

**POLYANA GALVÃO BERNARDES COELHO**

**ACOMPANHAMENTO FOLICULAR, ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA DE  
COLETA DE EMBRIÕES E AVALIAÇÕES MORFOLÓGICA E  
MORFOMÉTRICA DE EMBRIÕES DE JUMENTAS DA RAÇA PÊGA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Medicina Veterinária, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

POLYANA GALVÃO BERNARDES COELHO


**ACOMPANHAMENTO FOLICULAR, ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA DE  
COLETA DE EMBRIÕES E AVALIAÇÕES MORFOLÓGICA E  
MORFOMÉTRICA DE EMBRIÕES DE JUMENTAS DA RAÇA PÉGA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

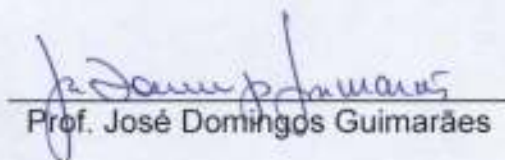
APROVADA: 11 de maio de 2010.



Prof. Eduardo Paulino da Costa  
(Co-orientador)



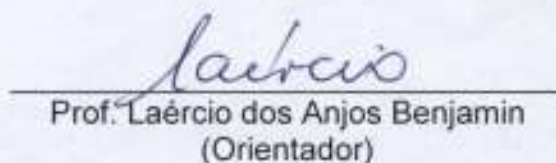
Prof. Cláudio César Fonseca  
(Co-orientador)



Prof. José Domingos Guimarães



Dr. Orlando Marcelo Vendramini



Prof. Laércio dos Anjos Benjamin  
(Orientador)

Dedico esta dissertação a  
meu pai Maurício e minha mãe Joanna,  
pelo amor, apoio e compreensão que  
tiveram comigo durante este período.

O jumento é nosso irmão

É verdade, meu senhor  
Essa estória do sertão  
Padre Vieira falou  
Que o jumento é nosso  
irmão

A vida desse animal  
Padre Vieira escreveu  
Mas na pia batismal  
Ninguém sabe o nome seu  
Bagre, Bó, Rodó ou Jegue  
Baba, Ureche ou Oropêu  
Andaluz ou Marca-hora  
Breguedé ou Azulão  
Alicate de Embau  
Inspetor de Quarteirão  
Tudo isso, minha gente  
É o jumento, nosso irmão

Até pr'anunciar a hora  
Seu relincho tem valor  
Sertanejo fica alerta  
O dandão nunca falhou  
Levanta com hora e vamo  
O jumento já rinchou  
Bom, bom, bom

Ele tem tantas virtudes  
Ninguém pode carcular  
Conduzindo um ceguinho  
Porta em porta a mendigar  
O pobre vé, no jubaio  
Um irmão pra lhe ajudar  
Bom, bom, bom

E na fuga para o Egito  
Quando o julgo anunciou  
O jegue foi o transporte  
Que levou nosso Senhor  
Vosmicê fique sabendo  
Que o jumento tem valor

Agora, meu patriota  
Em nome do meu sertão  
Acompanhe o seu vigário  
Nessa terna gratidão  
Receba nossa homenagem  
Ao jumento, nosso irmão

Luiz Gonzaga e José Clementino

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter-me dado a oportunidade de estar terminando mais essa fase de minha vida e, ao mesmo tempo, estar começando uma nova fase na qual terei o prazer de ser mãe. Matheus, mamãe está te esperando!!!

A meus pais, por todo amor, carinho, confiança, amizade. E a você mãe, agradeço também pelas ajudinhas que me deu com as jumentinhas durante a fase prática do experimento.

A meus irmãos, Guilherme e Bruna, pelo amor e carinho que sempre tiveram comigo, mesmo de longe. E uma frase que meu irmão me disse um dia: “Confia no seu taco que você é capaz”, e que até hoje me ajuda a querer continuar crescendo porque sei que toda a minha família acredita no meu potencial.

Ao Ricardo, por ter-me dado o maior presente da minha vida (Matheus) e o seu apoio nas horas que mais precisei.

Ao Laércio, por ter aceitado o desafio que propus ao pedir que me orientasse, já que trabalho em uma área completamente diferente da dele. E nem por isso ele deixou de me apoiar, ajudar, discutir sobre todos os aspectos da dissertação. Juntos, aprendemos muito! Muito obrigada! Foi um grande prazer ter sido sua orientada.

Ao Professor Eduardo Paulino da Costa, pela atenção, ajuda e paciência comigo durante todo o período do mestrado.

Aos amigos da Pós-Graduação: Sanely, Káterin, Júlio César, Marcelo, Paulo, Lucas, Bruno, Lincoln, Gian, André, Charles, Pedro, Guilherme.

Aos amigos e estagiários: Thiago, Ludmila e Eveline, que foram essenciais para a execução deste trabalho, já que sozinhos não somos ninguém.

Ao Prof. Giovanni, do DZO/UFV, por permitir que o experimento fosse realizado no Setor de Equideocultura/DZO/UFV.

Aos funcionários do setor de Equideocultura, principalmente Fernando e João Paulo, pela ajuda durante a fase prática do experimento.

Como não podia faltar, quero agradecer ao Delegado, Baixinha, Chatinha e Pequeninha, porque sem eles o experimento não teria sido realizado.

À FAPEMIG, pela bolsa de estudo.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
2.1. Anatomia do trato reprodutivo .....	4
2.2. Características reprodutivas .....	5
2.2.1. Ciclo estral .....	5
2.2.2. Puberdade .....	6
2.2.3. Estação de monta .....	7
2.2.4. Comportamento durante o estro .....	7
2.2.5. Cobertura .....	7
2.2.6. Duração da gestação .....	8
2.2.7. Estro pós-parto .....	9
2.3. Foliculogênese e ovulação .....	9
2.4. Fertilização .....	11
2.5. Transporte do embrião através da tuba uterina .....	11
2.6. Embriogênese .....	12
2.7. Formação da cápsula .....	15
2.8. Reconhecimento materno da gestação .....	17
2.9. Técnica de coleta de embriões .....	18
2.10. Avaliação embrionária .....	19
2.11. Avaliação ultrassonográfica da cérvix, útero e ovários .....	20
2.12. Crioprotetores .....	22
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	24
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
4.1. Local de realização do experimento .....	25
4.2. Animais .....	25
4.3. Coleta dos embriões .....	26
4.4. Avaliação e mensuração dos embriões .....	27
4.5. Adição e remoção do crioprotetor .....	28
4.6. Análise estrutural e ultra-estrutural dos embriões .....	29
4.6.1. Fixação primária .....	29
4.6.2. Fixação secundária .....	29
4.6.3. Inclusão .....	30
4.6.4. Microtomia .....	30
4.7. Análises estatísticas .....	31
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
5.1. Comportamento durante o estro .....	32
5.2. Acompanhamento folicular .....	32

5.3. Coleta, avaliação e mensuração dos embriões do grupo controle e grupo tratado .....	36
5.4. Análise estrutural e ultra-estrutural dos embriões .....	44
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>49</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>59</b>



## RESUMO

COELHO, Polyana Galvão Bernardes, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Maio de 2010. **Acompanhamento folicular, adaptação da técnica de coleta de embriões e avaliações morfológica e morfométrica de embriões de jumentas da raça Pêga.** Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-orientadores: Eduardo Paulino da Costa e Cláudio César Fonseca.

Os jumentos foram utilizados para diferentes funções até o momento da introdução de motores (carros, caminhões, entre outros), momento no qual deixaram de ser usados. Com os anos, algumas raças conseguiram se recuperar, como a Pêga, que é de preferência de criadores brasileiros por gerar híbridos fortes e de andamento marchado. Assim, com o propósito de criar uma linha de pesquisa em embriologia de asininos, o objetivo deste trabalho foi adaptar a técnica não-cirúrgica de coleta de embriões para jumentas da raça Pêga, acompanhar o crescimento folicular durante o estro até a ovulação, avaliar o estágio embrionário, morfologia e diâmetro dos embriões coletados oito dias após a ovulação. O acompanhamento da dinâmica folicular mostrou que a média para o diâmetro do folículo pré-ovulatório foi de  $37,4 \pm 4$ mm. Houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diâmetros nos seis dias que antecederam a ovulação. A técnica de coleta não-cirúrgica mostrou-se eficaz e, no total de 35 lavados uterinos, foram obtidos 21 embriões (duas mórulas, oito blastocistos e onze blastocistos expandidos), dos quais 19 embriões foram classificados como grau I e dois como grau II. O diâmetro médio para os embriões a fresco foi de  $316,7 \pm 81,7$   $\mu$ m, menor que aquele obtido para égua. O tratamento com glicerol causou redução média de 18,3% do diâmetro, a fixação em glutaraldeído causou redução média de 41,3% do diâmetro para o grupo controle e de 25,3% diâmetro do embrião após passagem pelo glicerol para o grupo tratado. Após lavagem em tampão fosfato houve um aumento médio de 33,9% para os dois grupos estudados. A análise estatística para a variação do diâmetro mostrou não haver diferença ( $p < 0,05$ ) entre o diâmetro inicial e os diâmetros obtidos durante as etapas de processamento. Nas microscopias de luz e eletrônica de transmissão não se observou a preservação da estrutura do embrião devido a penetração inadequada da resina no interior do mesmo. A microscopia eletrônica mostrou que a espessura da cápsula influenciou a taxa

de penetração dos meios, concluindo que as técnicas de preparo dos embriões de jumentas da raça Pêga para microscopia devem ser melhores estudadas.

## ABSTRACT

COELHO, Polyana Galvão Bernardes, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, May, 2010. **Follicular monitoring, adaptation technique of embryo collection and assessments of morphological and morphometric embryos in jennies Pêga.** Advisor: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-advisors: Eduardo Paulino da Costa and Cláudio César Fonseca.

The donkeys were used for different functions until the introduction of motors, while they had declined. Through the years, they had managed to recover some breeds, like the Pega, which is preferably by Brazilian breeders to produce interbreed strong and gait. Thus, in order to create a research line in jenny's embryology, the objective was to adapt non-surgical embryo collection technique in Pêga breed, study the follicular dynamics, morphology and diameter of jenny's embryos harvested eight days after ovulation. The study of follicular dynamics showed that the average diameter of the preovulatory follicle was  $37.4 \pm 4$  mm. Significant differences ( $P > 0.05$ ) were observed between diameters in the six days leading up to ovulation. The non-surgical technique proved effective and, a total of 35 uterine flushings were obtained from 21 embryos (two morula, eight blastocysts and eleven expanded blastocysts), of which 19 embryos were classified as grade I and two as grade II. The average diameter for the fresh embryos was  $316.7 \pm 81.7$   $\mu$ m. Treatment with glycerol caused an average reduction of 18.3% of the diameter, fixation in glutaraldehyde caused a mean reduction of 41.3% of the diameter for the control group and 25.3% of the diameter of the embryo after passage through the glycerol for the treatment group. After washing in phosphate buffer there was an average increase of 33.9% for the two groups. Statistical analysis for the variation in diameter showed no difference ( $P > 0.05$ ) between the initial diameter and diameter obtained during the processing steps. In light (LM) and transmission electron (TEM) microscopy was not observed to preserve the structure of the embryo due to inadequate penetration of the resin inside it. Electron microscopy showed that thickness of the capsule influence the rate of penetration of the resin, concluding that the preparation techniques of jenny's embryos handle for TEM should be better studied.

## 1. Introdução

O antecessor do jumento foi o *Equus africanus*, e os primeiros jumentos encontrados estavam no Egito antigo. Com isso, arqueólogos concluíram que eles foram domesticados a partir do jumento selvagem Nubiano (*Equus africanus africanus*) por aldeões da porção egípcia do Vale do Nilo. Estudos recentes a partir de DNA mitocondrial de jumentos modernos sugerem que não uma, mas duas subespécies de jumentos selvagens africanos foram domesticadas – o jumento selvagem Nubiano e o jumento selvagem da Somália (ROSSEL *et al.*, 2008).

Os jumentos formam o quarto grupo de animais de produção a serem domesticados, sendo os três primeiros grupos aqueles formados por ovelhas, cabras e vacas há mais de 7000 anos (MORAES, 2008).

A finalidade da domesticação do jumento foi para o transporte de objetos pesados (ROSSEL *et al.*, 2008) e pessoas, facilitando a movimentação dos povos à procura de novos pastos para seus rebanhos. Além de animais de cargas, eles eram usados também como animais produtores de leite, carne e pele (MORAES, 2008). Além disso, a domesticação também permitiu a redistribuição em grande escala de alimentos no estado egípcio emergente e a expansão do comércio por terra na África e na Ásia ocidental (ROSSEL *et al.*, 2008).

No ano de 1800 a.C., o centro de criação e comércio de jumentos localizava-se na Mesopotâmia. A cidade de Damasco tornou-se o centro de atração de muitas caravanas, o que propiciou o crescimento do comércio de jumentos e o desenvolvimento de novas raças de asininos (MORAES, 2008).

Os jumentos chegavam a Alexandria carregando seda e, cruzando a Ásia Menor, chegaram à Grécia, onde se comprovou que eram animais ideais para trabalhar nos vinhedos (SVENDSEN *et al.*, 1989). Na mitologia grega os jumentos estão associados aos deuses Dionysus e Syrian, que são os deuses do vinho, e os gregos aproveitaram para levar vinho e jumentos para suas colônias na Europa, ao longo do mar Mediterrâneo (MORAES, 2008).

Os primeiros asininos que chegaram às Américas foram quatro machos e duas fêmeas trazidos por Cristóvão Colombo em sua segunda viagem, e o

segundo país americano a receber os jumentos foram Cuba, e de lá foram levados para o México (MORAES, 2008).

Nos séculos XVIII e XIX, no estado de Minas Gerais, a produção de muares era necessária na indústria da mineração para vencer grandes distâncias rumo à corte, manter a convivência entre as populações do campo e da cidade, suprir as necessidades básicas das famílias e para transporte de produção das fazendas para os pontos de consumo. Para isso se necessitou de uma criação de asininos para a produção de muares (COSTA, 2007).

A princípio acreditava-se que estes asininos eram preferencialmente de procedência ibérica, mas estudos feitos pelos criadores mineiros levam a hipótese de que o tronco étnico é o jumento Nubiano ou Egípcio, *Equus asinus africanus africanus* (COSTA, 2007).

O Padre Manuel Maria Torquato de Almeida, na Fazenda Curtume, no município de Entre Rios, Minas Gerais, iniciou uma criação de jumentos onde realizou uma alta mestiçagem entre as raças italiana e egípcia e uma posterior seleção dos melhores animais que resultou na criação de uma raça de grande importância para a pecuária nacional, a raça Pêga (COSTA, 2007).

No Brasil, a diminuição do efetivo da população dos jumentos começou com a introdução dos motores usados em carros, caminhonetes, caminhões e trens, além do abate indiscriminado e dos acidentes que esses animais são vítimas nas estradas que cortam o país, principalmente nos estados nordestinos, onde se encontra o maior rebanho nacional de jumentos (NEGREIROS, 2008).

Mas os jumentos conseguiram sobreviver com a ajuda do turismo rural, onde são usados como montaria e puxadores de charretes (MORAES, 2008), além de serem usados como animais de guarda de pequenos ruminantes (ovelhas, cabras e lhamas), animais de companhia (pessoas, potros, etc.), treinamento e trabalho (PUGH, 2002).

Sob condições adequadas, as jumentas são capazes de ter uma vida reprodutiva de aproximadamente 16 anos e uma vida de trabalho sem excesso de 30 anos. Tradicionalmente, os jumentos são tão usados para trabalhos pesados como as jumentas, fazendo com que a expectativa de vida seja de 11 anos (FIELDING, 1988).

Hoje em dia, a raça de jumentos Pêga, originária do Brasil, é de preferência dos criadores brasileiros por gerar híbridos fortes e de andamento marchado, raro atributo zootécnico. Por isso, essa raça vem conquistando um grande número de aficionados (ANDRADE, 1999).

Ao contrário do que vem acontecendo com a raça Pêga, tem-se o exemplo do jumento francês da raça Baudet du Poitou que em 1994 tinha menos de 200 exemplares puro sangue no mundo (RAVENEAU, 1994) e, de modo semelhante, os exemplares selvagens, Onagro e Kiang (ENCICLOPÉDIA VIVA, 2006) são raros e estão em risco de extinção.

Baseando em aspectos de preservação das diferentes raças de asininos que estão em extinção e auxiliar no crescimento e na disseminação da raça Pêga, pretende-se contribuir para a criação de uma linha de pesquisa na área de embriologia asinina no intuito de se conhecer os estádios de desenvolvimento e o grau morfológico dos embriões na raça Pêga, e acompanhar o comportamento e os possíveis danos causados no embrião pela adição do crioprotetor glicerol, e se a cápsula influencia nas várias etapas do processo de criopreservação.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1. Anatomia dos órgãos genitais femininos**

A anatomia dos órgãos reprodutivos femininos sofre influência da idade, condição física e história reprodutiva prévia (DYCE *et al.*, 1996).

Os ovários possuem um formato reniforme (KAINER, 1993), encontram-se envoltos por um espesso mesovário e situam dorsalmente no abdômen (DYCE *et al.*, 1996). O ovário esquerdo é mais caudal que o direito e se encontra mais próximo ao rim ipsilateral (KAINER, 1993).

A borda dorsal do ovário é convexa e está ligada ao mesovário, enquanto a borda ventral é côncava e possui fossa de ovulação, local onde ocorre a ruptura dos folículos maduros (KAINER, 1993).

A estruturação histológica do ovário mostra que o mesmo é composto por uma zona de tecido conjuntivo ricamente vascularizado ao redor da zona parenquimatosa central onde se encontram folículos em desenvolvimento, folículos em atresia, corpo lúteo e corpo albicans (KAINER, 1993; DYCE *et al.*, 1996).

Tanto as jumentas quanto as éguas possuem um útero do tipo bicornio, com um corpo bem desenvolvido e dois cornos divergentes são encontrados nas. Os cornos se encontram dentro da cavidade abdominal e divergem para cada lado ficando suspensos na parede dorsal do abdômen pelos ligamentos largos. O corpo é mais curto que os cornos, situando-se parte dentro da pelve e parte dentro do abdômen (DYCE *et al.*, 1996), e tem um formato quase cilíndrico, ligeiramente aplainado dorso-ventralmente comunicando-se caudalmente com a vagina por intermédio da cérvix (GUINTARD *et al.*, 1996).

A estrutura anatômica da cérvix da jumenta se diferencia da cérvix da égua por ser mais longa, flexível e de menor diâmetro. Nas jumentas Baudet du Poitou, o óstio uterino externo se posiciona no plano sagital mediano devido à presença de pregas da mucosa muito desenvolvidas, dorsal e ventralmente, as quais delimitam o deslocamento lateral da cérvix que se projeta caudalmente dentro da vagina, e que quando em estro distendem-se (GUINTARD *et al.*, 1996; VENDRAMINI *et al.*, 1998). As modificações associadas a idade estão

associadas ao comprimento da cérvix e ao coeficiente de dilatação-alongamento (GUINTARD *et al.*, 1996).

A cérvix na égua é curta e com sua porção caudal projetando para dentro do lúmen da vagina (DYCE *et al.*, 1996). Suas paredes são espessas e apresentam mucosa brancacenta fortemente dobrada longitudinalmente, delimitando um estreito canal, o canal cervical (GUINTARD *et al.*, 1996). A porção caudal tem aparência lobada devido a extensão das pregas mucosas que revestem o canal cervical e é circundada por um espaço anular de profundidade mais ou menos uniforme, o fórnix (DYCE *et al.*, 1996).

## *2.2. Características reprodutivas*

Fielding (1988) fez um estudo sobre as características reprodutivas das jumentas, onde avaliou a duração do ciclo estral, do estro e do momento da ovulação, a idade em que alcança a puberdade, estação de monta, cobertura, comportamento durante o estro, duração da gestação e estro pós-parto.

### *2.2.1. Ciclo estral*

O ciclo estral de jumentas apresentou uma considerável variação na sua duração, sendo a duração média de 24 dias (Tabela 1). A duração média do estro foi de 6,3 dias (Tabela 2), com a ovulação ocorrendo normalmente nos últimos dois dias de estro (Tabela 3) (FIELDING, 1988; PUGH, 2002).

Estros anovulatórios podem ser encontrados em qualquer período do ano; porém, são mais freqüentes durante os estros longos, no final do inverno e no início de primavera, momento em que as jumentas passam do anestro para o período de atividade sexual. (VENDRAMINI, 1997).

Folículos pré-ovulatórios podem começar a produzir progesterona antes que ocorra a ovulação, e esta luteinização pode ocorrer devido à incapacidade ou capacidade insuficiente de responder a ação das gonadotropinas, por deficiência hipotalâmica, ou disgenesia ovariana (VENDRAMINI, 1997).



**Tabela 1: Duração do ciclo estral em jumentas.**

Duração em dias	País de origem	Fonte
25,9	Brasil	Henry et al. (1987)
23-25	Grã Bretanha	Allen (pers. comm.)
19-24	*	Epstein (1984)
22	Grã Bretanha	UFAW (1971)
22,826	Japão	Nishikawa & Yamasaki (1949a)
21-24	USA	Means (1941)
22	Antiga União Soviética	Svecin (1939)
21-28	USA	Berliner et al., (1938)

Fonte: Adaptado de Fielding (1988) (\* País não identificado)

**Tabela 2: Duração do estro em jumentas.**

Duração em dias	País de origem	Fonte
7,9	Brasil	Henry et al. (1987)
6	USA	Oviedo (1986)
6-9	Grã Bretanha	Allen (1985)
6,4	USA	Vandeplassche et al., (1981)
6,017	Japão	Nishikawa & Yamasaki (1949a)
4-7	Antiga União Soviética	Svecin (1939)
2-7	USA	Berliner et al. (1938)

Fonte: Adaptado de Fielding (1988)

**Tabela 3: Momento da ovulação em jumentas.**

Número de dias	País de origem	Fonte
5,6 dias após início do estro	USA	Vandeplassche et al. (1981)
6,6 dias após início do estro	Japão	Nishikawa & Yamasaki (1949)
48 horas antes do fim do estro	USA	Berliner <i>et al.</i> (1938)

Fonte: Adaptado de Fielding (1988)

### 2.2.2. Puberdade

A puberdade é o resultado da interação de fatores que incluem nutrição, genética, fotoperíodo, temperatura e ausência de doenças. Quando todos os fatores são favoráveis, a puberdade pode chegar mais cedo (HAFEZ & HAFEZ, 2004a).

Sendo assim, as jumentas alcançam a puberdade com um a dois anos de idade (FIELDING, 1998; PUGH, 2002), e começam a manifestar o instinto sexual aos 18 meses de idade que continua por 20 a 30 anos (VENDRAMINI,

1997). Os dados coletados por Fielding (1988) em seu estudo estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Idade à puberdade

Idade	País de Origem	Fonte
A partir de 2 anos	Grã Bretanha	Allen (pers. comm.)
18 meses	Grã Bretanha	UFAW (1971)
A partir de 1 ano	*	Asdell (1964)

Fonte: Adaptado de Fielding (1988) (\* País não identificado)

### 2.2.3. Estação de monta

As jumentas são poliéstricas sazonais em regiões temperadas; porém, são mais ativas sexualmente entre os trópicos e capazes de ciclar durante todo o ano no equador (FIELDING, 1988), mostrando que as jumentas são menos sazonais que as éguas (PUGH, 2002). No Brasil, Henry *et al.* (1987) descreveram que a estação de monta das jumentas dura  $197,8 \pm 63,4$  dias.

### 2.2.4. Comportamento durante o estro

Vandeplassche *et al.* (1981) indicaram que os principais sinais de estro nas jumentas são mastigação (abertura e fechamento da boca), eversão do clitóris, micção freqüente e levantamento da cauda. Henry *et al.* (1987) dizem que além dos sinais anteriores, outro sinal importante é o de orelhas tocarem o pescoço. Borwick (1970) sugeriu que o estro não é normalmente evidenciado até que o jumento esteja presente mascando, salivando e zurrando.

Henry *et al.* (1987) dizem que para uma jumenta ser considerada em estro tem que apresentar dois ou mais dos sinais anteriormente citados. A associação da mastigação e orelhas tocando o pescoço são os sinais mais evidentes de estro.

### 2.2.5. Cobertura

O momento ideal para a primeira cobertura depende do manejo prévio da jumenta, particularmente do manejo alimentar. Nos estudos realizados por

Fielding (1988), a idade recomendada é de aproximadamente três anos (Tabela 5).

Fielding (1988) em seu estudo relatou várias recomendações de cobertura, como: cobrir a jumenta no segundo e no quarto dia de estro, continuando desta forma se o estro persistir; cobrir a jumenta no primeiro, terceiro e quinto dia do estro; repetir a cobertura após duas horas a cada cobertura. Em resumo, Fielding (1988) sugere que os padrões de cobertura bem sucedidos são no terço final do estro.

**Tabela 5: Idade da primeira cobertura**

Idade	País de Origem	Fonte
4 anos	Ireland	Lewis (1976)
3 anos	Grã Bretanha	UFAW (1971)
2½ - 3 anos	USA	Means (1941)

Fonte: Adaptado de Fielding (1988)

#### 2.2.6. Duração da gestação

A duração média da gestação em jumentas é de 374 (373,8) dias (FIELDING, 1988; PUGH, 2002), sendo assim mais longa que a gestação em éguas cuja duração é de 336 dias (Tabela 6). Para os cruzamentos jumento x égua, a duração é de 355 dias, e para o cruzamento garanhão x jumenta é de 350 dias (FIELDING, 1988).

**Tabela 6: Duração da gestação em jumentas**

Duração (dias e meses)	País de Origem	Fonte
372 dias	USA	Oviedo (1986)
12 - 12½ meses	USA	Hutchins (1986)
374 dias	Grã Bretanha	Eaton-Evans (1986)
374 dias	*	West (1982)
380 dias	*	Ellendorff et al. (1979)
±13 meses	Irlanda	Lewis (1976)
365 dias	Grã Bretanha	UFAW (1971)
365 dias	Grã Bretanha	Cole & Cupps (1969)
367 dias	USA	Means (1941)

Fonte: Adaptado de Fielding (1988) (\* País não identificado)

### 2.2.7. Estro pós-parto

Nos estudos realizados por Fielding (1988), o estro pós-parto ocorre em média de cinco a onze dias após o parto (Tabela 7). Borwick (1970) associou a ocorrência de diarreias em potros com aproximadamente 10 dias com o retorno ao estro da jumenta lactante.

Tabela 7: Estro pós-parto em jumentas

Dias pós-parto	País de Origem	Fonte
5-13 dias	USA	Oviedo (1986)
9-11 dias	USA	UFAW (1971)
17-18 dias	Grã Bretanha	Svecin (1939)
2-8 dias	USA	Means (1941)

Fonte: Adaptado de Fielding (1988)

### 2.3. Folliculogênese e ovulação

O desenvolvimento dos ovócitos e folículos em mamíferos começa durante a vida fetal (FAIR, 2003). Assim, folículos primordiais, primários e secundários são observados nos ovários durante a vida fetal (RUSSE, 1983).

Inicialmente, o ovócito é revestido por uma camada de 4-8 células foliculares e uma lâmina basal intacta. Esta primeira categoria de folículo é chamada de folículo primordial. Os folículos primordiais contêm ovócitos primários que permanecem em repouso até o momento em que são estimulados a crescerem (FAIR, 2003). A ativação dos folículos primordiais é caracterizada por transformação nas células foliculares de revestimento que passam do formato achatado para o cúbico, e por sua proliferação (FAIR *et al.*, 1997).

O segundo estágio começa com o desenvolvimento de uma segunda camada de células foliculares (DRIANCOURT, 1991; FORTUNE, 2003) e pela deposição inicial de material da zona pelúcida ao redor do ovócito. Ao mesmo tempo, ocorre a formação dos grânulos corticais dentro do citoplasma do ovócito (FAIR *et al.*, 1997). Este estágio parece se tornar responsivo às

gonadotrofinas, além de expressar mRNA para receptores de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) (FAIR, 2003).

A transição para o folículo terciário é caracterizada pela contínua proliferação e diferenciação das células que revestem o ovócito em células das tecas interna e externa e células do *cumulus oophorus* assim como a formação de uma cavidade antral preenchida por fluido folicular (DRIANCOURT, 1991).

O ciclo estral é caracterizado por ondas de crescimento que são divididas em onda anovulatória e onda ovulatória. A onda anovulatória é caracterizada por folículos grandes que não atingem o diâmetro de um folículo dominante e a onda ovulatória por folículos dominantes e subordinados (GINTHER *et al.*, 2003) e que culmina em uma ovulação. Cada onda de crescimento folicular é precedida por um incremento da concentração sangüínea de FSH; sendo assim, os folículos sensíveis ao FSH respondem ao aumento da concentração de FSH formando um pool de folículos em crescimento (FAIR, 2003).

A onda ovulatória recruta vários folículos (em éguas, de 7 a 11 folículos com 6mm de diâmetro), e estes folículos permanecerão em uma fase de crescimento comum por seis dias, estendendo esta fase até o início da fase do desvio. O desvio é uma fase onde ocorre uma seleção que se caracteriza por uma mudança na taxa de crescimento do folículo dominante em comparação aos folículos subordinados. Um folículo é considerado dominante ao atingir 30mm, e a ocorrência de dois folículos dominantes durante a onda de crescimento folicular nas éguas pode ser considerado como um defeito no mecanismo de desvio (GINTHER *et al.*, 2003).

Quando o tamanho do folículo dominante aproxima do seu máximo, começam a ocorrer mudanças ultra-estruturais dentro do ovócito. Essas mudanças são aumento no conteúdo de lipídio, decréscimo do tamanho do complexo de Golgi e localização mais superficial dos grânulos corticais. Durante o desenvolvimento pré-ovulatório e maturação final do folículo dominante, o tamanho do complexo de Golgi é ainda mais reduzido, a membrana nuclear torna-se irregular, e o nucléolo apresenta vacuolização. Estas mudanças ocorrem antes do pico de LH e são chamadas de pré-maturação ou capacitação (FAIR, 2003).

Durante o processo ovulatório os folículos passam por mudanças, como maturação citoplasmática e nuclear do ovócito, separação das células do *cumulus oophorus* do restante das células da granulosa, e afinamento e ruptura da parede folicular externa (HAFEZ & HAFEZ, 2004b).

Em jumentas, os folículos são divididos quanto ao diâmetro em grandes ( $\geq 25$  mm), médios (entre 20–24mm) e pequenos ( $\leq 20$ mm), e os mesmos sofrem efeitos significativos conforme o dia do ciclo. Sete dias antes da ovulação, o diâmetro dos maiores folículos e o número de folículos grandes crescem significativamente alcançando o diâmetro máximo um dia antes da ovulação. Os folículos médios alcançam o número máximo quatro dias antes da ovulação e os folículos pequenos diminuem significativamente antes da ovulação (VANDEPLASSCHE *et al.*, 1981).

A ovulação é definida pela ausência do maior folículo ( $\geq 25$ mm) que havia sido detectado no dia anterior. Após a ovulação, o número de folículos grandes e médios permanece baixo pelos próximos 12 dias, acontecendo o contrário com os folículos pequenos (VANDEPLASSCHE *et al.*, 1981).

#### 2.4. Fertilização

Logo após a ovulação observa-se ao redor do ovócito da égua uma camada gelatinosa (HAMILTON & DAY, 1945; VAN NIEKERK & GERNEKE, 1966) que se mantém nos ovócitos e tende a desaparecer após a fecundação. Van Niekerk & Gerneke (1966) consideraram que a cobertura gelatinosa teria origem folicular, mas seria depositada pelas células do *cumulus oophorus* após a ovulação.

O encontro do ovócito com o espermatozóide ocorre na junção da ampola com o istmo, na tuba uterina. O processo de clivagem dos embriões mamíferos é mais lento quando comparado com a maioria dos vertebrados. Após 24 horas da fecundação, a primeira clivagem ainda não está completa, e cada clivagem subsequente requer 12 horas (BEZARD *et al.*, 1989).

#### 2.5. Transporte do embrião na tuba uterina

Em éguas, os ovócitos não fertilizados são transportados somente até a junção da ampola-istmo, onde são mantidos nas pregas de mucosa e degenerados em alguns meses (FLOOD *et al.*, 1979).

Muitos embriões de mamíferos entram no útero de 24 a 86 horas após a ovulação, em estágio de desenvolvimento de 4 a 16 células. Os embriões suínos entram no útero em estágio de 4 células, embriões de vacas em estágio de 8 a 16 células, embriões de ovelhas em estádios de 8 células, e os embriões eqüinos, diferentemente das outras espécies, em estádios entre final de mórula e estágio de blastocisto inicial (FREEMAN, 1992). O transporte através da tuba uterina não está relacionado com o aumento do diâmetro do embrião, porque os embriões não aumentam de tamanho antes do transporte (FREEMAN *et al.*, 1991).

Os embriões são capazes de produzir pequenas quantidades de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) e  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) a partir do ácido araquidônico. O principal produto secretor dos embriões em estádios iniciais foi a  $PGE_2$ , e esse hormônio não é secretado antes do período de transporte através da tuba uterina (Dias 3 e 4). A sua secreção se inicia imediatamente antes e durante o transporte do embrião pela tuba uterina do embrião no dia 5 e, chegando ao útero com 6 dias, sua secreção aumenta (WEBER *et al.*, 1991).

Aproximadamente no quinto dia pós-ovulação, o embrião alcança o estágio de mórula compacta e começa a produzir prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ). Este hormônio embrionário atua localmente na tuba uterina provocando um relaxamento da camada circular do músculo liso da parede tubárica, fazendo com que o embrião alcance o útero 24 horas depois do início da produção da  $PGE_2$  (ALLEN, 2001).

A coleta de embriões de seis dias pós-ovulação nem sempre é possível. Com isso, a transferência e biotecnologias como congelamento e bipartição tornam-se difíceis. A diferença entre os tempos que os embriões levam para chegar ao útero provavelmente seja um mecanismo de adaptação para que o embrião atinja o útero no momento em que o mesmo se encontra hormonalmente preparado para recebê-lo (ALLEN, 2001).

## 2.6. Embriogênese

O processo de clivagem do zigoto eqüino tem como característica o processo de deutoplasmólise, por meio do qual se observa extrusão de material embrionário para o espaço perivitelínico desde os primeiros estádios de clivagem (HAMILTON & DAY, 1945). Esse material se acumula em um dos pólos do embrião, enquanto os blastômeros continuam seu desenvolvimento no outro pólo (HAMILTON & DAY, 1945; BETTERIDGE *et al.*, 1982). O material depositado vai desaparecendo a partir do estádio de 16 células (BETTERIDGE *et al.*, 1982).

No início, o vitelo é composto por grande quantidade de glóbulos de gordura fortemente aderidos uns aos outros, dando a aparência opaca ao embrião e impossibilitado a visualização de detalhes nucleares quando avaliados por microscópio de luz (HAMILTON & DAY, 1945).

Nos estádios iniciais do desenvolvimento, até aproximadamente o dia 5,5 (considerando o dia 0 como o dia da ovulação), os embriões comumente apresentam um formato elipsoidal e, a partir de então, eles assumem o formato circular (BETTERIDGE *et al.*, 1982). O último estádio do desenvolvimento que ocorre dentro da tuba uterina é o que corresponde a um embrião de 32 células, também chamado de mórula (MCKINNON & SQUIRES, 1988a).

A transição de mórula para blastocisto é marcada pelo aumento do número de blastômeros, pela formação de uma cavidade central no embrião denominada blastocele, e pela reorganização das células em duas populações, uma correspondente ao trofoblasto, fina camada de células que contorna a blastocele, e outra que corresponde ao embrioblasto ou massa celular interna, massa compacta e pequena que se projeta no interior da blastocele. Assim que a blastocele se forma por completo, o embrião começa a crescer rapidamente, passando ao estádio de blastocisto expandido (VANDERWALL, 1996).

As camadas extracelulares do embrião sofrem uma série de mudanças durante o desenvolvimento embrionário. No momento da ovulação, o ovócito é circundado por uma zona pelúcida bilaminar coberta por uma capa gelatinosa (HAMILTON & DAY, 1945).

Entre os estádios de 16 e 32 células, como os blastômeros não são facilmente identificados, o embrião é referido como mórula pré-compacta ou inicial. A continuidade das divisões celulares e a formação de junções



comunicantes levam a formação da mórula compacta, que é uma massa compacta de pelo menos 32 blastômeros. A mórula compacta é o último estágio de desenvolvimento do embrião encontrado na tuba uterina. A compactação se inicia com 8 a 16 células (BETTERIDGE *et al.*, 1982).

Embriões em estágio de três células são encontrado de 27-33h após a ovulação e o estágio de quatro células após 30-36h. Até o estágio de 4 células, os blastômeros apresentam aproximadamente o mesmo tamanho. O estágio de cinco células é encontrado após 50-56h após ovulação (HAMILTON & DAY, 1945).

Betteridge *et al.* (1982) caracterizaram embriões eqüinos de um dia e um dia e meio até embriões de cinco dias e cinco dias e meio:

- Embriões entre 1 e 1,5 dias: apresentam formato elipsoidal, com 3 a 4 células, com uma camada gelatinosa externa à zona pelúcida de aparência rugosa, a zona pelúcida com espessura variando de 19-38  $\mu\text{m}$ , podendo-se encontrar espermatozóides tanto na zona pelúcida quanto nas células da *corona radiata*.

- Embriões entre 2 e 2,5 dias: apresentam 4 células, formato elipsoide, zona pelúcida com 16  $\mu\text{m}$  de espessura e recoberta por uma camada gelatinosa, nem células da *corona radiata* nem espermatozóides são vistos na zona pelúcida.

- Embriões entre 3 e 3,5 dias: não apresentam formato elipsoidal e nem são perfeitamente esféricos. A zona pelúcida está relativamente mais fina (12-14  $\mu\text{m}$ ) e sem a aparência bilaminar de uma zona pelúcida mais espessa.

- Embriões de 4 dias: podem ser encontrados com 12 células e blastômeros separados ou com 16-32 células e com blastômeros começando a compactação. Os embriões apresentam um formato esférico, com a zona pelúcida variando de 13-17  $\mu\text{m}$ .

- Embriões entre 5 e 5,5 dias: podem apresentar de 10-16 células, mais de 32 células ou compactado com número indefinido de células. Estes embriões podem ser coletados diretamente da tuba uterina ou do útero no estágio de blastocisto. A camada externa à zona pelúcida fica proeminente nos pólos do embrião e a aparência bilaminar da zona pelúcida está ausente ou muito menos evidente como nos estádios anteriores.

Após entrarem no útero, os embriões aumentam de diâmetro e dentro da mesma idade pode haver variação quanto aos diâmetros. Betteridge *et al.* (1982) observaram que os diâmetros de cinco embriões de 7,5 dias apresentaram variação entre 238 a 768µm e a variação entre outros cinco embriões de 9,5 dias foi de 1700 a 4000 µm.

### 2.7. Formação da cápsula

Durante o estágio de blastocisto, ocorre a formação de uma cápsula acelular glicoprotéica entre a zona pelúcida e o trofoblasto, assim que o embrião chega ao útero, por volta dos dias 6 a 7 (TREMOLÉDA *et al.*, 2003). Como a formação da cápsula coincide com a formação do trofoblasto e do embrioblasto, ambos os tecidos podem estar envolvidos na sua formação (ORIOLO *et al.*, 1993a; ALBIHN *et al.*, 2000).

A cápsula é formada principalmente por dois componentes, uma matriz com estrutura semelhante ao colágeno, e glicoproteínas (BETTERIDGE, 1989). A cápsula permanece coberta pela zona pelúcida por alguns dias, até que a mesma começa a adelgaçar liberando o embrião. Até o 18º dia de gestação, a massa seca da cápsula aumenta rapidamente (ORIOLO *et al.*, 1993b). O embrião continuará envolto pela cápsula até aproximadamente o dia 22,5 de gestação, quando a mesma desaparece (ORIOLO *et al.*, 1993a).

Mesmo quando de espessura fina, a cápsula é bastante resistente e representa uma estrutura importante para o desenvolvimento do embrião eqüino. Caracteriza-se por ser um envoltório sujeito a pressões consideráveis durante a fase de migração, quando sua forma esférica irá sofrer distorções, mas a sua elasticidade e resistência protegem o embrião no útero para que ocorra o reconhecimento materno da gestação (GINTHER, 1992). Apesar de sua função ainda ser desconhecida, sua presença é essencial para a sobrevivência do embrião *in vivo* (STOUT *et al.*, 1997), por fornecer proteção física vital durante o reconhecimento materno da gestação, período em que o embrião é delicado e no qual ele irá ser propelido pelo útero por meio das contrações uterinas. A cápsula também atua na comunicação materno-embrião (HERRLER *et al.*, 2000), na nutrição (CROSSETT *et al.*, 1998), na perda da zona pelúcida (STOUT *et al.*, 1997), na proteção do embrião contra

microrganismos, e no reconhecimento imunológico materno (BETTERIDGE, 1989).

A mobilidade do embrião, que mede aproximadamente  $21,7 \pm 3.3$ mm, termina ao redor do dia  $15,6 \pm 0,3$  de gestação em jumentas, o que significa que ocorre depois da fixação em éguas e pôneis, e entre as duas últimas espécies a fixação ocorre primeiro nas pôneis (14,7º dia de gestação). A fixação nestas espécies ocorre na porção caudal de um dos cornos uterinos (BESSENT & GINTHER, 1988). A fixação do embrião ocorre antes do desaparecimento da cápsula. Durante esse estágio, ocorrem mudanças na composição e propriedades de adesão da cápsula, mudanças essas que podem estar associadas com a fixação e orientação do embrião no endométrio (BETTERIDGE, 1989).

Os embriões de eqüinos e asininos possuem uma cápsula que se assemelha quanto ao conteúdo de aminoácidos e carboidratos, e se diferenciam quanto ao peso de massa seca. A cápsula dos embriões asininos não apresenta um aumento significativo de peso seco antes do dia 11,5 de gestação (0,052mg no dia 9,5 e 0,093mg no dia 11,5). O peso máximo que a cápsula do embrião asinino atinge é metade do peso atingido pela cápsula do embrião eqüino (2,5mg para cápsula de asininos e 5,0mg para cápsula de eqüinos) (ORIOL *et al.*, 1993b).

Segundo Legrand *et al.* (2000) a cápsula dos embriões pode ser classificada de 0 a 4, sendo 0= ausência de cápsula; 1= cápsula em formação e pouco detectável; 2= cápsula delgada, nítida e, às vezes, descontínua; 3= cápsula nítida; e 4= cápsula espessa, com aproximadamente  $0,8 \mu\text{m}$ . Com base em resultados de suas pesquisas, Legrand *et al.* (2000) constataram que o uso do glicerol como crioprotetor em embriões eqüinos sem serem submetidos ao procedimento de congelamento-descongelamento, causou uma taxa de morte celular maior nos embriões com cápsula classificadas entre 0 e 3 quando comparados com embriões com cápsulas de grau 4. Esses resultados mostram que não há movimentação de fluidos através da cápsula mais espessa, ou seja, não há entrada de glicerol e nem saída de água da célula.

No mesmo experimento, quando os embriões foram congelados-descongelados, a taxa de morte celular foi diretamente proporcional à espessura da cápsula, indicando que os embriões de cápsula espessa não

toleram ao processo de congelamento-descongelamento, com os embriões sem cápsula sofrendo uma menor taxa de danos (LEGRAND *et al.*, 2000). Com base nesses resultados, estes pesquisadores chegaram à conclusão de que a cápsula embrionária interfere no efeito crioprotetor por prevenir a entrada do glicerol nas células embrionárias.

## 2.8. Reconhecimento materno da gestação

No útero, ocorre o reconhecimento materno da gestação, e para isso o corpo lúteo tem que se manter e continuar sua função secretora normal por um período superior ao seu ciclo de vida, fazendo com que o útero se mantenha em estado progesterônico ideal para manter uma gestação (GEISERT & MALAYER, 2004).

O reconhecimento materno da gestação em porcas ocorre porque o trofoblasto embrionário produz estrógeno que altera a secreção de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) endometrial de endógena para exógena, mantendo assim a  $PGF_{2\alpha}$  dentro do lúmen uterino impedindo a luteólise (SPENCER & BAZER, 2004).

Em ruminantes, o reconhecimento da gestação ocorre por meio de um hormônio protéico, interferon tau, produzido e secretado pelo trofoblasto alongado entre os dias 10 e 21-25 pós-ovulação e com produção máxima entre os dias 14 e 16. O interferon tau atua suprimindo a transcrição de receptores de estrógeno e oxitocina o que inibe o desenvolvimento do mecanismo luteolítico endometrial, mas ao mesmo tempo ele não inibe a produção basal de  $PGF_{2\alpha}$  por não afetar a expressão da COX-2 no início da gestação (SPENCER & BAZER, 2004).

Em éguas o reconhecimento se dá de forma diferente dos ruminantes e suínos. Os embriões eqüinos entre os dias 6,5 e 22 pós-ovulação são recobertos por uma cápsula elástica (BETTERIDGE, 1989). A cápsula previne o alongamento do trofoblasto entre os dias 10 e 16 pós-ovulação, permanecendo o embrião com o formato esférico e livre dentro do lúmen uterino, o que permite a sua movimentação constante dentro do útero por meio de contrações peristálticas fortes do miométrio (GINTHER, 1983a; GINTHER, 1985). A mobilidade embrionária persiste até o dia 17, quando um incremento

no tônus do miométrio imobiliza e fixa a vesícula embrionária na base de um dos cornos uterinos (VAN NIEKERK, 1965; GINTHER, 1983b).

Em jumentas as vesículas embrionárias foram primeiramente detectadas por MEIRA et al.,(1998) entre 10 a 13 dias ( $11,5\pm 0,9$ ) de gestação, apresentando formato esférico entre os dias 10 e 18. No mesmo período, a taxa de crescimento médio foi de 3,2mm/dia. Entre os dias 19 e 29, as vesículas apresentam formato irregular, com uma taxa de crescimento reduzida (0,5mm/dia). A taxa de crescimento até o dia 46 da gestação foi moderada, estando na faixa de 1,6mm/d (MEIRA et al.,1998).

### 2.9. Técnica de coleta de embriões

O método mais utilizado para coleta de embriões de eqüinos é o não cirúrgico e foi inicialmente descrito por OGURI & TSUTSUMI (1972), que utilizaram um cateter de três vias. Estes autores efetuavam o lavado no corno ipsilateral a ovulação, inflando o balão do cateter na base deste corno. Atualmente, o balão é inflado no corpo do útero, lavando-se os dois cornos simultaneamente (IMEL *et al.*, 1981; SQUIRES *et al.*, 1984), pois o embrião de eqüino com sete dias de idade já migra de um corno para outro, fazendo com que os índices de recuperação de embriões sejam menores quando somente um corno uterino é submetido à lavagem (ALLEN & ROWSON, 1975).

Este método é realizado somente a partir do 5º dia pós-ovulação, pois os embriões na égua migram para o útero com 5 ou 6 dias de idade (OGURI & TSUTSUMI, 1972).

Para a lavagem uterina podem ser utilizados cateteres de duas ou três vias, com sistemas dos tipos aberto ou fechado. Segundo Imel (1981), a introdução do cateter com o balão desinflado é feita por via transcervical e posicionado no corpo uterino, onde deve ser inflado com água ou ar, procedendo-se posteriormente a infusão do meio para lavagem uterina e retirada deste por gravidade.

A solução mais usada para a lavagem uterina é a solução salina fosfatada tamponada de Dulbecco & Vogt modificada por Whittinghan, (1971) – DPBS, que contém glicose, piruvato e 1% de soro fetal bovino (VOGELSANG *et al.*, 1979; IMEL, 1981; SQUIRES *et al.*, 1982; MEIRA, 1990; SQUIRES &

SEIDEL, 1995). Alvarenga *et al.* (1992) compararam as soluções DPBS e Ringer Lactato para lavado uterino obtendo taxas de prenhez de 57% (8/14) e 64% (14/22), respectivamente.

O volume de meio utilizado na espécie eqüina varia de 200 mL (VOGELSANG *et al.*, 1979) a cinco litros (SQUIRES *et al.*, 1982), dependendo do método de coleta (cirúrgica ou não-cirúrgica), do técnico e do porte da égua doadora.

## 2.10. Avaliação embrionária

Os embriões são classificados quanto à morfologia e estágio de desenvolvimento. A classificação morfológica embrionária baseia-se na forma, tamanho, cor e uniformidade celular, extrusões e degenerações dos blastômeros (MCKINNON & SQUIRES, 1988<sup>a</sup>; SQUIRES, 1992 adaptado de SLADE, 1985), como descrito a seguir:

Embriões grau I (Excelentes): Embriões esféricos, com células de tamanho, cor e textura uniformes. São os embriões ideais.

Embriões grau II (Bons): Embriões com defeitos menores como alguns blastômeros extrusados, contorno irregular ou separação do trofoblasto.

Embriões grau III (Regulares): Embriões com presença de blastômeros extrusados, células degeneradas no botão embrionário e/ou blastocele colapsada com perda da forma esférica.

Embriões grau IV (Ruins): Embriões com problemas sérios, como blastocele severamente colapsada, numerosos blastômeros extrusados e células degeneradas, botão germinativo escuro indicando morte celular, mas com algumas células de aparência viável; e

Embriões grau V (Mortos ou não fertilizados): Ovócitos não fertilizados ou embriões totalmente degenerados.

Quanto ao estágio de desenvolvimento (LINDNER & WRIGHT, 1983), classificam-se:

- Mórula (M): Massa de células sem separação nítida entre os blastômeros, ocupando quase todo espaço perivitelino;
- Mórula compacta (Mc): Massa compacta de blastômeros, ocupando de 60 a 70% do espaço perivitelino;

- Blastocisto inicial (Bi): Estádio onde se inicia a blastocele, a diferenciação entre trofoblasto e botão embrionário começa a ser visualizada, o embrião ocupa de 70 a 80% do espaço perivitelino;
- Blastocisto (BI): Blastocele bem definida, diferenciação evidente entre trofoblasto e botão embrionário, e embrião ocupando quase todo o espaço perivitelino;
- Blastocisto expandido (Bx): Embrião que tem seu diâmetro aumentado de 1,2 a 1,5 vezes e com uma diminuição de aproximadamente 1/3 da espessura da zona pelúcida; e
- Blastocisto eclodido (Bec): Embrião que já saiu ou que está saindo do interior da zona pelúcida. Presença nítida do botão embrionário e da blastocele.

### *2.11. Avaliação ultrassonográfica da cérvix, útero e ovários*

Os aparelhos de ultrassom utilizados para avaliar os órgãos genitais de grandes animais são do tipo B-modal em tempo real, ou seja, as imagens geradas na tela são em várias tonalidades de cinza e se atualizam em frações de segundos (SILVA, 2003).

Por meio do ultrassom, a cérvix no diestro e na gestação é visualizada como uma seção longitudinal de linhas horizontais ecogênicas, enquanto no estro a cérvix torna-se mais hipoecóica, podendo dificultar sua diferenciação com relação às estruturas adjacentes (SERTICH, 1998).

O exame ultrassonográfico do útero consiste em avaliações da ecotextura do endométrio, das contrações uterinas, do diâmetro dos cornos uterinos e de patologias, como cistos e coleções de fluidos (SILVA, 2003).

O útero tem a forma de um “Y” suspenso possibilitando que o mesmo seja examinado por completo. O transdutor usado no exame ultrassonográfico é do tipo linear, e durante o exame o mesmo deve ser posicionado longitudinalmente no reto fazendo com que a imagem do corpo uterino seja longitudinal e a dos cornos uterinos seja transversal (SERTICH, 1998).

O útero possui características que se modificam durante o ciclo estral. O endométrio possui várias pregas que promovem um aumento da superfície endometrial e, durante o estro, as pregas se tornam edemaciadas, promovendo

uma imagem ultrassonográfica que altera áreas ecogênicas com linhas anecóicas que se projetam para o interior do lúmen do corno uterino (SERTICH, 1998). Sendo assim, o líquido intersticial dentro das pregas endometriais, além de possíveis secreções das glândulas endometriais no lúmen uterino, também são responsáveis pela formação da textura tecidual (SILVA, 2003). Em jumentas, o edema endometrial torna-se visível aproximadamente uma semana após o desaparecimento do corpo lúteo (LEMMA *et al.*, 2006)

Após a ovulação e o desenvolvimento do corpo lúteo, o útero fica sob influência da progesterona que aumenta o tônus uterino. As pregas endometriais não se encontram mais edemaciadas, fazendo com que o útero apresente ecogenicidade homogênea e as pregas endometriais não se apresentem bem definidas (SERTICH, 1998).

O estro ocorre durante a fase folicular do ciclo estral, e durante esta fase vários folículos são encontrados nos ovários. Dentre eles, somente um ou dois, com 35mm de diâmetro, atingem a maturidade e ovulam. Com isso, o crescimento folicular e a ovulação podem ser acompanhados por ultrassom (SERTICH, 1998).

Os folículos são visualizados através do ultrassom como estruturas anecóicas arredondadas, e sua parede ecogênica de menos de 2mm de espessura e o parênquima ovariano, com ecogenicidade moderada e de caráter homogêneo. Embora ocorra mudança na consistência do folículo, juntamente com uma sensibilidade aumentada transitória do ovário, pode ser difícil determinar quando a ovulação ocorre, por meio da palpação retal do ovário (SERTICH, 1998). Dependendo do estágio reprodutivo, até 13 folículos de tamanhos diferentes podem ser encontrados nos ovários das jumentas, com cada onda de crescimento folicular sendo caracterizada pela mensuração dos três maiores folículos de cada ovário (LEMMA *et al.*, 2006)

Lemma *et al.* (2006) encontraram que em jumentas, o menor diâmetro folicular foi de 2mm e o maior foi de 40mm, e os ovários apresentam atividade folicular durante o período de gestação adiantada com alguns folículos alcançando até 24mm.

Aproximadamente 80,5% dos folículos ovulatórios em jumentas sofrem mudança de formato, passando do esférico ao oval, irregular ou elipsóide antes



da ovulação, enquanto que os 19,5% restantes permanecem com a forma inalterada (LEMMA *et al.*, 2006). A ovulação é detectada quando o folículo colapsa e a parede do mesmo se espessa devido ao processo de luteinização. O corpo lúteo resultante encontra-se dentro do ovário e não se projeta através da superfície e, desse modo, a palpação direta do corpo lúteo é difícil. Uma hemorragia significativa pode ocorrer no folículo com o desenvolvimento do corpo hemorrágico, e a imagem ultrassonográfica mostra um aumento da ecogenicidade no local da ovulação (SERTICH, 1998).

A ultrassonografia é muito empregada durante o estro para avaliar a atividade folicular, momento de cobertura e a eficiência das coberturas e/ou inseminações. Em um programa de transferência de embriões, é usada para a determinação exata da ovulação, permitindo o sincronismo entre a coleta para recuperação do embrião e a seleção de uma ótima receptora para o embrião (SERTICH, 1998).

## *2.12. Crioprotetores*

Para a criopreservação é necessária a presença de crioprotetores, substâncias que protegem as células embrionárias contra danos causados durante o congelamento e o descongelamento. Os crioprotetores são divididos em dois grupos: aqueles que penetram livremente dentro das células (glicerol, etileno-glicol, propanodiol, metanol, etanol e dimetilsulfóxido-DMSO), e aqueles que não penetram dentro das células, mas que são osmoticamente ativos (sacarose, lactose). A escolha do crioprotetor vai depender da espécie e da idade do embrião. Além de diminuir a formação dos cristais de água intracelulares e modificar as suas formas, a principal ação do crioprotetor é estabilizar as membranas, sendo o glicerol um crioprotetor que conserva a integridade estrutural das proteínas de membrana limitando a sua desnaturação (FIENI, 1995).

A toxicidade de um crioprotetor vai limitar a concentração a ser utilizada e o tempo de exposição das células ao mesmo. É difícil diferenciar a toxicidade causada pelo crioprotetor dos efeitos osmóticos sofridos pelas células (FIENI, 1995). Existem dois tipos de toxicidade, a osmótica e a bioquímica. A toxicidade osmótica se caracteriza pela saída de água do embrião para o meio

hiperosmótico, contendo o crioprotetor, levando a uma redução do volume do embrião. Para evitar esse problema, realiza-se a incorporação do crioprotetor em etapas com concentrações crescentes (SCHNEIDER & MAZUR, 1984) e a retirada do mesmo em etapas com concentrações decrescentes (WILLADSEN *et al.*, 1978; BOUYSSOU & CHUPIN, 1982; ELDSSEN *et al.*, 1982). A toxicidade bioquímica se caracteriza por alterações do potencial de membrana, da tensão superficial, do equilíbrio iônico, do potencial de oxi-redução, da força iônica e de pH, alterações essas devidas às interações do crioprotetor com os constituintes celulares. Para se evitar essas alterações, o ideal é reduzir o tempo de contato do embrião com o crioprotetor antes do congelamento uma vez que sua incorporação é rápida (FIENI, 1995).

### **3. Justificativa e objetivos**

Mesmo quando muitos embriões pareçam viáveis após criopreservação e retirada do crioprotetor, a taxa de prenhez obtida após transferência é consideravelmente menor quando comparada aos resultados obtidos com a transferência de embriões não submetidos a processos de congelamento e descongelamento.

Sabe-se que parte do insucesso desta técnica para eqüinos é devido à presença e espessura da cápsula glicoprotéica (LEGRAND *et al.*, 2000) e ao fato do blastocisto eqüino possuir células maiores e mais numerosas que aquelas observadas em embriões bovinos aos 7 ou 8 dias de gestação (SLADE *et al.*, 1985).

Como demonstrado por pesquisadores, a cápsula do embrião asinino se assemelha à cápsula de embrião eqüino quanto ao conteúdo de aminoácidos e carboidratos, e se diferencia quanto ao peso de massa seca. Baseando-se nessa diferença, pretende-se estudar como o embrião asinino vai se comportar na presença do crioprotetor sem o processo de congelamento-descongelamento, avaliando sua viabilidade por meio de técnicas morfológicas e morfométricas.

O objetivo geral do trabalho é avaliar morfológica e morfometricamente os embriões de jumentas da raça Pêga e o efeito do glicerol como crioprotetor para os mesmos.

Os objetivos específicos são:

- Acompanhar e registrar a dinâmica folicular durante o estro em jumentas;
- Adaptar a técnica de coleta de embriões em jumentas;
- Avaliar as características morfológicas e morfométricas de embriões de jumentas Pêga imediatamente após a coleta;
- Avaliar a viabilidade dos embriões após o tratamento com o crioprotetor sem o processo de congelamento-descongelamento.

#### **4. Material e métodos**

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, que segue a legislação vigente baseando-se nos Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

##### *4.1. Local de realização do experimento*

O experimento foi realizado no município de Viçosa (latitude 20°45'14" sul e longitude 42°52'55" oeste), localizado na Zona da Mata de Minas Gerais, com altitude de 648 metros e clima do tipo tropical de altitude, com chuvas durante o verão e temperatura anual em torno de 19°C.

O experimento a campo foi conduzido de agosto de 2008 a maio de 2009, no Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia/UFV, campus de Viçosa, enquanto a parte laboratorial foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Veterinária/UFV e no Núcleo de Microscopia e Microanálise/UFV.

##### *4.2. Animais*

Foram utilizadas três jumentas da raça Pêga, com idades de 2,5; 7 e 12 anos e com peso corporal de 192; 260 e 241 kg respectivamente, e um garanhão da mesma raça com 5 anos de idade e 307 kg de peso corporal, em atividade reprodutiva normal, pertencentes ao Setor de Equideocultura (DZO/UFV).

As jumentas foram mantidas sob sistema de criação semi-extensiva, em piquetes, recebendo capim picado e ração para complementar a alimentação, além de suplementação mineral. O garanhão foi mantido em baia individual recebendo capim picado e ração, diariamente, juntamente com suplementação mineral e, durante algumas horas do dia, mantido solto em piquete.

Os órgãos genitais das jumentas foram examinado por meio de palpação retal e ultrassonografia com auxílio de um ultra-som Aloka Echo Câmera SSD-

210 DX. Foi constatado que as três jumentas estavam aptas a participar do experimento porque não apresentavam nenhuma alteração dos órgãos genitais além de não apresentarem nenhuma alteração durante o exame clínico.

Com o início do experimento, as jumentas tiveram útero e ovários avaliados a cada 24 horas por meio de ultrassonografia e os maiores folículos tiveram seus diâmetros mensurados e anotados até o momento da ovulação. Os diâmetros anotados foram usados para se estabelecer a dinâmica folicular nas jumentas Pêga durante os seis dias que antecederam a ovulação.

Quando o diâmetro dos folículos ultrapassou 25mm, as jumentas passaram a ser rufiadas com o garanhão Pêga, diariamente, para detecção do estro. Após detecção do estro, as jumentas foram colocadas com o garanhão Pêga para monta natural ou então inseminadas artificialmente (IA) a cada 48h até que a ovulação fosse detectada pela palpação e ultrassonografia (FIELDING, 1988). Para a inseminação artificial, o sêmen foi coletado e diluído na proporção de 1:1 em meio a base de leite desnatado (KENNEY et al., 1975). A escolha do método de fertilização, IA ou monta natural, variou porque o garanhão Pêga também tinha doses de seu sêmen vendida.

Assim que se detectava a ovulação, as jumentas continuavam na rotina do experimento, mas sem serem palpadas por sete dias. Após este período, foi realizada a lavagem uterina no intuito de recuperar embriões de 7 dias. No dia da lavagem uterina, os ovários eram novamente avaliados por ultrassonografia para continuar o acompanhamento do crescimento folicular e acompanhar a regressão do corpo lúteo.

Ao final da lavagem uterina se administrou uma dose de 1mL PGF<sub>2α</sub> (Dinoprost Trometamina – Lutalyse<sup>®</sup> da Pfizer ou Cloprostenol sódico – Sincrocio<sup>®</sup> da Ouro Fino) no intuito de encurtar o ciclo estral e aumentar o número de lavagens uterinas por fêmea durante a estação de monta.

#### *4.3. Coleta dos embriões*

A jumenta doadora foi contida em um tronco de éguas adaptado com uma plataforma de madeira de aproximadamente 25cm de altura para deixá-las mais altas e facilitar o seu manuseio. Depois de contida, foi submetida à higienização da genitália externa com sabão de coco e iodopovidona. A técnica

de coleta de embriões escolhida foi a não-cirúrgica descrita e preconizada por SQUIRES et al. (1985).

O cateter de eleição foi do tipo Foley de duas vias n° 20, com 50cm de comprimento (AB Technology) e em sua extremidade foi adaptado uma mangueira de silicone 15cm no intuito de aumentar o comprimento do cateter e facilitar o manuseio do copo coletor.

Com a mão enluvada e por via vaginal o cateter foi introduzido até alcançar a cérvix. Para ultrapassar a cérvix, que durante o diestro é bem flexível, o cateter foi guiado pelo dedo indicador até que sua extremidade chegasse ao corpo do útero. No corpo uterino o balonete foi inflado com 60 mL de ar para sua fixação.

Para a lavagem uterina utilizou-se Ringer Lactato<sup>®</sup>, como preconizado por Fleury *et al.* (2001), que foi previamente aquecido a 37°C, no total de 1 litro por jumenta, o qual foi dividido em 2 lavagens de 500mL, realizadas concomitantemente com a manipulação uterina por via retal. Todo líquido drenado passou através de um filtro (Millipore<sup>®</sup>) apropriado para reter embrião.

O líquido contido no filtro (aproximadamente 30 mL) foi colocado em placa de Petri estéril descartável (Placa de Petri estéril 100x20 - Corning) previamente quadriculada, onde foi realizada a procura do embrião, por meio de análise em estereomicroscópio (Tecnival), com aumentos entre 10 e 45x.

#### *4.4. Avaliação e mensuração dos embriões*

Os embriões, assim que recuperados, foram lavados em TQC Holding Plus (Bioniche/USA - Nutricell) e classificados de acordo com a morfologia e o estágio de desenvolvimento.

A classificação morfológica dos embriões em grau I, II, III, IV e V baseou-se na forma, tamanho, cor e uniformidade celular, extrusões e degenerações dos blastômeros segundo e McKinnon & Squires (1998a) e Squires (1992) adaptado de Slade (1985). Quanto ao estágio de desenvolvimento os embriões foram classificados em mórula, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido segundo Lindner & Wright (1983).

Dos 21 embriões coletados, 19 tiveram o diâmetro mensurado no aumento de 45x com o auxílio de retículo micrométrico (1mm de lado e 100 subdivisões internas) adaptado na ocular de 10x do estereomicroscópio, sendo que seis destes embriões tiveram os diâmetros mensurados antes de serem processados para microscopia.

O retículo micrométrico foi calibrado com uma régua de valor conhecido que apresentava 1mm de comprimento com 100 subdivisões, tendo cada subdivisão 10µm. Para a calibragem, foi encontrado o fator de correção por meio da divisão do número de espaços ocupado na régua e seu correspondente no retículo para o máximo de correspondências possíveis. Após obtenção dos fatores de correção, uma média foi feita com todos os valores encontrados para se chegar a um valor final.

Após encontrar o fator de correção, o cálculo do diâmetro seguiu da seguinte forma:

$$\text{Diâmetro} = N * \text{Fator de correção} * 10\mu\text{m}$$

N= número de espaços da régua ocupados pelo embrião

#### *4.5. Adição e remoção do crioprotetor*

Os embriões coletados foram divididos em dois grupos: grupo controle, com embriões frescos, e grupo tratado, com embriões submetidos à adição e remoção do agente crioprotetor.

O crioprotetor de eleição foi o glicerol, sendo utilizadas soluções comerciais de congelação (Soluções de Congelação I, II e III) e descongelação (Soluções de Descongelação I, II e III) da Nutricell.

A composição das soluções de congelação é: Solução I: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DMPBS) e 0,4% Soro Fetal Bovino (BSA); Solução II: DMPBS, 0,4% BSA, 5% de glicerol; e Solução III: DMPBS, 0,4% BSA, 10% de glicerol. A composição das soluções de descongelação é: Solução I: DMPBS, 0,6 M de sacarose, 5% de glicerol; Solução II: DMPBS, 0,6 M de sacarose, 2,5% de glicerol; e Solução III: DMPBS, 0,6 M de sacarose, 0% de glicerol.

A submissão dos embriões às soluções seguiu as recomendações do fabricante, que consiste em banhos de cinco minutos em cada solução. Todo o processo foi realizado em temperatura ambiente. Primeiramente, os embriões foram expostos às soluções de congelação (I, II e III) e, imediatamente após o último banho, foram expostos às soluções de descongelação (I, II e III), segundo Bruyas (1997) e Legrand (2000).

#### *4.6. Análise estrutural e ultra-estrutural dos embriões*

##### *4.6.1. Fixação primária*

Dos 21 embriões coletados, 19 foram incluídos para estudos em microscopias de luz e eletrônica de transmissão.

Os embriões do grupo-controle assim que coletados e classificados e os do grupo tratado após o último banho, foram submetidos à fixação primária em solução a base de glutaraldeído em tampão fosfato. Os embriões imersos na solução de glutaraldeído foram acondicionados em eppendorfs e armazenados em geladeira a 4°C até o final da parte de campo do experimento.

A solução de tampão fosfato 0,2M foi preparada a partir de duas soluções iniciais: solução 1 composta de 2,76g de fosfato monobásico em 100 mL de água destilada e solução 2 composta de 2,84g de fosfato dibásico em 100 mL de água destilada. A obtenção da solução final foi conseguida ao adicionar-se a solução 1 aos poucos na solução 2 até alcançar um pH entre 7,2 e 7,4.

Depois de obtida a solução-tampão 0,2M, a solução de fixação à base de glutaraldeído foi preparada utilizando-se 1 mL de glutaraldeído a 25%, 5,0mL da solução de tampão fosfato 0,2M e 4,0 mL de água destilada. Com isso, a solução final de fixação foi 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3.

##### *4.6.2. Fixação secundária*

Com o fim da parte de campo do experimento, iniciou-se a parte laboratorial do experimento. No laboratório, os embriões foram retirados da



solução de glutaraldeído e então lavados em solução de tampão fosfato. Assim que terminou a lavagem dos embriões, eles foram submetidos à fixação secundária com tetróxido de ósmio 1% em geladeira por um período de três horas.

Transcorridas as três horas em geladeira, os embriões passaram por três banhos de cinco minutos cada em água destilada, e iniciou-se a desidratação em séries crescentes de álcool PA (50, 70, 80, 90 e 100%) durante dez minutos cada, repetindo-se por três vezes a lavagem em álcool PA em concentração 100%.

#### *4.6.3. Inclusão*

Terminados os banhos em álcool, os embriões foram colocados em solução composta de duas partes de álcool para uma de resina (Epon 812), permanecendo na mesma por 12 horas. A seguir, os embriões foram passados para uma solução composta de uma parte de resina e uma parte de álcool onde permaneceram por 12 horas.

Transcorrido as doze horas na solução 1:1 (álcool:resina), os embriões foram colocados em resina pura e deixados por mais 12 horas, após o que foram colocados em solução de resina pura e mantidos em estufa a 40°C por uma hora e, em seguida, transferidos para estufa a 60°C por 72 horas.

#### *4.6.4. Microtomia*

Os blocos foram desbastados em ultramicrotomo (MT2-B Ultra Microtome, SORVALL®), utilizando-se navalha de vidro, para aproximar os embriões da superfície de corte, e então dar início aos cortes semi-finos (0,5 µm). Os cortes obtidos foram montados em lâminas histológicas, corados com azul de Toluidina à quente, e depois avaliados em microscópio de luz para confirmação da presença de embriões.

Depois de retirados os cortes semi-finos, a navalha foi trocada para navalha de diamante, e então realizados os cortes ultra-finos. Os cortes ultra-finos foram coletados em gradículas de cobre e contrastados durante 20 minutos com acetato de uranila e por cinco minutos em citrato de chumbo.

Após a contrastação, os cortes foram examinados em microscópio eletrônico de transmissão (MET) (Zeiss, modelo EM 109).

Na microscopia eletrônica de transmissão os cortes dos embriões foram analisados levando-se em consideração a morfologia das mitocôndrias, lisossomos e lipídios, bem como a integridade das membranas e junções celulares (LANDIN e ALVARENGA, 1995; PERES *et al.* 2007).

#### *4.7. Análises estatísticas*

Os valores obtidos para as características estudadas foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran) e, posteriormente, à análise de variância. Caso apresentassem significância, foi realizado o teste de comparação de médias mais apropriado, no intuito de se evitar erros estatísticos tipo I ou II. Quando não atendia às premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (SAEG, 1999).

A variável qualitativa (taxa de ovulação) foi comparada em tabela de contingência e analisada pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade (SAMPAIO, 2002).

## **5. Resultados e Discussão**

### **5.1. Comportamento durante o estro**

As três jumentas acompanhadas apresentaram todos os sinais de estro característicos para a espécie (mastigação, micção freqüente, eversão do clitóris, levantamento da cauda, orelhas tocando o pescoço) conforme descrito por Vandeplassche *et al.* (1981) e Henry *et al.* (1987) e, com a presença do garanhão Pêga, os sinais se tornavam mais visíveis, como descrito por Borwick (1970). A manifestação de estro ocorreu durante todo o período experimental, compreendido entre os meses de agosto 2008 a maio de 2009, característico da estação de inverno a outono. Duas das três jumentas apresentaram comportamento homossexual, montando umas nas outras durante o estro, sendo que este comportamento tornou-se mais freqüente após as coberturas. O comportamento homossexual entre jumentas também foi encontrado por Vandeplassche *et al.* (1981) em duas das jumentas utilizadas no experimento e observadas nesse período do ciclo estral.

### **5.2. Acompanhamento folicular**

Durante os meses de experimento foram acompanhados um total de 36 estros (12, 12 e 12 ciclos respectivamente em cada jumentas), e somente um foi caracterizado por estro anovulatório, uma vez que ocorreu a luteinização do folículo dominante quando o mesmo atingiu 43mm de diâmetro maior e 31mm de diâmetro menor.

Dentre os 36 estros, ocorreu apenas uma dupla ovulação (2,8%), no período de verão. Vandeplassche *et al.* (1981) durante seus estudos encontraram apenas uma ovulação, e por outro lado, Lemma *et al.* (2006) observaram uma incidência de 8,8% no total de 84 ciclos, e Trimeche *et al.* (1995) observaram uma incidência de 3,5% de duplas ovulações durante a primavera e 15% durante o verão. Henry *et al.* (1987) relataram a incidência de ovulações simples em 62,8%, duplas em 25,5%, triplas em 10,5% e quádruplas em 1,1%, sendo que 90% das ovulações múltiplas se restringiram a duas jumentas.

Como Henry *et al.* (1987) relataram que as poliovulações estão mais relacionadas ao indivíduo que a espécie, provavelmente se tivessem sido realizadas mais observações de estros por animal o número de ovulações múltiplas poderiam ter sido maior. Em outro estudo, Nishikawa & Yamazaki (1949) concluíram que as poliovulações são muito mais freqüentes nas jumentas quando comparado às éguas e fêmeas pôneis.

Vandeplassche *et al.* (1981) relataram que quando ocorreu dupla ovulação, cada ovário ovulou com um intervalo de até dois dias de diferença; porém, no presente estudo, os dois ovários ovularam no mesmo dia. Henry *et al.* (1987) encontraram que 37,5% (12/32) das múltiplas ovulações envolveram somente o ovário esquerdo, 15,6% (5/32) somente o ovário direito, e 46,9% (15/32) envolveram ambos os ovários.

O acompanhamento da dinâmica ovariana durante o estro mostrou que o ovário com maior número de ovulações foi o direito, com 27 ovulações, resultando em 75% das ovulações (27/36), enquanto o ovário esquerdo apresentou 25% das ovulações (9/36), o que permitiu constatar diferença ( $p < 0,01$ ) entre eles (Gráfico 1). Durante todo o experimento observou-se que uma das jumentas, mesmo apresentando atividade folicular em ambos os ovários, apenas ovulou do ovário direito. Não foi possível fazer a mesma análise estatística por animal devido ao número de observações serem restritas (Gráfico 2).

A diferença na freqüência de ovulação entre os ovários direito e esquerdo (75% e 25%, respectivamente) encontrado no presente estudo contraria os resultados encontrados por Henry *et al.* (1987), onde 61% (77/126) das ovulações ocorreram no ovário esquerdo. No entanto, Vandeplassche *et al.* (1981) não encontraram diferença na freqüência de ovulação entre ovário esquerdo e direito (9 versus 10).

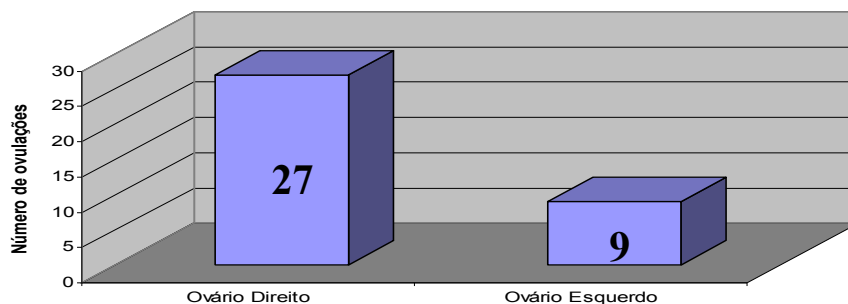


Gráfico 1: Número de ovulações por ovário.

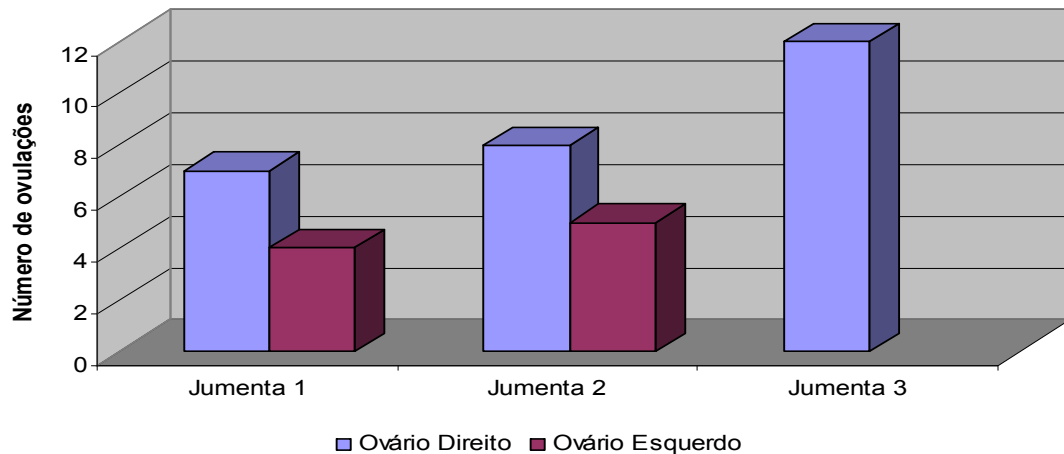


Gráfico 2: Frequência das ovulações de acordo com os ovários e jumenta.

A atividade folicular acompanhada diariamente em 27 dos 36 estros por meio de ultrassonografia permitiu a mensuração dos diâmetros maior e menor dos folículos dominantes, sendo possível descrever a dinâmica folicular em jumentas nos últimos seis dias antes da ovulação.

Os valores de todas as mensurações foliculares encontram-se em anexo e a média entre os diâmetros maior e menor são apresentados na tabelas 8 e representados no gráfico 3. O gráfico 4 mostra a dinâmica da média dos diâmetros maior e menor dos folículos pré-ovulatórios nas três jumentas separadamente.

Tabela 8: Valores máximos e mínimos (mm) das médias dos diâmetros ( $\emptyset$ ) foliculares maior e menor ao longo do período de observação (dias).

	Dias					
	-6	-5	-4	-3	-2	-1
$\emptyset$ Máximo	27,5	39,5	36	40	44	47
$\emptyset$ Mínimo	17,5	19,5	24	27,5	28,5	31
$\emptyset$ Média	23,2 $\pm$ 3,1 <sup>E</sup>	26,3 $\pm$ 2,8 <sup>D</sup>	29,2 $\pm$ 3,1 <sup>C</sup>	32,7 $\pm$ 3,5 <sup>B</sup>	35,2 $\pm$ 3,4 <sup>AB</sup>	37,4 $\pm$ 4 <sup>A</sup>

Letras diferentes na linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

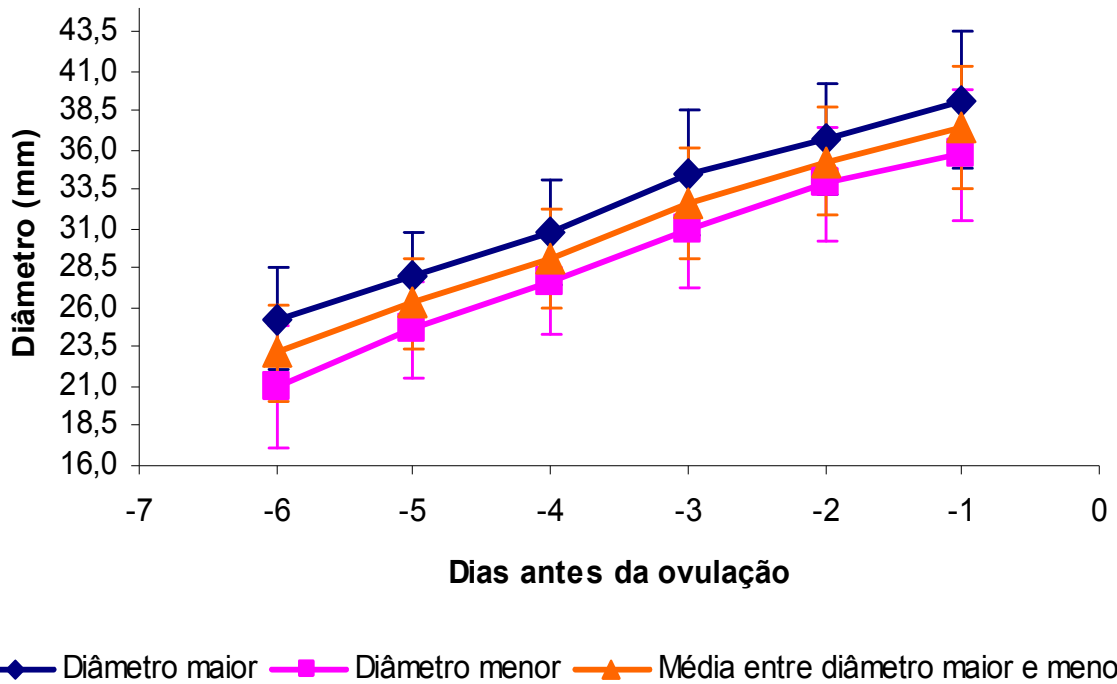


Gráfico 3: Dinâmica folicular nos seis dias que antecederam a ovulação em três jumentas da raça Pêga.

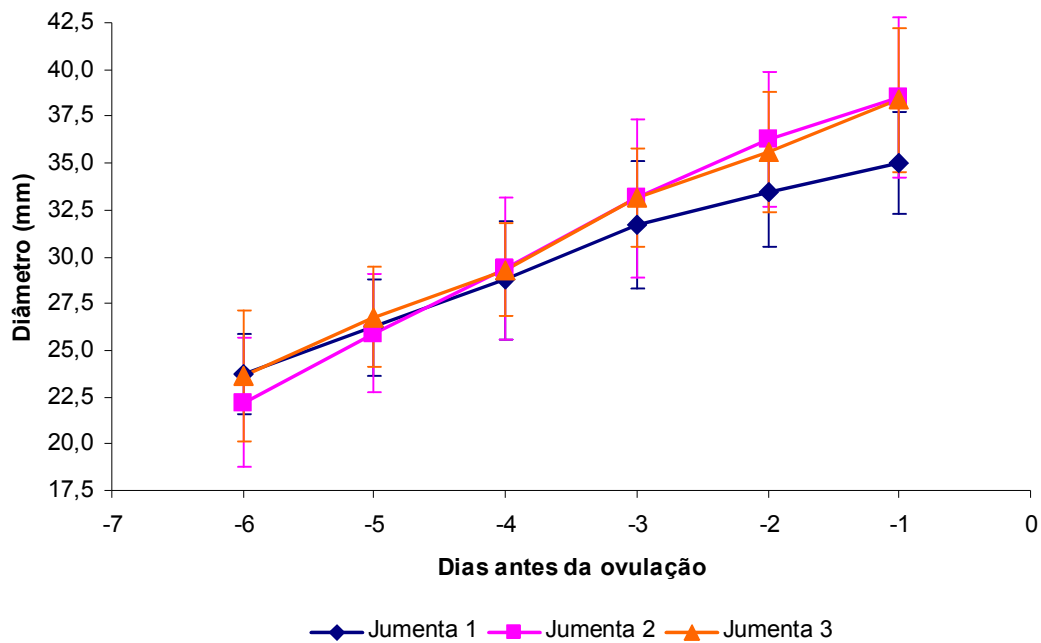


Gráfico 4: Média dos diâmetros maiores e menores dos folículos nos seis dias que antecederam a ovulação nas três jumentas separadamente.

A análise estatística mostrou que houve diferença ( $p < 0,05$ ) quanto ao diâmetro dos folículos de um dia para outro. Para a espécie asinina não podemos nos basear em somente um diâmetro (maior ou menor) porque, como descrito por Lemma *et al.* (2006), 80,5% dos folículos ovulatórios sofrem mudança de conformação passando de esférico para oval, irregular ou elipsóide antes da ovulação. No presente estudo também foi observado este comportamento de mudança de formato, onde alguns folículos no dia que antecedeu a ovulação apresentaram valores de diâmetros maior e menor muito próximos enquanto outros apresentaram grandes diferenças, como o exemplo da jumenta 3, cujos valores registrados foram de 23x22mm no dia -6; 29x24mm no dia -5; 32x27mm no dia -4; 32x30mm no dia -3; 35x34mm no dia -2; e 44x35mm no dia -1. A análise da dinâmica folicular por animal mostrou que não houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre elas.

Os valores médios dos diâmetros maior (39,1mm) e menor (37,4mm) estão dentro dos valores encontrados por Vandeplassche *et al.* (1981) que variaram de 30mm a 40mm com média de 36mm, por Lemma *et al.* (2006) que variaram de 27,5mm a 40,2mm com média de 34,4mm, e por Trimeche *et al.* (1995) encontraram valores máximos de 34,2mm durante a primavera e 36,2mm durante o verão.

### 5.3. Coleta, avaliação e mensuração dos embriões do grupo controle e grupo tratado

A técnica de coleta não cirúrgica mostrou-se eficaz para as jumentas da raça Pêga. Foram acompanhados 36 estros, com 35 coletas devido à luteinização de um folículo dominante. Um dos lavados realizado após uma ovulação simples recuperou dois embriões, único momento de observação deste fato.

A taxa de recuperação embrionária no oitavo dia pós-ovulação foi de 60% (21/35). A taxa de recuperação do presente estudo mostrou-se próxima a encontrada por Camillo *et al.* (2010), que foi de 64,3% (63/98) quando usado o número de ovulações, e 75,9% (63/83) quando usado o número de estros. Os pesquisadores em questão obtiveram um melhor índice de coleta quando a mesma foi realizada nos dias 8 e 9 pós-ovulação se comparada com aquelas

realizadas no dia 7. Isso provavelmente ocorreu porque os embriões mais velhos possuem um diâmetro maior, ou então devido a um atraso na descida do embrião ao útero quando se compara jumentas com éguas e vacas, sendo esta última a teoria a menos provável (CAMILLO *et al.*, 2010).

Os embriões coletados se encontravam em estádios de mórula compacta (Mc), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx). Dentre os embriões coletados, as mórulas compactas corresponderam a 9,52% (2/21), os blastocistos a 38,1% (8/21) e os blastocistos expandidos a 52,38% (11/21) (Figura 1).

A avaliação morfológica das mórulas compactas mostrou que uma foi classificada como grau I ou excelente, e a outra como grau II ou bom, classificação essa devido à presença de alguns blastômeros de tamanhos diferentes.

Os blastocistos apresentaram forma esférica, blastocele bem definida e massa celular interna compacta. Dentre eles, somente um foi classificado como grau II por apresentar adelgaçamento em parte da zona pelúcida, o que caracteriza um contorno irregular. Os blastocistos expandidos apresentaram forma esférica ou ovalada, com células de tamanho e cor uniformes e nenhuma extrusão celular, sendo então classificados como blastocistos expandidos grau I.



Figura 1: Embriões de jumentas Pêga coletados no oitavo dia pós-ovulação, (A) mórula compacta; (B) blastocisto, (C) blastocisto expandido.



Dos 21 embriões coletados, dois foram perdidos durante o manuseio, restando 19 embriões para estudos posteriores. Destes 19 embriões, seis tiveram o seu diâmetro mensurado imediatamente após a coleta com o auxílio de um retículo micrométrico adaptado no estereomicroscópio com o experimento já em andamento. Quatro deles pertenciam ao grupo tratado com crioprotetor e seu diâmetro foi novamente mensurado após o tratamento. Os seis embriões mensurados no dia da coleta e os 13 restantes tiveram os diâmetros mensurados após fixação em glutaraldeído e após lavagem em tampão fosfato antes da fixação secundária em tetróxido de ósmio.

Dentre esses seis embriões mensurados no dia da coleta, quatro eram blastocistos expandidos, um era blastocisto e outro mórula compacta. Dos quatro blastocistos expandidos, dois pertenciam ao grupo tratado e dois ao grupo controle. Os valores obtidos para todos os quatro blastocistos expandidos a fresco variaram de 250 $\mu$ m a 525 $\mu$ m (média 383,3 $\mu$ m), para o blastocisto foi de 187,5 $\mu$ m e para a mórula compacta foi de 150 $\mu$ m. A média para todos os diâmetros foi de 316,7 $\mu$ m (Tabela 9).

Os embriões do grupo tratado que tiveram os diâmetros mensurados antes e após o tratamento com crioprotetor mostraram que houve redução média de 18,3% nos valores dos diâmetros. Três dos embriões que tiveram o diâmetro mensurado assim que coletado, tratado, fixado e lavado em tampão fosfato, mostraram redução do diâmetro inicial para o diâmetro final. Somente um blastocisto apresentou aumento de diâmetro (3,9%) no final do processo. A redução média foi de 20%. (Tabelas 9 e 10)

Para os dois embriões do grupo controle, a percentagem média de perda de diâmetro ao serem fixados foi de 41,3%, e os diâmetros aumentaram em média 28,4% assim que foram retirados do fixador e colocados no tampão fosfato. No geral, a percentagem média de perda de diâmetro dos embriões foi de 24,6%.

Tabela 9: Diâmetros embrionários ( $\mu\text{m}$ ) durante as fases dos tratamentos experimentais.

Estádio de Desenvolvimento	Grupo controle			Grupo tratado		
	Bx	Bx	Mc	BI	Bx	Bx
Grau	I	I	II	I	I	I
Diâmetro a fresco	412,5	250	150	187,5	375	525
Diâmetro após passagem pelo crioprotetor			150	125	350	350
Diâmetro após fixação com glutaraldeído	243,5	146,1	73,1	146,1	219,2	243,5
Diâmetro após lavagem em tampão fosfato	340,9	170,5	97,4	170,5	389,6	316,6

Tabela 10: Percentagem do diâmetro ( $\emptyset$ ) perdida e recuperada durante as fases experimentais para o grupo tratado.

	Mc	BI	Bx	Bx	
Fresco – Glicerol	0%	-33,3%	-6,7%	-33,3%	= -18,3%
Glicerol – Glutaraldeído	-51,3%	+16,9%	-37,4%	-30,4%	=-25,6%
Glutaraldeído – Tampão fosfato	+33,2%	+16,7%	+77%	+30%	=+39,2%
Perda ou ganho com o tratamento ( $\emptyset$ glicerol – $\emptyset$ tampão fosfato)	-35,1%	-36,4%	+11,3%	-9,5%	=-17,4%
Perda ou ganho total ( $\emptyset$ inicial – $\emptyset$ final)	-35,1%	-9,1%	+3,9%	-39,7%	=-20%

Ao avaliar os diâmetros de todos os outros embriões após fixação primária em glutaraldeído e após lavagem em tampão fosfato, observou-se que houve um aumento de diâmetro em torno de 29% para o grupo controle e 38,3% para o grupo tratado. O aumento médio entre os dois grupos foi de 33,9% (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11: Percentagem do diâmetro recuperada após retirada do glutaraldeído dos embriões do grupo controle e lavagem no tampão fosfato.

Estádio de Desenvolvimento	BI	BI	BI	Bx	Bx	Bx	Bx	Bx	Bx
Diâmetro após fixação com glutaraldeído	121,8	146,1	146,1	243,5	146,1	1047,1	194,8	292,2	340,9
Diâmetro após lavagem em tampão fosfato	170,5	146,1	243,5	340,9	170,5	1412,4	243,5	340,9	414
% de aumento do Diâmetro	<b>40,0</b>	<b>0</b>	<b>66,7</b>	<b>40</b>	<b>16,7</b>	<b>34,9</b>	<b>25</b>	<b>16,7</b>	<b>21,4</b>

Tabela 12: Percentagem do diâmetro recuperada após retirada do glutaraldeído dos embriões do grupo tratado e lavagem no tampão fosfato.

Estádio de Desenvolvimento	Mc	BI	BI	BI	BI	Bx	Bx	Bx	Bx	Bx
Diâmetro após fixação com glutaraldeído	73,1	146,1	73,1	194,8	292,2	219,2	243,5	267,9	194,8	219,2
Diâmetro após lavagem em tampão fosfato	97,4	170,5	121,8	267,9	365,3	389,6	316,6	365,3	267,9	267,9
% de aumento do Diâmetro	<b>33,2</b>	<b>16,7</b>	<b>66,6</b>	<b>37,5</b>	<b>25,0</b>	<b>77,7</b>	<b>30,0</b>	<b>36,4</b>	<b>37,5</b>	<b>22,2</b>

Embora tenha havido uma redução média de 20% no diâmetro dos quatro embriões do grupo tratado e de 24,6% para os dois do grupo controle após fixação primária em glutaraldeído, observou-se aumento de 38,9% para os dez embriões do grupo tratado e 29% para os nove do grupo controle após lavagem em tampão fosfato. Porém, estes valores mostram que não houve diferença ( $p>0,05$ ) em função dos tratamentos sofridos.

Além da redução do diâmetro que os embriões sofreram durante o tratamento com o glicerol, com exceção da mórula compacta, o grau morfológico também foi afetado. Os embriões apresentaram mudança na sua conformação, onde o trofoblasto perdeu a sua forma lisa e passou a apresentar deformidades em seu contorno devido à desidratação causada pelo glicerol (Figura 2). Bruyas (1997) encontrou as mesmas alterações morfológicas em embriões de éguas submetidos ao glicerol e ao processo de congelamento e descongelamento.

Legrand (2000) estudando a relação entre a cápsula e o processo de congelamento de embriões eqüinos, encontrou que embriões com cápsula mais delgada (espessura inferior a  $0,8\mu\text{m}$ ) submetidos ao glicerol, sem procedimento de congelamento e descongelamento, mostraram uma alta taxa de morte celular. Relacionando o dano celular com a espessura da cápsula, estes pesquisadores explicaram que em embriões sem cápsula, com a cápsula em formação e com cápsula delgada, ocorre um fluxo de saída de água e um de entrada de glicerol, levando a dano osmótico suave; em embriões com cápsula nítida, mas com espessura inferior a  $0,8\mu\text{m}$ , o fluxo de saída de água não é compensado pelo fluxo de entrada de glicerol devido à espessura da cápsula, causando danos osmóticos mais severos; e embriões com cápsula espessa ( $0,8\mu\text{m}$ ) a morfologia é a mesma dos embriões frescos, e com baixa taxa de morte celular, sugerindo que não há movimentação de fluídos através da cápsula (nem saída de água e nem entrada de glicerol), conseqüentemente não havendo danos osmóticos.

Além de Legrand (2000), Bruyas et al. (2000) também sugere que a cápsula é um importante parâmetro durante o congelamento de embriões eqüinos. No presente estudo, a cápsula provavelmente não era espessa o suficiente para impedir a passagem de fluidos através dela, e por isso os embriões sofreram alteração de sua morfologia.

Alguns embriões estudados sofreram alterações morfológicas mais evidentes que outros. Essa diferença provavelmente é devido à diferença na classificação da cápsula, como descrito por Legrand (2000).

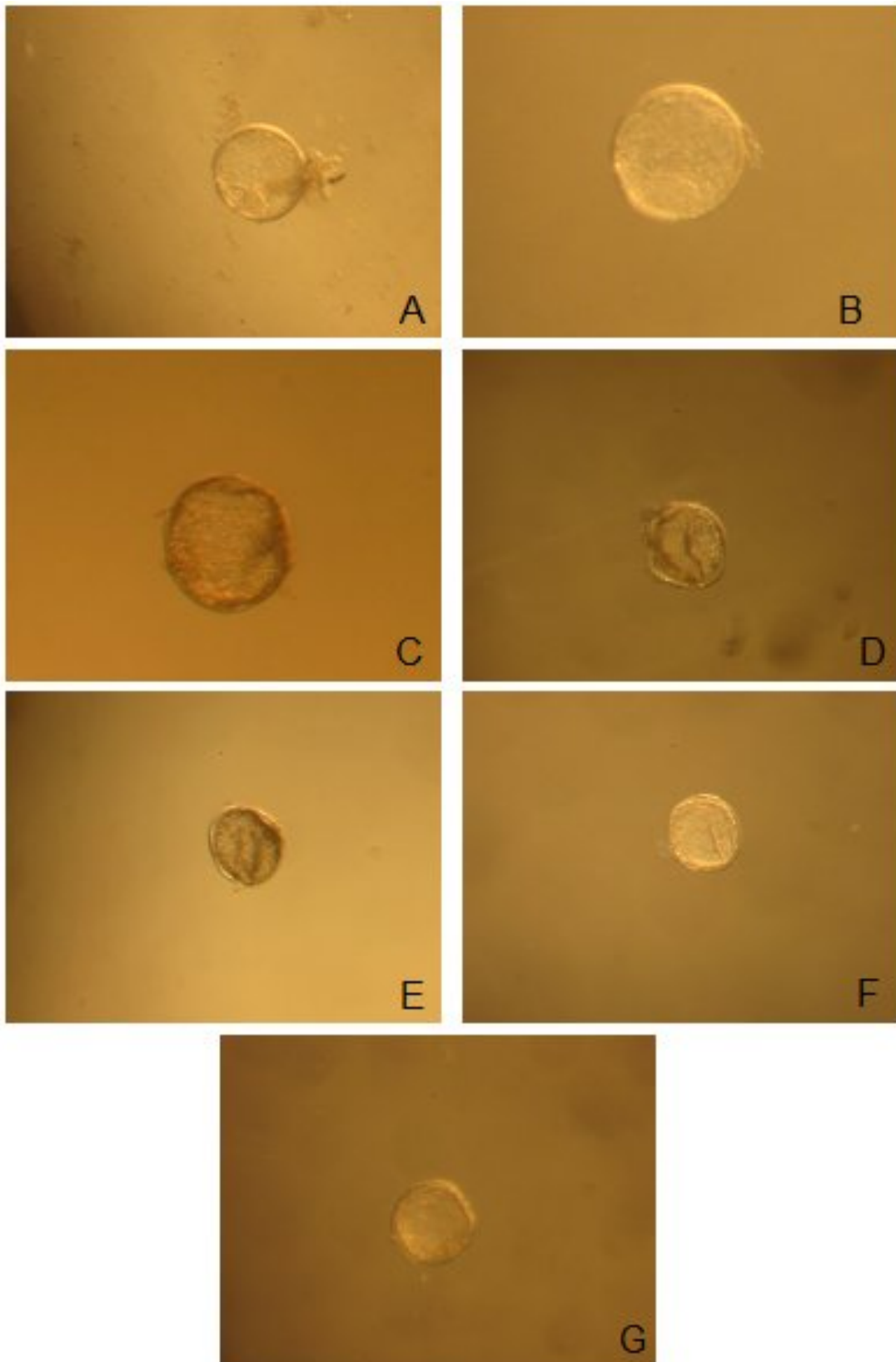


Figura 2: Blastocisto expandido mostrando mudanças na conformação desde o momento da coleta (A), durante a passagem pelas soluções de congelamento 1 (B), 2 (C) e 3(D) e de descongelamento 1(E), 2(F) e 3(G).

Moussa *et al.* (2003) encontraram diâmetro médio para embriões de éguas de sete dias o valor de  $394 \pm 44,1 \mu\text{m}$ , enquanto McKinnon & Squires (1988a,b) encontraram no quinto dia pós-ovulação, valores médios de  $160 \mu\text{m}$  para mórula,  $400 \mu\text{m}$  para blastocisto e, para blastocisto expandido, no oitavo dia,  $1000 \mu\text{m}$ , para embriões da mesma espécie. Poitras *et al.* (1994) encontraram para embriões de égua um tamanho médio de  $218,9 \pm 64,62 \mu\text{m}$  independente do estágio de desenvolvimento no dia 6,5 pós-ovulação. Após mensuração do diâmetro, observou-se que os embriões de jumentas de diferentes espécies de sete dias são menores que os coletados em éguas com o mesmo número de dias, como comprovado neste estudo com jumentas da raça Pêga ( $316,7 \mu\text{m}$ ) e por Vendramini (1997), trabalhando com embriões de jumentas da raça Baudet du Poitou ( $250 \mu\text{m}$ ). Mesmo trabalhando com embriões de oito dias de duas espécies de jumentas italianas, Pantasca e Ragusana, Camillo *et al.* (2010) encontraram valor médio de  $720 \mu\text{m}$ , menor que em égua ( $1000 \mu\text{m}$ ) (MCKINNON & SQUIRES, 1988a,b) e Vendramini (1997) encontrou valores ainda menores ( $348 \mu\text{m}$ ) que Camillo *et al.* (2010).

McKinnon *et al.* (1993) observaram que embriões eqüinos com seis dias podem estar em estádios de mórula compacta ou blastocisto inicial, e aos sete dias em estágio de blastocisto expandido. No presente estudo foi observado que embriões de sete dias (considerando o dia da ovulação como dia zero) também foram encontrados em estádios de blastocisto, e de blastocisto expandido na sua maioria. Com isso, pode-se afirmar que nas jumentas cada estágio do desenvolvimento embrionário tem uma determinada faixa de tempo após ovulação para ser encontrado, demonstrando haver diferença no tempo de migração do embrião desde a tuba uterina até o útero.

O presente estudo demonstrou que embriões de jumentas da raça Pêga coletados no oitavo dia pós-ovulação encontram-se em estádios de desenvolvimento semelhantes aos de éguas (MCKINNON & SQUIRES, 1988a,b; POITRAS *et al.*, 1994; MOUSSA *et al.*, 2003), e camelas (SKIDMORE *et al.*, 2009) avaliados no mesmo dia após ovulação. Quando comparados os diâmetros dos embriões de sete dias, sem se levar em consideração o estágio de desenvolvimento, observou-se que os da raça Pêga (média de  $316,7 \mu\text{m}$ ) e os da raça Baudet du Poitou (média de  $348 \mu\text{m}$ ) apresentaram diâmetros próximos aos encontrados em égua (média de  $400 \mu\text{m}$ ).

#### 5.4. Análise estrutural e ultra-estrutural dos embriões

Foram realizados cortes semi-finos em 11 dos 19 embriões processados para estudo. Nos cortes semi-finos observou-se que não houve preservação da estrutura do embrião, indicando não ter ocorrido penetração adequada da resina no interior do embrião (Figura 3). Os cortes ultra-finos dos mesmos embriões, ao serem avaliados em microscópio eletrônico de transmissão, mostraram mais uma vez que não houve penetração adequada da resina e que a espessura da cápsula influenciou na taxa de penetração da resina. Cortes onde a espessura da cápsula era maior, a taxa de penetração foi menor e, concomitantemente, não houve preservação celular, enquanto nos cortes onde a cápsula se mostrava mais delgada houve sinais de preservação celular (Figura 4).

Outro detalhe observado durante as análises microscópicas ultra-estruturais foi a ausência de embrião nos cortes encontrados, o que não condizia com a realidade, já que antes de serem feitos os cortes ultra-finos eram feitos os semi-finos para garantir presença de embrião em todos os cortes. Das poucas imagens obtidas em microscopia eletrônica, observou-se a presença de microvilosidades na porção externa das células do trofoblasto que iam em direção a cápsula no espaço perivitelínico (Figura 4). A cápsula recobre todo embrião e apresenta-se de forma circular com arranjo sob a forma de camadas sobrepostas (Figura 5). Outros autores também observaram a presença destas microvilosidades e o mesmo tipo de arranjo da cápsula (LANDIN e ALVARENGA, 1995; PERES *et al.* 2007).

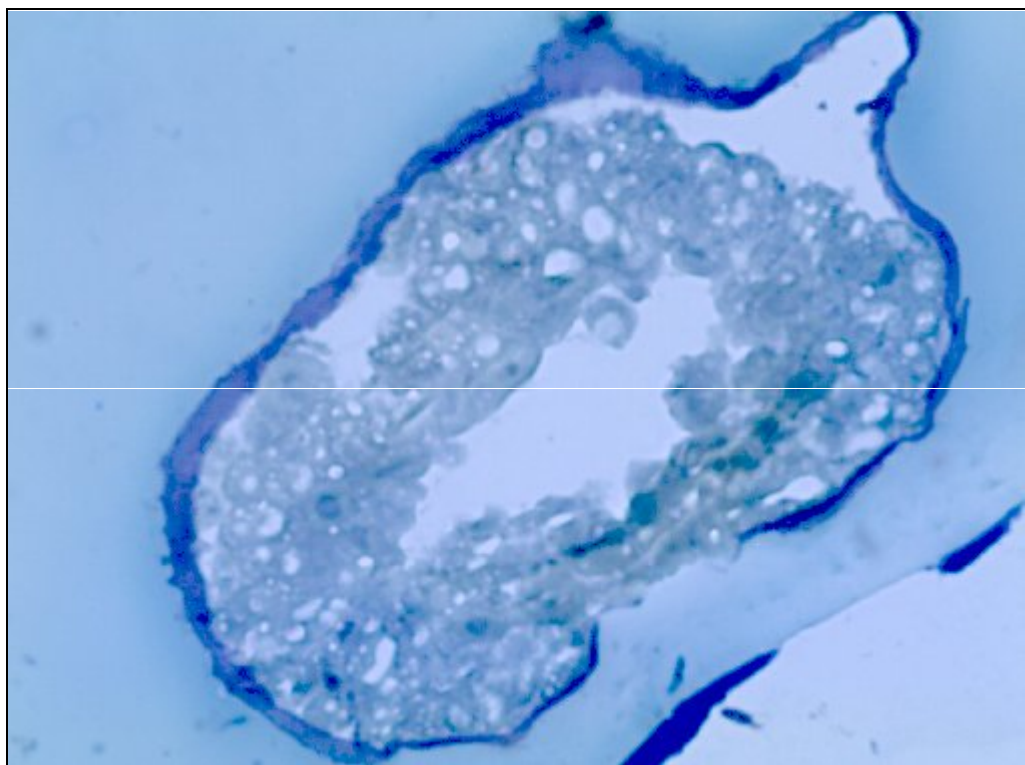
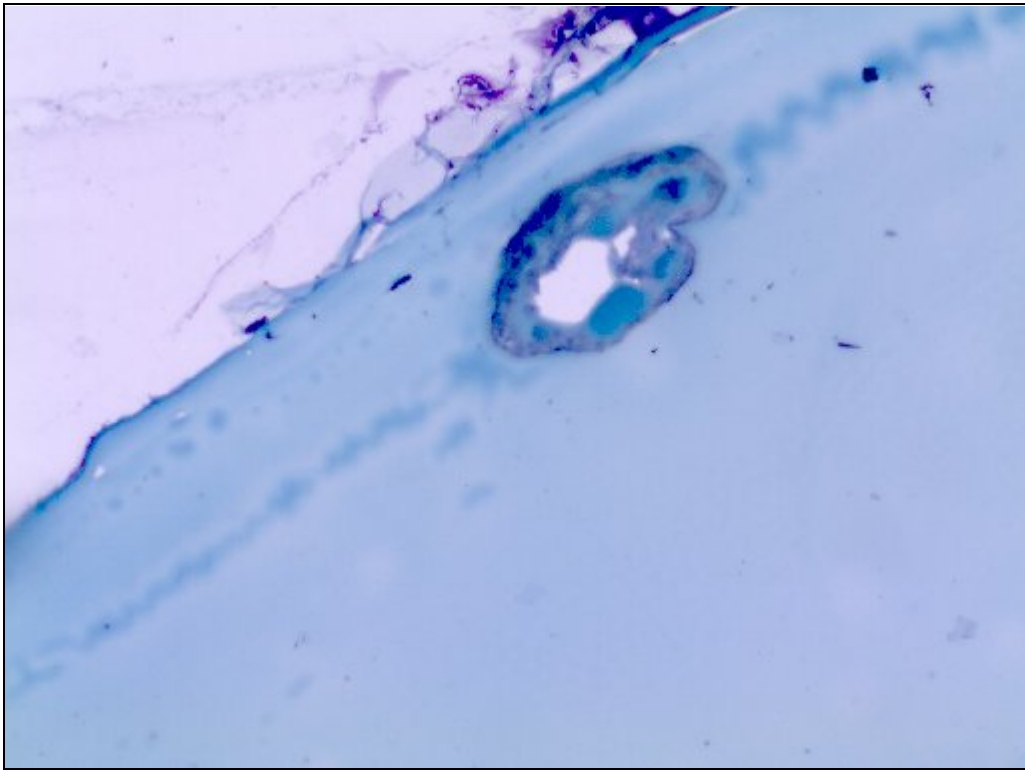


Figura 3: Blastocistos expandidos de jumentas Pêga em cortes semi-finos, corados com azul de toluidina indicando penetração inadequada da resina sem preservação da estrutura do embrião.



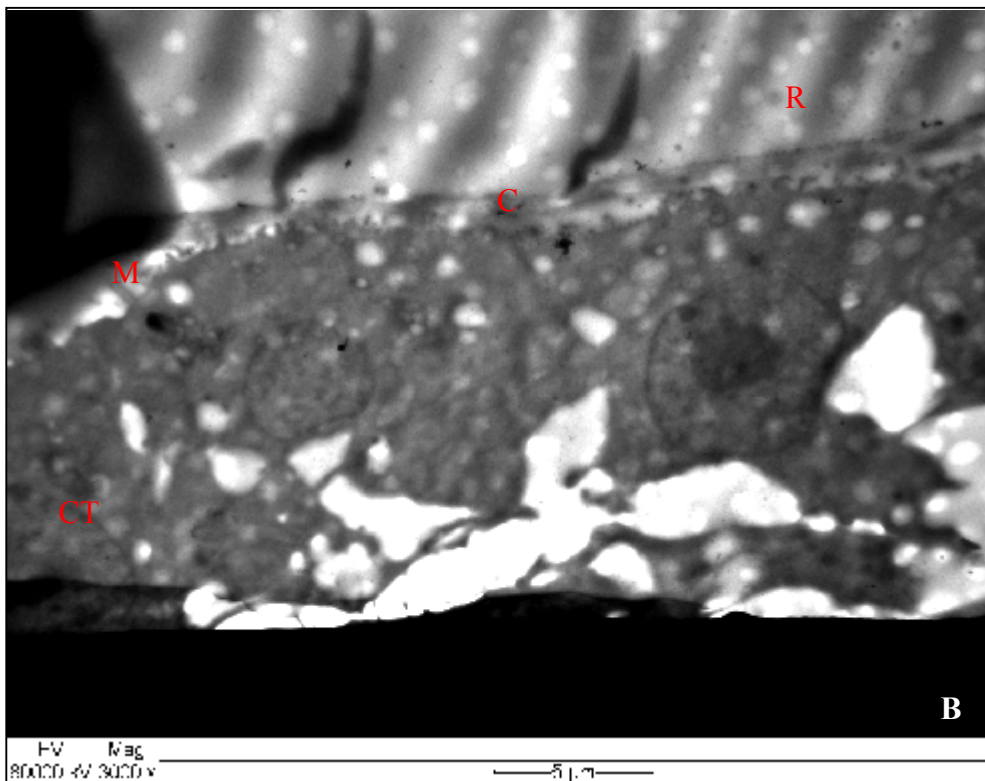
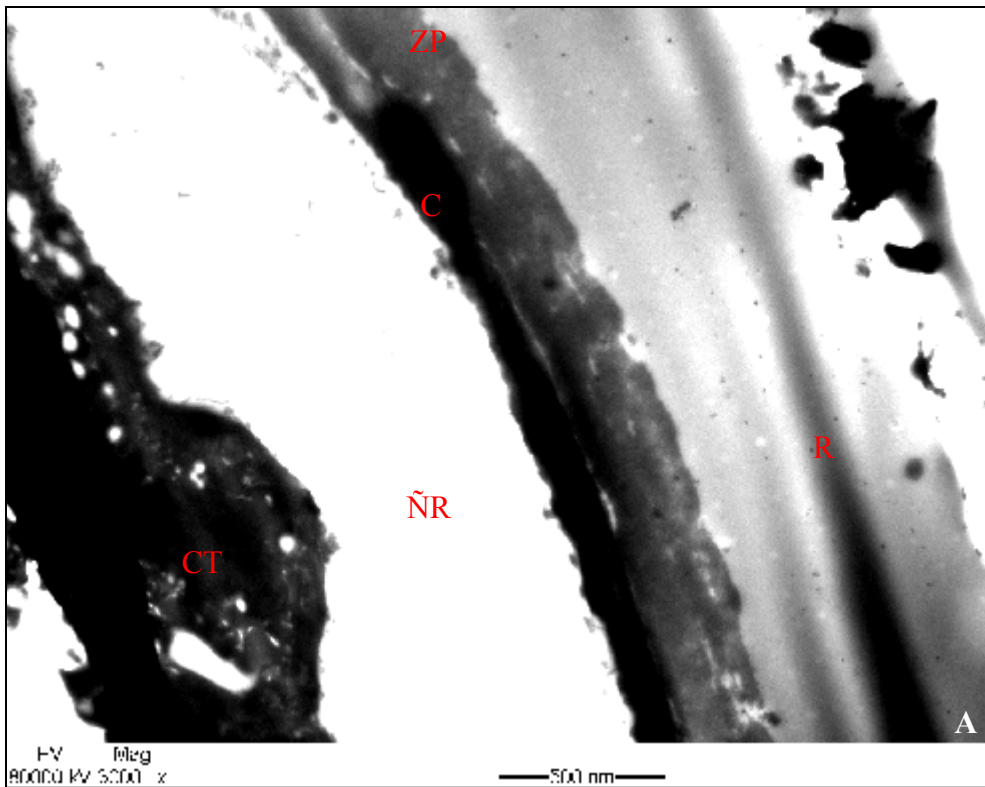


Figura 4: Eletromicrografia de embriões do grupo tratado, onde se observa resina (R), zona pelúcida (ZP), cápsula (C), células do trofoblasto (CT) e microvilosidades (M). Em A, cápsula mais espessa e células do trofoblasto não preservadas, além de não haver presença de resina no interior do embrião (ÑR). Em B, cápsula mais espessa e células do trofoblasto com características de melhor preservação. 3000X.

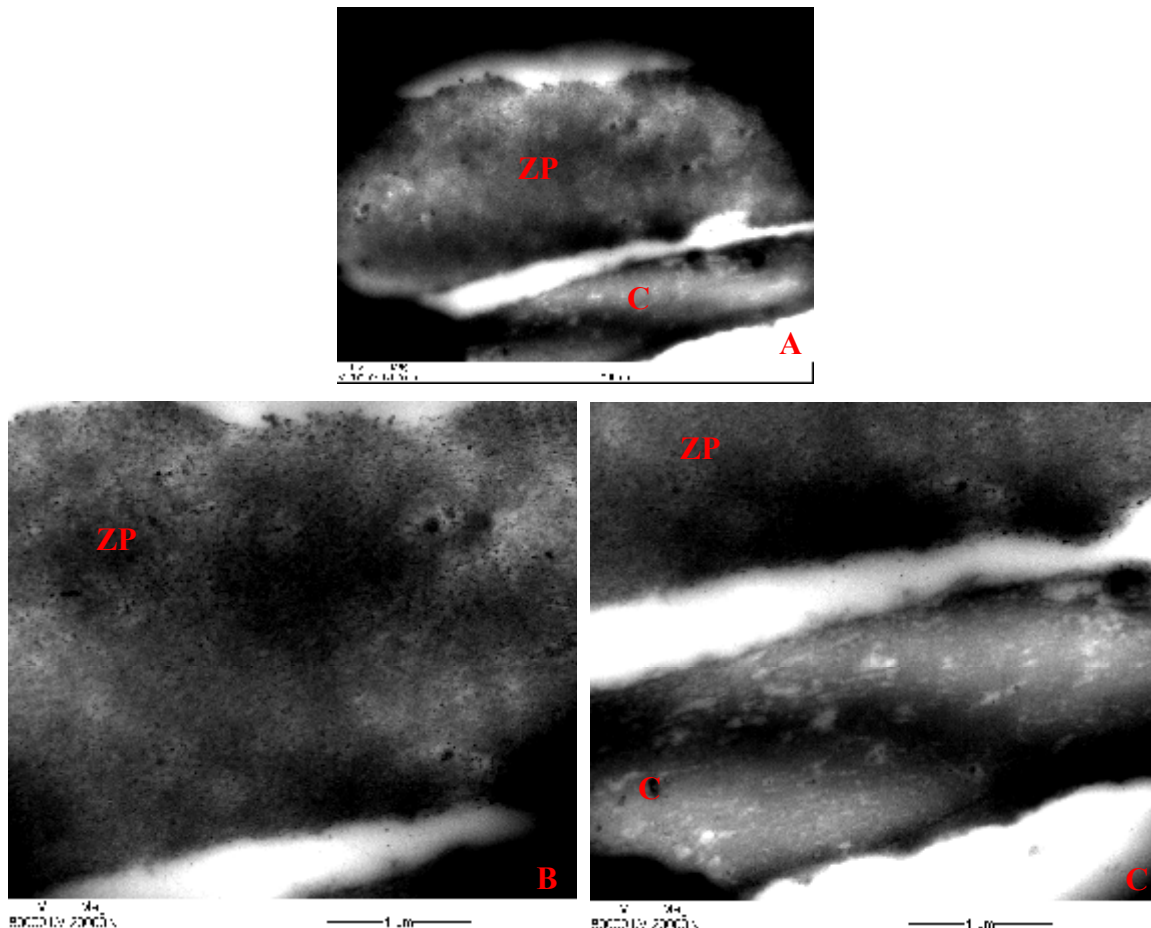


Figura 5: Eletromicrografia da cápsula (C) e da zona pelúcida (ZP) em aumento de 12000x (A). Em B, detalhes da zona pelúcida em aumento de 20000x, e em C detalhes da cápsula em 20000x, onde se pode observar que a mesma apresenta-se de forma circular com arranjo sob a forma de camadas sobrepostas.

A técnica de fixação usada no presente experimento utilizou um aldeído como fixador primário (glutaraldeído) e tetróxido de ósmio como fixador secundário, e foi a mesma utilizada para embriões de égua por outros pesquisadores (ENDERS *et al.*, 1988; BRUYAS *et al.*, 1993, 1995 e 2000; LANDIM e ALVARENGA, 1995; LEGRAND *et al.*, 2000; BATTUT *et al.*, 2000; PERES *et al.* 2007), e em todos eles a fixação se mostrou eficaz. Destes pesquisadores, quatro (BRUYAS *et al.*, 1993, 1995 e 2000; BATTUT *et al.*, 2000; LEGRAND *et al.*, 2000; PERES *et al.* 2007) usaram Epon 812 para infiltração como no presente estudo, e eles encontraram resultados satisfatórios em suas análises microscópicas. Os outros autores trabalharam com resina Epoxy Durcupan (ENDERS *et al.*, 1988) e Araldite 502 (LANDIM e

ALVARENGA, 1995) e também obtiveram bons resultados em suas análises microscópicas.

Como a cápsula interfere no efeito crioprotetor por interferir na entrada de glicerol nas células embrionárias (LEGRAND *et al.* 2000), a cápsula pode ter sido a responsável pela falta de preservação celular e também pela não penetração de resina no interior do embrião, situações encontradas no presente estudo. Este aspecto é um ponto que merece estudos para averiguar se a cápsula deste embrião impede a passagem das substâncias de forma mais acentuada que a cápsula do embrião eqüino, ou se a técnica utilizada deve ser adaptada para embriões de jumentas.

## **6. Conclusões**

- A avaliação da dinâmica folicular nas jumentas Pêga mostrou que a média do diâmetro máximo dos folículos pré-ovulatórios foi de 39,1mm (31 a 49mm), maior que outras raças asininas estudadas;
- A técnica de coleta desenvolvida no presente experimento é eficaz para jumentas Pêga;
- Os embriões coletados no oitavo dia após a ovulação apresentaram diâmetros menores que os encontrados em éguas;
- O diâmetro real do embrião deve ser mensurado imediatamente após a coleta, uma vez que o processamento para estudos morfológicos influenciou este parâmetro; e
- As técnicas de microscopias de luz e eletrônica de transmissão utilizadas em embriões eqüinos não funcionaram em embriões de jumentas.

## 7. Referências bibliográficas

- ALBIHN, A.; SAMPER, J.; ORIOL, J.G.; CORY, B.A.; BETTERIDGE K.J. Production of capsular material by equine trophoblast transplanted into immunodeficient mice. In: ***Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer***. Havemeyer Foundation Monograph Series n°3 2000; 3:60, Saari, Finlândia.
- ALLEN, W.R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. ***Journal of Reproduction and Fertility***. v.121, p.513-527, 2001.
- ALLEN, W.R.; ROWSON, L.E.A. Surgical and non surgical egg transfer in horses. ***Journal of Reproduction and Fertility, Supplement***. v.23, p.525-530,1975.
- ALVARENGA, M.A.; ALVARENGA, F.C.L.; MEIRA, C. Some modificaitons in the technique used to recover equine embryos. ***The Third International Symposium on Equine Embryo Transfer***. Buenos Aires, Argentina. 13, 1992.
- ANDRADE, L.S. ***Jumento & muares de sela. Criação e julgamento***. Aracaju: Info Graphic's, 1999; 13-21.
- BATTUT, I.; GRANCHAMP des RAUX, A.; NICAISE, J.L.; FIENI, F.; TAINTURIER, D.; BRUYAS, J.F. When do equine embryo enter the uterine cavity: an attempt to answer? In: ***Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer***. Havemeyer Foundation Monograph Series n°3 2000;3:62, Saari, Finlândia.
- BESSENT, C.; GINTHER, O.J. Comparison of early conceptus mobility between mares and jennies. ***Theriogenology***, v.29, n.4, p.913-920, 1988.
- BETTERIDGE, K.J.; EAGLESOME, M.D.; MITCHELL, D.; FLOOD, P.F.; BERIAULT, R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. ***Journal of Anatomy***,v.135, n.1, p.191-209, 1982.
- BETTERIDGE, K.J. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. ***Equine Veterinary Journal. Supplement***, v.8, p.92–100, 1989.

- BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; DUCHAMP, G.; Chronology of equine fertilization and embryonic development in vivo and in vitro. ***Equine Veterinary Journal. Supplement***, v.8, p. 105-110, 1989.
- BORWIC, R. ***Donkeys***. Cassell and Company Ltd. London, 1971 citado por FIELDING, D. Reproductive characteristics of the jenny donkey – *Equus asinus*: a review. ***Tropical Animal Health and Production***. v.20, p.161-166, 1988.
- BOUYSSOU, B.; CHUPIN, D. Two–step freezing of cattle blastocysts with dimethylsulfoxide (DMSO) or glycerol. ***Theriogenology***, v.17, n.2, p.159-166, 1982.
- BRUYAS, J-F.; BÉZARD, J.; LAGNEAUX, D.; PALMER, E. Quantitative analysis of morphological modifications of day 6.5 horse embryos after cryopreservation: differential effects on inner cell mass and trophoblast cells. ***Journal of Reproduction and Fertility***. v.99, p.15-23, 1993.
- BRUYAS, J.F.; BATTUT, I.; POL, J.M.; BOTREL, C.; FIÉNI, F.; TAINTURIER, D. Quantitative analysis of modifications of day 6,5 horse embryos after treatment with 4 cryoprotectants: differential effects on ICM and trophoblast cells. ***Biology of Reproduction. Monograph***. v1. p.329-339, 1995.
- BRUYAS (J.F.), ***Contribution à l'étude de la congélation des embryons équins: une approche métabolique et cellulaire***.Thèse de doctorat de l'ENSAR, Rennes,pp 216. Prix de thèse de l'AVEF 1998. 1997.
- BRUYAS, J-F.; SANSON, J.P.; BATTUT, I.; FIÉNI, F.; TAINTURIER, D. Comparison of the cryoprotectant properties of glycerol and ethylene glycol for early (day 6) equine embryos. ***Journal of Reproduction and Fertility. Supplement***, v.56, p. 549-560, 2000.
- CAMILLO, F.; PANZANI, D.; SCOLLO, C.; ROTA, A.; CRISCI, A.; VANNOZZI, I.; BALBO, S. Embryo recovery rate and recipients' pregnancy rate after nonsurgical embryo transfer in donkeys. ***Theriogenology*** (2010), doi:10.1016/j.theriogenology.2009.11.024
- COSTA, R.N. O jumento Pêga. . ***I Simpósio de Equideocultura***. p. 93-98, Viçosa-MG, 2007.
- CROSSETT, B.; SUIRE, S.; HERRLE, A.; ALLEN, W.R.; STEWART, F. Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing conceptus. ***Biology of Reproduction***, v.59, p.483-490, 1998.

- DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**, 2ª Edição, 663p. 1996.
- DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**. v.35, p.55-68, 1991.
- ELDSEN, R.P.; SEIDEL, G.E.Jr.; TAKEDA, T.; FARRAND, G.D. Field experiments with froze-thawed bovine embryos transferred nonsurgically. **Theriogenology**. v.17, n.1, p.1-10, 1982.
- ENCICLOPÉDIA VIVA. Jumento ou asno. Disponível em [www.klickeducacao.com.br/enciclo/encicloverb/0,5977,UNO-7242,00.html](http://www.klickeducacao.com.br/enciclo/encicloverb/0,5977,UNO-7242,00.html). Acesso agosto 2008.
- ENDERS, A.C.; LANTZ, K.C.; LIU, I.K.M.; SCHLAFKE, S. Loss of polar trophoblast during differentiation of the blastocyst of the horse. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.83, p-447-460, 1988.
- FAIR, T.; HULSHOF, S.C.J.; HYTTEL, P.; BOLAND, M.; GREVE, T. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. **Anatomy and Embryology**. v.195, p.327-336, 1997.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**. v.78, p.203-216, 2003.
- FIELDING, D. Reproductive characteristics of the jenny donkey – *Equus asinus*: a review. **Tropical Animal Health and Production**. v.20, p.161-166, 1988.
- FIENI, F. **Etude des consequences de l'utilisation des solvants organiques dans la cryoconservation de l'embryon caprin**, 1995. 155p. Tese de doutorado. L'Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, France.
- FLEURY, J.J.; PINTO, A.J.; MARQUES, A.; LIMA, C.G.; ARRUDA, R.P. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em eqüinos da raça Mangalarga. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.38, n.1, p.29-33, 2001.
- FLOOD, P.F.; JONG, A.; BETTERIDGE, K.J. The location of eggs retained in the oviducts of mares. **Journal of Reproduction and Fertility** v.57, p.291–294, 1979.
- FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**. v.78, p.135-163, 2003.

- FREEMAN, D.A.; WEBER, J.A.; GEARY, R.T.; WOODS, G.L. Time of embryo transport through the mare's oviduct. *Theriogenology*, v.36, p.823-830, 1991.
- FREEMAN, D.A.; WOODS, G.L.; VANDERWALL, D.K.; WEBWE, J.A. Embryo-initiated oviductal transport in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.95, p.535-538, 1992.
- GEISERT, R.D.; MALAYER, J.R. Implantação. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7ª Edição. Editora Manole, 2004, p. 127-140.
- GINTHER, O.J. Mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology*, v.19, p.603–611, 1983a.
- GINTHER, O.J. Fixation and orientation of the early equine conceptus. *Theriogenology*, v.19, p.613–623, 1983b.
- GINTHER O.J. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. *Equine Veterinary Journal Supplement* 3, p.41–47, 1985.
- GINTHER, O.J. *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects* (2nd ed). EquiServices, Cross Plains, WI, 1992; 299-300, 499-545.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, D.R.; BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science*. v.78, p.239-257, 2003.
- QUINTARD, D.; VENDRAMINI, O.M.; TAINTURIER, D. Quelques éléments de l'anatomie Du col de l'utérus chez l'ânesse «Baudet Du Poitou». *Reveu Médecine Vétérinaire*. v.147, n.8-9, p.599-606, 1996.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Ciclos reprodutivos. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7ª Edição. Editora Manole, 2004, p. 55-68(a).
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, Maturação ovocitária e Ovulação. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7ª Edição. Editora Manole, 2004, p. 69-82(b).
- HAMILTON, W.J.; DAY, F.T. Cleavage stages of the ova of the horse, with notes on ovulation. *Journal of Anatomy, Supplement*. v.79, p.127-130, 1945.
- HENRY, M.; FIGUEIREDO, A.E.F.; PALHARES, M.S.; CORYN, M. Clinical and endocrine aspects of the oestrus cycle in donkeys (*Equus asinus*). *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*. v.35, p.297-303, 1987.



- HERRLER, A.; PELL, J.M.; ALLEN, W.R.; BEIER, H.M.; STEWART, F. Horse conceptuses secrete insulin-like growth factor-binding protein 3. ***Biology of Reproduction***, v.62, p.1804-1811, 2000.
- IMEL, K.J.; SQUIRES, E.L.; ELSDEN, R.P.; SHIDELER, R.K. Collection and transfer of equine embryos. ***Journal of American Veterinary Medical Association***. v.179, p.987-991, 1981.
- KAINER, R.A. Reproductive organs of the mare. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. ***Equine Reproduction***, 1993.
- KENNEY R.M., BERGMAN R.V., COOPER W.L. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. ***Proceedings of the Annual Convention of the A.A.E.P.***, 21, p.327, 1975.
- LANDIM e ALVARENGA, F.C. ***Avaliação dos efeitos do congelamento e descongelamento sobre a viabilidade e morfologia de embriões eqüinos***. Tese de Doutorado. UNESP, Botucatu, SP, 1995.
- LEGRAND, E.; KRAWIECKI, J.M.; TAINURIER, D.; CORNIERE, P.; DELAJARRAUD, H.; BRUYAS, J-F. Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos? In: ***Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer. Havemeyer Foundation Monograph Series n°3 2000***;3:62, Saari, Finlândia.
- LEMMA, A.; SCHWARTZ, H.J.; BEKANA, M. Application of ultrasonography in the study of the reproductive system of tropical jennies (*Equus asinus*). ***Tropical Animal Health and Production***. v.38, p.267-274, 2006.
- LINDNER, G.M.; WRIGTH Jr., W. Bovine embryo morphology and evaluation. ***Theriogenology***, v.20 (4), p.407-416, 1983.
- MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Morphologic assessment of the equine embryo. ***Journal of American Veterinary Medical Association***. v.192, n.3, p.401-406, 1988a.
- MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Equine embryo transfer. ***Veterinary Clinics of North America: Equine Practice***. v.4, p.305-333, 1988b.
- MCKINNON, A.O. VOSS, J.L.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M. Diagnostic ultrasonography. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds). ***Equine Reproduction***. USA: Williams & Wilkins, 1993. p. 266-302.
- MEIRA C. ***Avaliação de duas técnicas de transferência não cirúrgica de embriões em éguas***. Tese de mestrado - Escola de Medicina

- Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 56p., 1990.
- 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.
- MORAES, N.L. **História e origem dos jumentos**. PROAGRI Revista virtual destinada a pequenos criadores, sítios e quintais. Informações agropecuárias. Jaboação, 2008. Disponível em: <http://www.oocities.com/asininos/>. Acesso em agosto de 2008.
- MOUSSA, M.; DUCHAMP, G.; MAHLA, R.; BRUYAS, J.-F.; DAELS, P.F. *In vitro* and *in vivo* comparison of Ham's F-10, Emcare holding solution and ViGro holding plus for the cooled storage of equine embryos. *Theriogenology*, v.59, p.1615-1625, 2003.
- NEGREIROS, J.E.G. **O jumento é nosso irmão**. Notícias do nordeste. Fortaleza, 2008. Disponível em: <[www.grupo.cairbar.nom.br/grupo/pagina-32-0308.htm](http://www.grupo.cairbar.nom.br/grupo/pagina-32-0308.htm)> Acesso em 02 agosto 2008.
- NISHIKAWA, Y.; YAMAZAKI, Y. Studies on reproduction in asses. II. Growth of follicles in ovaries and ovulation. *Japan Journal Zootechnical Science*. v.20, p.29-32, 1949, citado por TRIMECHE, A.; TAINURIER, D. Étude échographique de la cinétique folliculaire des baudettes du Poitou pendant l'oestrus au tours du printemps et de l'été. *Revue Médecine Vétérinaire*. v.146, n.11, p.743-7748, 1995.
- OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical recovery of equine eggs and an attempt a non-surgical egg transfer in horses. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.31, p.187-95, 1972.
- ORIOU, J.G.; BETTERIDGE, K.J.; HARDY, J.; SHAROM, F.J. Structural and developmental relationship between capsular glycoproteins of the horse (*Equus caballus*) and the donkey (*Equus asinus*). *Equine Veterinary Journal. Supplement*, 15, p.14 – 18, 1993a.
- ORIOU, J.G.; SHAROM, F.J.; BETTERIDGE, K.J. Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.9, p.653-664, 1993b.
- PERES, K.R.; FERNANDES, C.B.; ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Análise da viabilidade e da ultra-estrutura de embriões

- obtidos de éguas superovuladas. **Veterinária e Zootecnia**. v.14, n.1, p.52-61, 2007.
- POITRAS, P.; GUAY, P.; VAILLANCOURT, D.; ZIDANE, N.; BIGRAS-POULIN, M. *In vitro* viability of cryopreserved equine embryos following different freezing protocols. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v.58, p.235-241, 1994.
- PUGH, D.G. Donkey Reproduction. **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of the Equine Practitioners**, vol. 48, p. 113-114, 2002.
- RAVENEAU, A. **Le livre de l'âne**. Jacky Daveze, Rustica editions, Paris, 1994.
- RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**. v 24, p.77-92, 1983.
- ROSSEL, S.; MARSHALL, F.; PETERS, J.; PILGRAM, T.; ADAMS, M.D.; O'CONNOR, D. Domestication of the donkey: timing, processes, and indicators. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA; v.105, p.3715–20, 2008.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265p.
- SCHNEIDER, U.; MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**. v.21, n.1, p.68-79, 1984.
- SERTICH, P.L. Ultrasonography of the Genital Tract of the Mare. In. REEF, V.B. **Equine Diagnostic Ultrasound**, 1998.
- SILVA, L.A. **Técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina para transferência de embriões em eqüinos**. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 145p., 2003.
- SAEG - Sistema** de análise estatística e genética, UFV, Central de processamento de dados, Viçosa- M.G., 1999.
- SKIDMORE, J.A.; SCHOEVERS, E.; STOUT, T.A. Effect of different methods of cryopreservation on the cytoskeletal integrity of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) embryos. **Animal Reproduction Science**, v.113, p.196–204, 2009.

- SLADE, N.P.; TAKEDA, T.; SQUIERS, E.L.; ELSDEN, R.P.; SEIDEL, G.E.Jr. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. ***Theriogenology***. v.24, n.1, p.45-48, 1985.
- SPENCER, T. E.; BAZER, F.W. Conceptus signal for establishment and maintenance of pregnancy. ***Reproductive Biology and Endocrinology***, v.2, p.49, 2004.
- SQUIRES, E.L. Embryo transfer. In: McKINNON A.O., VOSS J.L.. ***Equine reproduction***. Lea & Febiger, USA, 1992. cap. 41, p.357-367.
- SQUIRES E.L., IMEL K.J., IULIANO M.F. et al. Factors affecting reproductive efficiency in an equine embryo transfer program. ***Journal of Reproduction and Fertility. Supplement***. v.32, p.409-414, 1982.
- SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L.; SHIDELER, R.K. Equine embryo transfer update. ***Proceedings 13th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners***. p.357-363, 1984.
- SQUIRES E.L., COOK V.M., VOSS J.L. Collection and transfer of equine embryo. ***Animal Reproduction Laboratory Bulletin***, n°1, Colorado State University, p.16-19, 1985.
- SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E.Jr. Collection and transfer of equine embryos. ***Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin N° 11***. Fort Collins, Colorado State University, 32p, 1995.
- STOUT, T.A.E.; MEADOWS, S.; ALLEN, W.R. The stage specific formation of equine blastocyst capsule is essential for establishment of pregnancy. ***Havemeyer workshop on Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare***. Puerto Plata, República Dominicana. Abstract, 1997.
- SVENDSEN, E.D.; ALUJA, A.S; VILLALOBOS, A.N.M. ***El cuidado del burro***. Universidad Nacional Autonoma de México, 1989; 3-11.
- TREMOLEDA, J.L.; GALLI, C.; LAZZARI, G.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B.; STOUT, A.E. Equine blastocyst capsule formation in vivo and in vitro. In: ***Proceedings of a workshop on Embryonic and fetal nutrition***. Havemeyer Foundation Monograph Series n°10 2003;2:23, Ravello, Italia.
- TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D. Étude échographique de la cinétique folliculaire des baudettes du Poitou pendant l'oestrus au tours du printemos ett de l'été. ***Revue Médecine Vétérinaire***. v.146, n.11, p.743-7748, 1995.

- VAN NIEKERK, C.H. The early diagnosis of pregnancy, the development of foetal membranes and nidation in the mare. **Journal of the South African Veterinary Medicine Association**, v.36, p. 483–488, 1965.
- VAN NIEKERK C.H.; GERNEKE, W.H. Persistence and parthenogenetic cleavage of tubal ova in the mare. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. v.33, p.195-232, 1966.
- VANDEPLASSCHE, G.M.; WESSON, J.A.; GINTHER, O.J. Behavioral, follicular and gonadotropin changes during the estrous cycle in donkeys. *Theriogenology*. v.16, n.2, p.239-49, 1981.
- VANDERWALL, D.K. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. v.12, p.61-83, 1996.
- VENDRAMINI, O.M. *Contribution a la sauvegarde du Baudet du Poitou par la mise au point d'une technique de transfert d'embryon*. Tese de doutorado. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, 217p, 1997.
- VENDRAMINI, O.M.; GUINTARD, C.; MOREAU, J.; TAINURIER, D. Cervix conformation: a first anatomical approach in Baudet Du Poitou jenny asses. *Animal Science*. v.66, p.741-744, 1998.
- VOGELSANG S.G., SORENSEN A.M. POTTER G.D. Fertility of donor mares following non-surgical collection of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 27, p.383-6, 1979.
- WEBER, J.A.; FREEMAN, D.A.; VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L. Prostaglandin E2 Secretion by Oviductal Transport-Stage Equine Embryos. *Biology of Reproduction*, v.45, p.540-543, 1991.
- WILLADSEN, S.; POLGUE, L.; ROWSON, L.E.A. In Vitro storage of cattle embryos in control of reproduction in the cow. *European Economic Community Commission*. p.427-428, 1978.

## 8. ANEXOS

8.1. Valores dos maiores diâmetros foliculares (mm) até o dia que antecedeu a ovulação.

Dias	-6	-5	-4	-3	-2	-1
	26	27	30	31	33	31*
			26	28*	30*	33
	27	30	35	36	35	38
	23	27	27	31	35	35
		31	31	35	35	37
	22	25	28	29	36	37
	27	30	32	37	39	43
	26	28	35	38	38	38
				31	40	42
		30	33	45 <sup>#</sup>	39	42
	25	28	28	32	37	41
	21	30	39 <sup>#</sup>	38	38	40
	28	30	31	41	46 <sup>#</sup>	49 <sup>#</sup>
	29 <sup>#</sup>	30	35	33	34	33
	29 <sup>#</sup>	25	31	32	36	43
	24	28	29	35	35	38
	24	24	26	35	32	32
		25	33	37	40	45
	22	22*	25*	30	36	39
	27	29	31	38	35	40
	29 <sup>#</sup>	31	31	34	37	38
	20*	23	27	33	36	37
	20*	25	28	32	32	35
	25	27	30	35	38	40
	31	34 <sup>#</sup>	33	41	45	45
	23	29	32	32	35	44
	29 <sup>#</sup>	30	33	33	37	42
Médias	25,32 ±3,20	27,92 ±2,89	30,73 ±3,34	34,52 ±3,96	36,63 ±3,52	39,15 ±4,37

\*Menores valores <sup>#</sup> Maiores valores

8.2. Valores dos maiores diâmetros foliculares (mm) até o dia que antecedeu a ovulação por jumentas.

8.2.1. Jumenta 1

Dias	-6	-5	-4	-3	-2	-1
	26	27	30	31	33	31
			26	28	30	33
	27	30	35	36	35	38
	23	27	27	31	35	35
		31	31	35	35	37
	22	25	28	29	36	37
	27	30	32	37	39	43
	26	28	35	38	38	38
Médias	25,17 ±2,14	28,29 ±2,14	30,5 ±3,42	33,13 ±3,83	35,13 ±2,80	36,5 ±3,63

8.2.2. Jumenta 2

Dias	-6	-5	-4	-3	-2	-1
				31	40	42
		30	33	45	39	42
	25	28	28	32	37	41
	21	30	39	38	38	40
	28	30	31	41	46	49
	29	30	35	33	34	33
	29	25	31	32	36	43
	24	28	29	35	35	38
	24	24	26	35	32	32
		25	33	37	40	45
	22	22	25	30	36	39
Médias	25,25 ±3,11	27,20 ±2,97	31,00 ±4,24	35,36 ±4,59	37,55 ±3,75	40,36 ±4,90

8.2.3. Jumenta 3

Dias	-6	-5	-4	-3	-2	-1
	27	29	31	38	35	40
	29	31	31	34	37	38
	20	23	27	33	36	37
	20	25	28	32	32	35
	25	27	30	35	38	40
	31	34	33	41	45	45
	23	29	32	32	35	44
	29	30	33	33	37	42
Médias	25,5 ±4,21	28,5 ±3,46	30,63 ±2,20	34,75 ±3,20	36,88 ±3,76	40,13 ±3,44

8.3. Valores dos menores diâmetros foliculares (mm) até o dia que antecedeu a ovulação.

Dias	-6	-5	-4	-3	-2	-1
	24	25	30	31	31	31
			22	27	27*	32
	24	23	24	27	31	32
	22	24	24	30	32	35
		27	27	29	35	35
	18	17*	26	27	27*	30*
	21	26	30	34	34	36
	25 <sup>#</sup>	27	33 <sup>#</sup>	37	37	37
				29	37	40
		30 <sup>#</sup>	32	35	38	41
	10*	26	26	28	37	35
	21	26	33 <sup>#</sup>	35	37	39
	20	25	30	38 <sup>#</sup>	42 <sup>#</sup>	45 <sup>#</sup>
	25 <sup>#</sup>	27	27	23*	30	33
	22	24	28	31	36	33
	22	26	27	34	32	33
	20	20	24	27	30	31
		25	30	33	33	37
	13	17*	21*	27	33	36
	22	24	29	31	35	40
	23	28	30	31	34	30*
	20	23	25	31	31	32
	15	22	24	30	31	35
	23	25	26	30	33	35
	24	27	31	37	40	45 <sup>#</sup>
	22	24	27	30	34	35
	25	27	32	32	37	41
Médias	20,95 ±3,91	24,60 ±3,08	27,62 ±3,36	30,89 ±3,62	33,85 ±3,63	35,70 ±4,19

\*Menores valores # Maiores valores



8.4. Valores dos menores diâmetros foliculares (mm) até o dia que antecedeu a ovulação por jumentas.

8.4.1. Jumenta 1

Dias	-6	-5	-4	-3	-2	-1
	24	25	30	31	31	31
			22	27	27	32
	24	23	24	27	31	32
	22	24	24	30	32	35
		27	27	29	35	35
	18	17	26	27	27	30
	21	26	30	34	34	36
	25	27	33	37	37	37
Médias	22,33 ±2,58	24,14 ±3,48	27 ±3,74	30,25 ±3,65	31,75 ±3,58	33,5 ±2,56

8.4.2. Jumenta 2

Dias	-6	-5	-4	-3	-2	-1
				29	37	40
		30	32	35	38	41
	10	26	26	28	37	35
	21	26	33	35	37	39
	20	25	30	38	42	45
	25	27	27	23	30	33
	22	24	28	31	36	33
	22	26	27	34	32	33
	20	20	24	27	30	31
		25	30	33	33	37
	13	17	21	27	33	36
Médias	19,13 ±5,03	24,60 ±3,66	27,80 ±3,65	30,91 ±4,50	35,00 ±3,71	36,64 ±4,25

8.4.3. Jumenta 3

Dias	-6	-5	-4	-3	-2	-1
	22	24	29	31	35	40
	23	28	30	31	34	30
	20	23	25	31	31	32
	15	22	24	30	31	35
	23	25	26	30	33	35
	24	27	31	37	40	45
	22	24	27	30	34	35
	25	27	32	32	37	41
Médias	21,75 ±3,11	25,00 ±2,14	28,00 ±2,93	31,50 ±2,33	34,38 ±3,02	36,63 ±4,98

8.5. Valores médios entre os diâmetros foliculares maiores e menores (mm) até o dia antes da ovulação.

Dias	-6	-5	-4	-3	-2	-1
	25	26	30	31	32	31*
			24	27,5*	28,5*	32,5
	25,5	26,5	29,5	31,5	33	35
	22,5	25,5	25,5	30,5	33,5	35
		29	29	32	35	36
	20	21	27	28	31,5	33,5
	24	28	31	35,5	36,5	39,5
	25,5	27,5	34	37,5	37,5	37,5
				30	38,5	41
		30	32,5	40 <sup>#</sup>	38,5	41,5
	17,5*	27	27	30	37	38
	21	28	36 <sup>#</sup>	36,5	37,5	39,5
	24	27,5	30,5	39,5	44 <sup>#</sup>	47 <sup>#</sup>
	27	28,5	31	28	32	33
	25,5	24,5	29,5	31,5	36	38
	23	27	28	34,5	33,5	35,5
	22	22	25	31	31	31,5
		25	31,5	35	36,5	41
	17,5*	19,5*	23*	28,5	34,5	37,5
	24,5	26,5	30	34,5	35	40
	26	29,5	30,5	32,5	35,5	34
	20	23	26	32	33,5	34,5
	17,5*	23,5	26	31	31,5	35
	24	26	28	32,5	35,5	37,5
	27,5 <sup>#</sup>	30,5 <sup>#</sup>	32	39	42,5	45
	22,5	26,5	29,5	31	34,5	39,5
	27	28,5	32,5	32,5	37	41,5
Médias	23,14	26,26	29,17	32,70	35,24	37,43
	±3,11	±2,78	±3,13	±3,51	±3,39	±3,96

\*Menores valores # Maiores valores

8.6. Valores médios entre os diâmetros foliculares maiores e menores (mm) até o dia antes da ovulação por jumentas.

8.6.1. Jumenta 1

Dias	-6	-5	-4	-3	-2	-1
	25	26	30	31	32	31
			24	27,5	28,5	32,5
	25,5	26,5	29,5	31,5	33	35
	22,5	25,5	25,5	30,5	33,5	35
		29	29	32	35	36
	20	21	27	28	31,5	33,5
	24	28	31	35,5	36,5	39,5
	25,5	27,5	34	37,5	37,5	37,5
Médias	23,75	26,21	28,75	31,69	33,44	35
	±2,16	±2,60	±3,18	±3,41	±2,90	±2,73

8.6.2. Jumenta 2

Dias	-6	-5	-4	-3	-2	-1
				30	38,5	41
		30	32,5	40	38,5	41,5
	17,5	27	27	30	37	38
	21	28	36	36,5	37,5	39,5
	24	27,5	30,5	39,5	44	47
	27	28,5	31	28	32	33
	25,5	24,5	29,5	31,5	36	38
	23	27	28	34,5	33,5	35,5
	22	22	25	31	31	31,5
		25	31,5	35	36,5	41
	17,5	19,5	23	28,5	34,5	37,5
Médias	22,19	25,90	29,40	33,14	36,27	38,50
	±3,45	±3,20	±3,79	±4,23	±3,59	±4,30

8.6.3. Jumenta 3

Dias	-6	-5	-4	-3	-2	-1
	24,5	26,5	30	34,5	35	40
	26	29,5	30,5	32,5	35,5	34
	20	23	26	32	33,5	34,5
	17,5	23,5	26	31	31,5	35
	24	26	28	32,5	35,5	37,5
	27,5	30,5	32	39	42,5	45
	22,5	26,5	29,5	31	34,5	39,5
	27	28,5	32,5	32,5	37	41,5