGTGCTGCAGAGGATGTGGAG– 3'
	5'– GAGTGAGATTTCTGGATCATATGGCTACT– 3'
<b>SRY</b> (Peura et al., 1991; Griffiths and Tiware, 1993)	5' – CTCAGCAAAGCACACCAGAC 3'
	5'– GAACTTTCAAGCAGCTGAGGC – 3'
<b>BRY- 4A</b> (Peuraet al., 1991; Griffiths and Tiware, 1993)	5'– CTCAGCAAAGCACACCAGAC– 3'
	5'– GAACTTTCAAGCAGCTGAGGC– 3'
<b>SRY/EQUI</b> (LEON et all, 2012)	5'– CGCCAGCATAGATCACAGAA– 3'
	5'– CGCAAGGTAGCTGAAAGACC– 3'

Foram avaliadas a sensibilidade e a especificidade de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores mencionados no Quadro 3, utilizando 2µL do gDNA diluído em série conforme descrito no Quadro 1. Dessa forma, as reações foram realizadas utilizando gDNA de macho e fêmea, tanto para equinos quanto para asininos, variando de 10ng a 10pg de DNA total.

Os resultados dos *primers* SRY e BRY – 4A não foram satisfatórios com gDNA equino e asinino, pois não foi possível a visualização de banda nas amostras

de macho e fêmea em nenhuma das concentrações de DNA utilizadas.

Conforme descrito por Kageyama et al. (2004), o *primer* S4B é uma excelente opção para realização da sexagem de embriões bovinos, pois apresenta grande sensibilidade, apresentando duas bandas em amostras de DNA bovino de machos e uma única banda nas amostras de fêmea. Nossos resultados com o S4B demonstraram que apesar de apresentar excelentes resultados com DNA de bovinos, não é possível fazer a identificação de machos e fêmeas em equinos e asininos, pois apresenta o mesmo padrão de amplificação para ambos os sexos. Entretanto, a sensibilidade dos ensaios de PCR foi semelhante à descrita pelos autores com DNA bovino, com amplificação satisfatória mesmo nas amostras com 10pg de gDNA, comprovando que o S4B pode ser utilizado como controle endógeno nas reações de PCR para identificação do sexo dessas espécies.

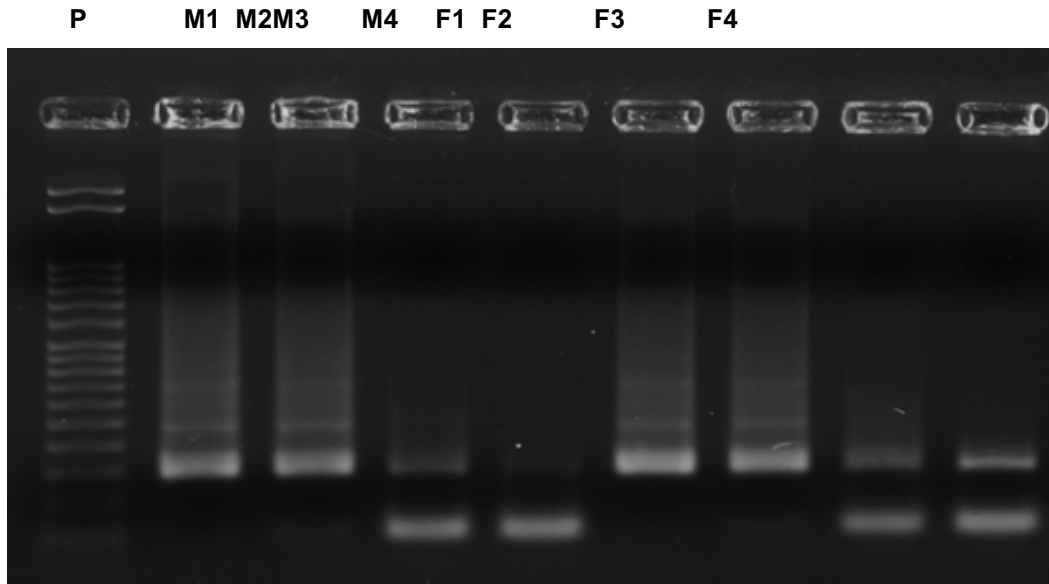


Figura 1: Gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídeo. P = Peso Molecular (50pb); M= Produto de *Primer* Endógeno (S4B) macho; F= Produto de *Primer* Endógeno (S4B) fêmea; 1= 10ng; 2= 1ng; 3=0,1ng; 4=10pg de DNA de sangue equino.

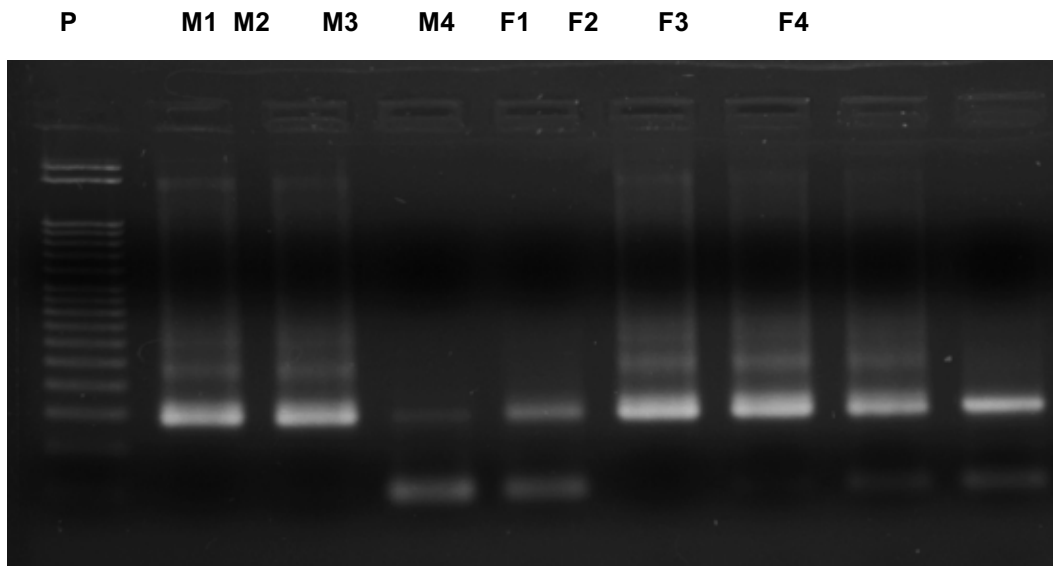


Figura 2: Gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídeo. P = Peso Molecular (50pb); M= Produto de *Primer* Endógeno (S4B) macho; F= Produto de *Primer* Endógeno (S4B) fêmea; 1= 10ng; 2= 1ng; 3=0,1ng; 4=10pg de DNA de sangue asinino.

Devido aos resultados insatisfatórios encontrados com os *primers* Y-específicos testados inicialmente, um novo set de *primers* foi sintetizado de acordo com o trabalho descrito por LEON et al. (2012). Dessa forma, novos ensaios de PCR foram realizados com o *primer* SRY/Equi conforme descrito pelos autores, utilizando concentrações decrescentes de gDNA para as espécies equina e asinina. A Figura 3 e 4 mostram o resultado da PCR em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

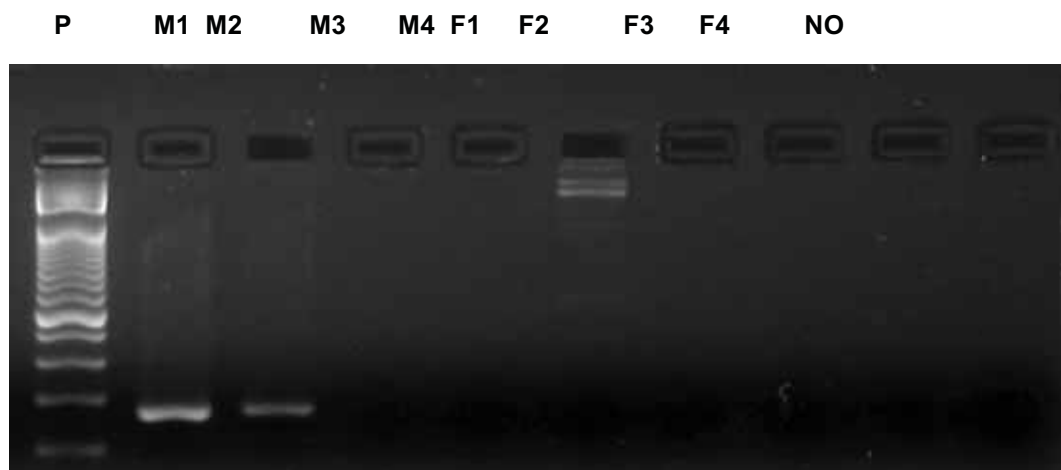


Figura 3: : Gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídeo. P = Peso Molecular (50pb); M= Produto de *Primer* Y-específico (SRY/EQUI) macho; F= Produto de *Primer* Y-específico (SRY/EQUI) fêmea; 1= 10ng; 2= 1ng; 3=0,1ng; 4=10pg de DNA de sangue equino.

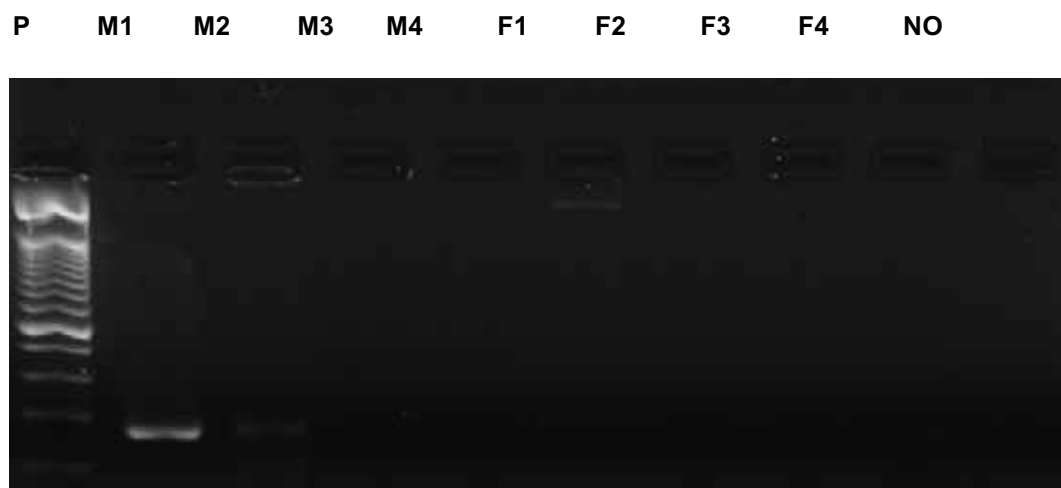


Figura 4: : Gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídeo. P = Peso Molecular (50pb); M= Produto de *Primer* Y-específico (SRY/EQUI) macho; F= Produto de *Primer* Y-específico (SRY/EQUI) fêmea; 1= 10ng; 2= 1ng; 3=0,1ng; 4=10pg de DNA de sangue asinino.

O resultado com o *primer* SRY/Equi demonstrou boa especificidade possibilitando a diferenciação entre amostras de machos e fêmeas, pois apresentou banda somente nas amostras de macho. Entretanto, o resultado não foi satisfatório com baixas concentrações de DNA (<100pg), mostrando que esse *primer* não é sensível o suficiente para identificação do sexo de embriões equinos a partir da biópsia de 10 a 20 células embrionárias.

## **5.2 PADRONIZAÇÃO DOS TESTES DE WGA (WHOLE GENOME AMPLIFICATION)**

Para padronização da técnica de WGA foram utilizadas células fibroblásticas de macho e fêmea da espécie equina, obtidas por cultivo celular *in vitro*, cedidas pela empresa In Vitro Brasil Clonagem Animal SA. Foram obtidas alíquotas de aproximadamente 10 fibroblastos de cada sexo, simulando a quantidade de células obtidas na biópsia embrionária. Essas amostras foram submetidas ao protocolo Repli-g Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Após o passo de pré-amplificação, uma alíquota de 5µL do produto do WGA foi utilizada para realização da PCR com os *primers* SRY/Equi e S4B, em tubos separados. Os resultados dos dois *primers* foram satisfatórios tanto nos controles positivos com gDNA de macho/fêmea como para as amostras de WGA, sendo que as amostras de macho apresentaram bandas para ambos os *primers* e as amostras de fêmea somente para o S4B.

## **5.3 PADRONIZAÇÃO DA MICROMANIPULAÇÃO EMBRIONÁRIA**

A Padronização da micromanipulação embrionária foi realizada com 4 embriões equinos desvitrificados, cedidos pelo Médico Veterinário Gustavo Henrique Marques Araujo, e 2 embriões provenientes de coletas de embrião à fresco, realizadas pela Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi.

Todos os embriões foram submetidos à micromanipulação embrionária pela técnica de microaspiração de acordo com a Figura 5, utilizando dois micromanipuladores mecânicos 1 “holding” e 1 para biópsia acopladas à dois microinjetores e microscópio invertido. Cada embrião foi submetido a uma série de biópsias consecutivas para a formação de um banco de biópsias de diferentes tamanhos (nº de células) do mesmo embrião. As biópsias foram transferidas para tubos de 0,2mL e congeladas a -20°C.



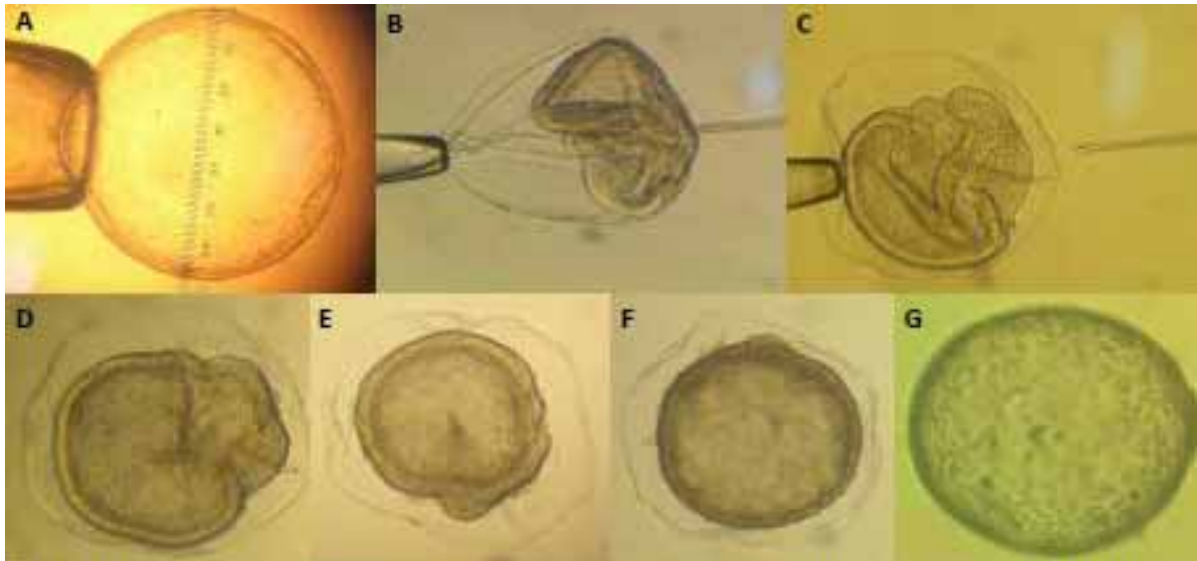


Figura 5: Sequência de micromanipulação embrionária de blastocisto expandido coletado D7 (680µm). A) Fixação do embrião com a Holding; B) Perfuração da cápsula e realização da biópsia por microaspiração de ~20 células; C) Embrião logo após a biópsia; D) 3 horas após a biópsia; E) 6 horas após a biópsia; G) 24 horas após a biópsia.

A micromanipulação dos embriões foi adaptada após o início da sexagem de embriões equinos a campo, devido a dificuldade de fixação de embriões maiores com apenas uma “holding”, devido a esse problema a técnica foi padronizada com 2 micropipetas “holding” e 1 para biópsia acopladas à 3 micromanipuladores mecânicos e microscópio invertido, na micropipeta de biópsia foi adicionada uma ponta denominada Spike.

Não foi necessário o uso de Piezo Drill ou laser para padronização da técnica de micromanipulação. Como descrito por Hinrichs e Choi (2012), na ausência do Piezo Drill a biópsia dos embriões equinos pode ser realizada com micropipeta de 15µm de diâmetro.

#### 5.4 PADRONIZAÇÃO DA SEXAGEM DE EMBRIÃO EQUINO

Após a formação do banco de biópsias, foram selecionadas biópsias de aproximadamente 20 células de cada embrião para realização do WGA e PCR com os *primers* SRY/Equi e S4B, em tubos separados. A Figura 6 apresenta o resultado da identificação do sexo dos 4 embriões desvitrificados, assim como os controles de macho/fêmea obtidos com o WGA de células fibrobásticas de cavalo e égua.

MX MY FX FY 1X 1Y 2X 2Y 3X 3Y 4X 4Y NO

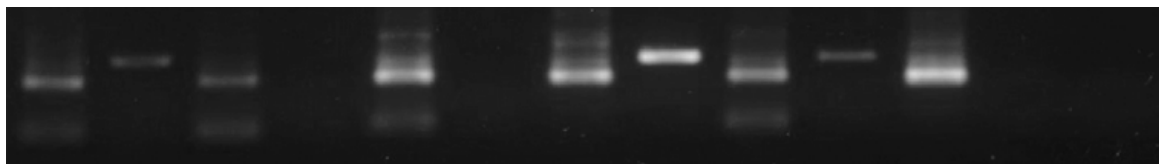


Figura 6: Gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídeo. X = Primer Endógeno (S4B); Y = Primer Y-específico (SRY); M = Produto de WGA com células de cavalo; F = Produto de WGA com células de égua; 1 a 4 = Produto de WGA de biópsias de embriões equinos. Embriões 1 e 4 = Fêmeas; Embriões 2 e 3 = Machos.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 6, foi possível identificar o sexo de embriões equinos com biópsia embrionária de aproximadamente 20 células, utilizando a metodologia de WGA seguida pela técnica de PCR. A utilização de um *primer* endógeno (S4B) é importante para assegurar a qualidade da pré-amplificação e da PCR, pois apresenta amplificação do mesmo fragmento em todas as amostras, independente do sexo (MX, FX, 1X, 2X, 3X e 4X); enquanto que o *primer* Y-específico (SRY/Equi) apresenta banda somente nas amostras do sexo masculino (MY, 2Y e 3Y). O controle negativo (NO) não apresentou nenhuma banda, mostrando que não houve contaminação da PCR. Dessa forma, é possível afirmar que os embriões 1 e 4 são fêmeas e os embriões 2 e 3 são machos.

## 5.5 SEXAGEM DE EMBRIÃO EQUINO A CAMPO

Essa etapa do projeto teve o objetivo de avaliar a aplicação da sexagem de embriões equinos a campo, em colaboração com 3 haras (I, II e III) localizados no estado de SP, de set/2013 a mar/2014, nas raças Quarto de Milha e Mangalarga.

As éguas foram induzidas com o uso de hormônios para a ovulação, acompanhadas e inseminadas artificialmente, posteriormente foram coletados embriões de diferentes dias de vida (D7, D8, D9) para avaliar a viabilidade pós biópsia em diferentes estádios embrionários, simulando uma coleta em dias tradicionais à campo. Os embriões biopsiados foram submetidos a biópsia com a aspiração de poucas células (10 à 20), sendo estas células submetidas ao teste de WGA – Amplificação do DNA e testes de PCR, com os *primers* selecionados, identificando assim o sexo dos embriões como ilustrado na Figura 7.

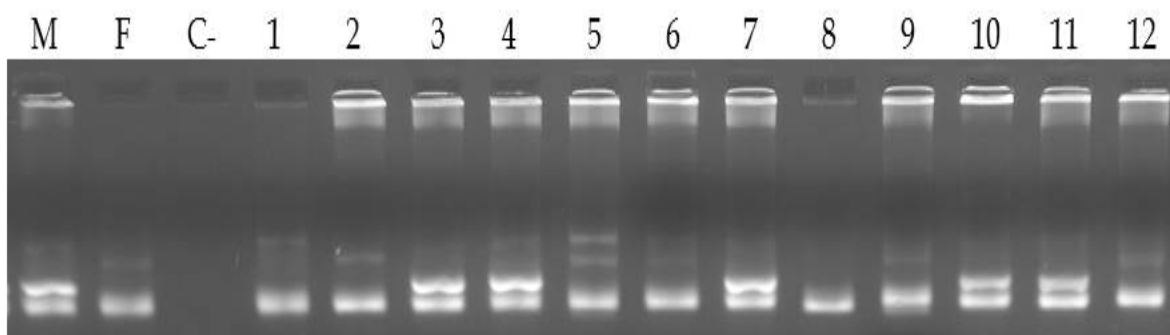


Figura 7: Foto do gel de agarose a 2%, corado com Brometo de Etídeo, com o *primer* Endógeno (S4B) e Y-específico (SRY). M = Produto de WGA com células de cavalo (Macho); F = Produto de WGA com células de égua (Fêmea); C- = Produto de WGA sem DNA (Controle Negativo); 1 a 12 = Produto de WGA com biópsias de embriões equinos. Embriões Fêmeas: 1, 2, 5, 6, 8, 9 e 12; Embriões Machos: 3, 4, 7, 10 e 11.

Foram sexados 105 embriões, dos quais 104 (99,05%) tiveram o sexo determinado: 60 fêmeas (57,14%), 44 machos (41,91%) e 1 indefinido (0,95%).

A taxa de mortalidade embrionária na biópsia foi de 3,8% (4/105). A alta sensibilidade na técnica de sexagem é devido ao sucesso da técnica WGA – Amplificação do DNA possibilitando a identificação de 99,05% das amostras de biópsias mesmo com pouquíssima quantidade de células 10-20.

A taxa de mortalidade embrionária na biópsia foi de 3,8% (4/105). Dessa forma foram transferidos 101 embriões sexados, que resultaram em 34 prenhez com 16 dias (33,7%), seguidas pela reabsorção de 8 embriões (23,5%), confirmando-se 26 prenhez com mais de 60 dias (25,7%).

Foi realizada comparação das taxas de prenhez entre embriões biopsiados (B) e embriões não biopsiados (NB), no mesmo período, em cada haras: I: B-28,3%/NB-61,5%; II: B-27,6%/NB-16,7%; III: B-19,2%/NB-42,1%, com a somatória de 25,7% (26/101) versus 40,9% (36/88) para biopsiados e não biopsiados, respectivamente, revelando diferença significativa pelo Teste Exato de Fisher ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1: Taxa de concepção de embriões equinos biopsiados e não biopsiados no mesmo período, em 3 diferentes haras no ano de 2013-2014.

TRATAMENTO	HARAS I			HARAS II			HARAS III			TOTAL		
	TE	P	%	TE	P	%	TE	P	%	TE	P	%
BIOPSIADOS	46	13	28.3	29	8	27.6	26	5	19.2	101	26	25,7 <sup>a</sup>
NÃO BIOPSIADOS	26	16	61.5	24	4	16.7	38	16	42.1	88	36	40,9 <sup>b</sup>

TE = Embriões Transferidos      P = Prenhez >60 dias      % = Taxa de Concepção  
 Letras diferentes representam diferença significativa pelo Teste Exato de Fisher ( $P < 0,05$ )

Até o momento, foi realizada a sexagem fetal por ultrassonografia de 7 receptoras, com 100% de concordância com o diagnóstico obtido por PCR. Demonstrando taxa de acurácia da técnica de sexagem de 100%.

Foi realizada avaliação da taxa de prenhez de acordo com o tamanho do embrião no momento da biópsia: <300µM (35,0%); 300-500µM (28,6%); 500-1.000µM (31,03%); 1.000-1.500µM (16,0%); >1.500µM (0,0%)(Figura 8).

As taxas de prenhez dos embriões cultivados em temperatura ambiente ou a 37°C foram de 32,65% (16/49) e de 18,37% (9/49), respectivamente. As taxas de prenhez de acordo com o tempo de cultivo embrionário após a biópsia foram de: 27,59% (3-6h); 17,39% (6-12h); 25,0% (12-18h) e 37,5% (>18h) (Figura 8) .

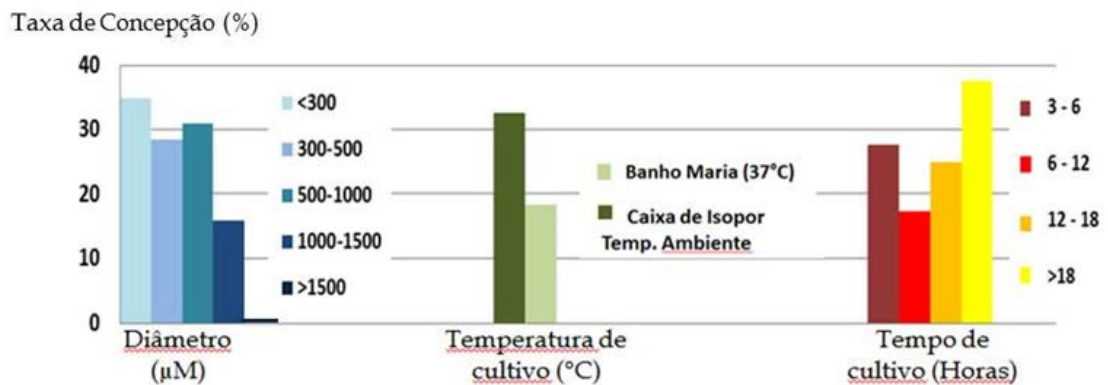


Figura 8: Taxas de concepção de embriões equinos submetidos à biópsia de acordo com o diâmetro do embrião, Temperatura de cultivo após a biópsia e tempo de cultivo da biópsia até a transferência do embrião.

A avaliação da re-expansão da blastocela nos permitiu observar a formação de pontos de herniação na cápsula embrionária em 6 embriões biopsiados (5,9%), sendo que nenhum desses resultou em prenhez, assim como nos embriões com notas 1 e 2 para a re-expansão. Para os embriões notas 3, 4 e 5, as taxas foram de 23,08% (3/13), 26,67% (4/15) e 26,47% (18/68), respectivamente.

Durante esse experimento, um embrião foi biopsiado, vitrificado e sexado como mostra na Figura 9. Após a identificação do sexo (fêmea) o embrião foi desvitrificado e transferido em receptora criteriosamente selecionada, resultando em prenhez.

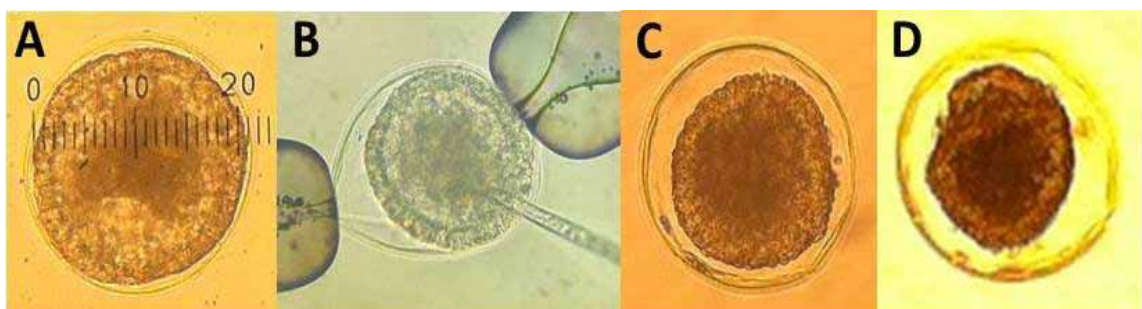


Figura 9: Sequência de micromanipulação e vitrificação de embrião equino. A) Blastocisto inicial (200μM); B) Biópsia pela técnica de microaspiração; C) Embrião pré-vitrificação; D) Embrião após reaquecimento.

Esse resultado foi explicado por Hinrichs e Choi (2012) em seu estudo em que mostrou que a realização da biópsia embrionária minimiza os fatores que dificultam a congelação: rompe a cápsula permitindo a penetração dos crioprotetores devido ao colapso da blastocela, diminuindo o volume de líquido interno do embrião, permitindo assim o sucesso dessa técnica.

## **6. CONCLUSÃO**

Esses resultados nos permitem afirmar que a tecnologia de sexagem de embriões equinos pode ser aplicada a campo, embora alguns ajustes precisem ser realizados para aumentar as taxas de prenhez. Além disso, a capacitação de profissionais para realização da biópsia embrionária é de fundamental importância para viabilizar e a aplicação dessa tecnologia, em larga escala, no país. Devido a essa necessidade, a Aluna de Iniciação Científica Karoline Silva Paulussi irá realizar seu estágio curricular com a Professora Katrin Hinrichs na Texas A&M University, no laboratório aonde essa técnica é desenvolvida e reconhecida mundialmente.

## **7. AGRADECIMENTOS**

Os resultados obtidos foram provenientes da grande interação técnica e científica estabelecida entre os diferentes grupos de pesquisa e empresas privadas colaboradoras, o que proporcionou a formação de uma equipe altamente estruturada visando o bom desenvolvimento do projeto.

- Rodrigo Vitorio Alonso – Deoxi Biotecnologia Ltda – Araçatuba/SP.
- Cássia Maria Barroso Orlandi (Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP) Campus Diadema, Diadema –SP.
- Gustavo Henrique Marques Araujo (Universidade Camilo Castelo Branco) – Campus Desacalvado.
- Heitor Mendonça e Victor Hugo Mendonça (Central Araçá – Reprodução Animal) Araçatuba/SP.

- Prof. Dr. Carlos Antônio de Miranda Bonfim (Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP).
- Daniele Campos Araújo da Costa (Fazenda Betel) – Ibitinga/SP.
- Kadu Gevartosky do Amaral (Haras PRIME HORSE) – Araçatuba/SP.
- Milena da Silva Machado (CRIA – Reprodução Equina) – Pratânia/SP.

## 8. REFERÊNCIAS

- SCOTT, B. R.; CARWELL, D. B.; HILL, R. A.; BONDIOLI, K. R.; GODKE, R. A.; GENTRY, G. T. Evaluation of Capsule Permeability in the Equine Blastocyst. **Journal of Equine Veterinary Science** p.1-4. 2012. Disponível em: <[http://ac.els-cdn.com/S0737080612001402/1-s2.0-S0737080612001402-main.pdf?\\_tid=d9913460-fc07-11e1-bb70-00000aacb35e&acdnat=1347364824\\_774ad2d785d3db09db4ef0c9fd0d5859](http://ac.els-cdn.com/S0737080612001402/1-s2.0-S0737080612001402-main.pdf?_tid=d9913460-fc07-11e1-bb70-00000aacb35e&acdnat=1347364824_774ad2d785d3db09db4ef0c9fd0d5859)>.
- Acesso em: 11 set. 2013.
- SLADE, N. P.; TAKEDA, T.; SQUIRES, E. L.; ELSDEN, R. P.; SEIDEL, G. E. JR. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos (abstract). **Theriogenology**. v.24, n.1, p.45-58. 1985.
- SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E. Collection and transfer of equine embryos. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin** 8. Colorado State University, Fort Collins, CO, v.179, n.10, pp.24-26, 1995.
- SQUIRES, E.L.; GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J.; VOSS, J.L.; SEIDEL JR., G.E. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulation hormone for superovulating mares. **Theriogenology**, v.26, n.5, p.661-670, 1986.
- SQUIRES, E.L.; SEIDEL JUNIOR., G.E. Superovulation. In: **Collection and transfer of equine embryos**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. p.32-38. 1995.
- STOUT, T. A.; MEADOWS, S.; ALLEN, W. R. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. **Animal Reproduction Science**. v.87, n.3-4, p.269-281. 2005.
- STROUD, B; BÓ, GA. The year 2009 worldwide statistics of embryo transfer in domestic animals summary of the International Embryo Transfer (IETS) Data Retrieval Committee Report. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.39, Suppl 1, p. 139-146, 2011.
- ALONSO, R. V.; HELLU, J. A. A.; PERRI, S. H. V.; VISINTIN, J. A.; GARCIA, J. F.258 Factors affecting commercial sexing program and multiple genetic analysis perspectives of in vitro-produced bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, n.1, p.227-227. 2008.



ARAUJO, G. H. M.; ROCHA FILHO, A. N.; LOPES, E. P.; MOYA, C. F.; ALVARENGA, M. A. Use of a low dose to equine purified FSH to induce multiple ovulations in mares. **Reproduction Domestic Animal**, v.44, n.3, p.380-383. 2009.

BARFIELD J. P.; MCCUE, P. M.; SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E. JR. Effect of dehydration prior to cryopreservation of large embryos. **Cryobiology**, v.59, n.1, p.36-41. 2009.

BASS, L. D.; DENNISTON, D. J.; MACLELLAN L. J.; MCCUE, P. M.; SEIDEL, G. E. JR.; SQUIRES, E. L. Methanol as a cryoprotectant for equine embryos. **Theriogenology**, v.62, n.6, p.1153-1159. 2004.

CHOI, H.Y.; 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, n. 6, p. 893-902, 2010.

CULLINGFORD, E. L. **Preimplantation genetic diagnosis of equine embryos**. 2010. 57f. Tese (Mestrado) - Colorado State University Fort Collins, Colorado, 2010.

DIPERT, K. D.; HOFFERER, S.; PALMER, E.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L. Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH analogue. **Theriogenology**, v.38, n. 4, p.695-710, 1992.

DOBRINSKY J. R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v.45, n.1, p. 17-26. 1996.

ELDRIDGE-PANUSKA, W. D; CARACCILO DI BRIENZA, V; SEIDEL JUNIOR, G. E.; SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. **Theriogenology**, v.63, n.5, p.1308-1319. 2005.

EL-GAYAR, M.; HOLTZ, W. Transfer of sexed caprine blastocysts freshly collected or derived from cultured morulae. **Small Ruminant Research**, v.57, n.2, p.151-156. 2005.

HASLER, J. F.; CARDEY, E.; STOKES, J. E.; BREDBACKA, P. Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. **Theriogenology**, v.58, n.8, p.1457-1469. 2002.

HERRERA, C.; MORIKAWA, M.I.; BELLO, M. B.; VON MEYEREN, M.; EUSEBIO, J. C.; 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.

HINRICHS, K.; CHOI, Y.H. Equine Embryo biopsy, genetic testing, and cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.32, n.7, p.390-396. 2012.

HIRAOKA, K.; KINUTANI, M.; KINUTTANI, K. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. **Human Reproduction**, v.19, n.12, 2884-2888. 2004.

HOCHI, S.; FUJIMOTO, T.; BRAUN, J.; OGURI, N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. **Theriogenology**, v.42, n.3, p.483-488, 1994.

HUHTINEN, M.; PEIPPO, J.; BREDBACKA, P. Successful transfer of biopsied equine embryos. **Theriogenology**, v.48, n.3, p.361-367. 1997.

KAGEYAMA, S.; YOSHIDA, I.; KAWAKURA, K.; CHIKUNI, K. A novel repeated sequence located on the bovine Y chromosome: Its application to rapid and precise embryo sexing by PCR. **Theriogenology**, v.5, n. 65, p. 509-14, 2004.

KUMAR, D.; JHAMB, D.; KUMAR, N.; BADIAL, D. Foals born through fresh embryo transfer in India. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, 10., 2008, Moscow, Russia. **Proceedings...** Equine fertility Research Center. *Equine Breeding Stud*, 2008. p.567-568.

LEON, P. M. M.; CAMPOS, V. F.; DELLAGOSTIN, O. A.; DESCHAMPS, J. C.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T. Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA). **Theriogenology**, v.77, n.3, p.694-698. 2012.

MACLELLAN L. J.; CARNEVALE, E. M.; COUTINHO DA SILVA, M. A.; MCCUE P. M.; SEIDEL JUNIOR G. E.; SQUIRES, E. L. Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin-B and/or trypsin (abstract). **Theriogenology**, v.58, n.2, p.717-720. 2002.

McCue, P.M. Superovulation. **Veterinary Clinics North America Equine Practice**, v.12, n.1, p.1-11, 1996.

MINISTERIO DA AGRICULTURA. **Equideos**. 2009. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos](http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos)> Acesso em: 14ago. 2013 .

MORTENSEN, C. J.; CHOI, Y. H.; HINRICHS, K.; ING, N. H.; KRAEMER, D. C.; VOGELSANG, S. G.; VOGELSANG, M. M. Embryo recovery from exercised mares. **Animal Reproduction Science**, v.110, n.3-4, p.237-244. 2009.

MUKAIDA T.; OKA, C.; GOTO T.; TAKAHASHI, K. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. **Human Reproduction**, v.21, n.12, p.3246-3252. 2006.

PEIPPO, J.; HUHTINEN, M.; KOTILAINEN, T. Sex diagnosis of equine pre implantation embryos using the polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v.44, n.5, p.619-627. 1995.

PEURA, T.; HYTTINEN, J. M.; TURUNEN, M.; JANNE, J. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos the polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v. 35, n. 3, p. 547-55, 1991.

RASCADO, T. D. S.; MENDES, D.; CARMO, M. T. D.; ALVARENGA, M. L. E.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C.; FILHO, P. A. H.; S ucesso após transferência de embriões equinos submetidos à biópsiaembrionária visando determinação do sexo. In: XV CONFERÊNCIA ANNUAL ABRAVEQ, 181, 2014. Campos do Jordão. Resumo de Reprodução equina.

[equideos](#). Acesso em : 14 de maio de 2014.