

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

VINICIUS MOTTA FERREIRA

**ESTUDO PROSPECTIVO DA TÉCNICA DE PUNÇÃO VIA
ORIFÍCIOS NATURAIS PARA A COLETA DE LÍQUIDO
VITELÍNICO OU ALANTOIDEANO DO CONCEPTO EQUINO**

Campos dos Goytacazes

2012

VINICIUS MOTTA FERREIRA

**ESTUDO PROSPECTIVO DA TÉCNICA DE PUNÇÃO VIA
ORIFÍCIOS NATURAIS PARA A COLETA DE LÍQUIDO
VITELÍNICO OU ALANTOIDEANO DO CONCEPTO EQUINO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como exigência para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na Área de concentração em Biotecnologia da Reprodução.

Orientador: Prof. Dr. José Frederico Straggiotti Silva

Campos dos Goytacazes

2012

VINICIUS MOTTA FERREIRA

**ESTUDO PROSPECTIVO DA TÉCNICA DE PUNÇÃO VIA
ORIFÍCIOS NATURAIS PARA A COLETA DE LÍQUIDO
VITELÍNICO OU ALANTOIDEANO DO CONCEPTO EQUINO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como exigência para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na Área de concentração em Biotecnologia da Reprodução.

Apresentado em 16 de fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Lacerda de Abreu Oliveira (LCCA/ CCTA)

Prof. Dr. Bruno Fagundes (UNIG/ Itaperuna)

Prof. Dr. Eduardo Shimoda (Cândido Mendes/ Campos dos Goytacazes)

Prof. Dr. José Frederico Straggiotti Silva (LRMGA/ CCTA)

(Orientador)

RESUMO

A equinocultura nacional está em constante crescimento, assim como a comercialização de embriões, surgindo a necessidade de comprovação do sexo destes. As técnicas em uso são realizadas através da ultrassonografia analisando o posicionamento do tubérculo genital (Curran; Ginther, 1989) ou visualização da gônada e da genitália externa do feto (Holder, 2000). No entanto, existem limitações que são: posicionamento ideal do feto e acurácia da técnica. A fim de aprimorar a sexagem de embriões equinos, surge uma nova possibilidade, através da técnica de punção, por via transvaginal, de amostras de material genético, embrionário e fetal, destinados à sexagem molecular. Foram realizadas 64 punções, sendo coletadas 29 amostras de líquido vitelínico e/ou alantóide e ocorreram 5 abortos. Destas amostras 4 foram processadas: extraiu-se o DNA, após realizou-se a amplificação simultânea do gene SRY e dos genes da amelogenina x e y pelo método da QF-PCR e em seguida eletroforese capilar dos produtos da amplificação, verificando-se a presença de dois machos (dias 21 e 30) e duas fêmeas (3 meses e 6 meses). Destarte, é possível realizar a punção de conceptos equinos, porém são necessários mais estudos e o aprimoramento da técnica de punção via fundo de saco vaginal.

Palavras-chave: concepto, equino, punção, sexagem molecular.

ABSTRACT

The national equine breeding is growing up as the embryo commercialization. That's why the sex determination of these embryos is required. The ultrasound techniques are used: genital tubercle positioning (Curran, Ginther, 1989) and viewing the gonads and external genitalia of the fetus (Holder, 2000). However, there are limitations in these techniques, as the position of fetus and experience of visual accuracy. By the way, there is a new possibility, genetical sex determination using conceptus DNA samples obtained from ultrasound guide transvaginal puncture. Was 64 punctures, enabling 29 vitelline and allantoic samples, causing 5 conceptuses loss. 4 samples were processed: DNA extraction, SRY and amelogenin genes simultaneous QF-PCR amplification, next capillary electrophoresis. Was observed 2 males (21 and 30 Day) and 2 females (3 and 6 months). Thus, we conclude that the technique is possible to be realized and that are necessary more studies about the ultrasound guide transvaginal puncture technique.

Keywords: conceptus, equine, puncture, molecular sexing.

SUMÁRIO

1- Introdução	8
2-Revisão de literatura	9
2.1- Equinocultura	9
2.2- Embriologia equina	9
2.3- Perda de prenhez	11
2.4- Métodos de sexagem	12
2.4.1- Ultrassonografia	13
2.4.2- Sexagem molecular por PCR	14
2.5- Genotipagem	15
2.6- Amniocentese	16
2.6.1- Amniocentese em humanos	16
2.6.2- Amniocentese em bovinos	16
3- Material e métodos	18
3.1- Materiais	18
3.1.1-Teste do Protótipo e do Aparelho de punção	18
3.1.2- Aparelho de punção	19
3.2- Método	20
3.2.1- Técnica de coleta de amostra de DNA embrionário ou fetal	20
3.2.2- Período de punção	22
3.2.3- Coleta de amostra de DNA materno	22
3.3- Processamento das amostras	22
3.3.1- Extração do DNA	22
3.3.2- QF-PCR	22
3.3.2.1- Sexagem	22

3.3.2.2- Genotipagem	23
3.3.2.3- Eletroforese em capilar	23
3.3.2.4- Identificação e caracterização dos perfis alélicos	24
3.4 Análises estatísticas	24
4- Resultados e discussão	26
4.1- Eficácia da coleta.	26
4.2- A técnica.	26
4.2.1- Ajustes metodológicos.	26
4.2.2- Conceptos puncionados mais de uma vez e em dias diferentes	27
4.2.3- Abortos e absorções	28
4.4- Sexagem genética	33
4.4.1- Análise do perfil alélico da amplificação de Amelogenina e SRY	34
4.5- Genotipagem	36
5- Conclusão	39
6- Referências bibliográficas	40
Apêndice A	44

1- Introdução

A equinocultura nacional está em constante crescimento, e ocupa uma posição de destaque no agronegócio brasileiro (Carmo *et al.*, 2007). A comercialização de embriões é responsável pela movimentação de maiores cifras em leilões. O fato de os embriões possuírem a comprovação do sexo agrega maior valor à comercialização destes, além de facilitar e dar mais garantias às transações comerciais.

A determinação do sexo do embrião é de grande importância e vem sendo aprimorada ao longo dos tempos, principalmente em bovinos, devido à sua maior adequação às técnicas e metodologias existentes. No entanto, em equinos, as técnicas não são tão precisas, além de só poderem ser realizadas em curtos períodos durante a gestação. Em humanos, assim como em bovinos (Kamimura, S. *et al.*, 1996), a amniocentese é realizada com sucesso, visto que as amostras obtidas possibilitam a realização da genotipagem e sexagem dos fetos com precisão (Nazareth *et al.*, 1981).

Para que seja realizada a sexagem e genotipagem de embriões equinos, *in vivo*, de maneira segura, baseadas nas técnicas existentes em humanos e bovinos, faz-se necessário o desenvolvimento de uma técnica de obtenção de amostras de DNA genômico que seja segura para mãe e o concepto.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica de punção, por via transvaginal, de líquido vitelínico (ocorre até o dia 30 da fase embrionária) e/ou líquido alantoide de embriões e fetos, para obtenção de amostras de material genético destinado à sexagem molecular e determinação do período mais indicado à realização da punção, tornando-a uma técnica segura e eficiente.

2-Revisão de literatura

2.1- Equinocultura

O cenário atual da equinocultura nacional demonstra um crescimento no segmento empresarial e cultural da indústria do cavalo e significativos avanços no setor de biotecnologias, o que incentiva os investidores e criadores a procurar novas ferramentas que otimizem sua produção e negócios (Carmo *et al.*, 2007).

A predeterminação do sexo de animais de criação tem várias aplicações e interesses comerciais (Peippo *et al.*, 1995).

2.2- Embriologia equina

O reconhecimento materno da gestação nos equinos se dá de maneira exclusiva (Allen, 2000). Nesse processo incomum ocorre uma mobilidade do concepto no útero, do dia 0 (dia da ovulação) até o dia 16 ou 17 após a ovulação, quando ocorre um rápido aumento no diâmetro do embrião e um súbito espasmo que aumenta o tônus miometrial e fixa o concepto no eventual local de implantação, levando a uma supressão na liberação cíclica de PGF2 pelo endométrio, permitindo a luteostase necessária para a produção de progesterona e manutenção da gestação (Ginther, 1983; Sharp, 2000; Stout e Allen, 2001).

A placenta da égua é classificada como epiteliocorial, difusa, microcotiledonária e adeciduada (Abd-Elnaeim *et al.*, 2006). Na égua, a aderência placentária ocorre somente por volta dos dias 24 a 40 (Hafez e Hafez, 2004). Este tipo de placentação é não invasivo e produz uma mínima resposta celular materna (Ginther, 1992; Gerstenberg *et al.*, 1999). A placenta equina é classificada como epiteliocorial, uma vez que o epitélio uterino está em contato com a camada do córion, apresentando, portanto, seis camadas de

tecido entre os capilares materno e fetal (endotélio, tecido conjuntivo e epitélio), por isso, nesta espécie não ocorre a passagem de imunoglobulinas da mãe para o feto, sendo a administração do colostro muito importante para a imunidade do potro. A classificação difusa se deve ao fato de que a vilosidade do córion está distribuída uniformemente sobre toda a superfície de tecido materno, formando pequenos agrupamentos dos vilos aparentando microcotilédones (Allen *et al.*,2002a). A característica adecuada da placenta se deve ao fato de não ocorrer perda de tecido materno durante o parto (Ginther, 1992; Gerstenberg *et al.*,1999).

O saco alantoide preenchido com fluido é frequentemente bem definido na imagem ultrassonográfica como uma área não ecogênica (preta) em torno do embrião, que fica localizado no polo ventral e pode ser visualizado a partir do dia 21. O saco vitelino e o saco alantóideo são separados por uma linha ecogênica (branca) que representa as paredes sobrepostas dos dois sacos placentários. O embrião tem a forma de um nódulo ecogênico (branco) na linha de separação. Os batimentos cardíacos (aproximadamente 150 batimentos por minuto) podem ser detectados com um transdutor de 5,0 MHz a partir de 24 dias de idade (Ginther, 1986).

O tamanho do saco alantoide aumenta e o saco vitelino diminui, ocorrendo deslocamento contínuo do embrião, que se distancia da parte ventral da vesícula (Ginther, 1986).

O saco alantoide aumenta e o saco vitelino diminui. Pode-se observar que o embrião e a linha ecogênica, separando os dois sacos, deslocam-se dorsalmente na vesícula embrionária (Ginther, 1986).

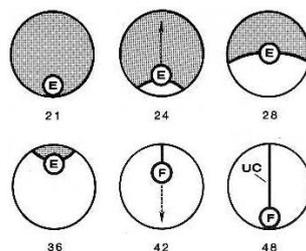


Figura 1: Diagrama da ascensão do embrião e a descida do feto no interior da vesícula. **E:** embrião, **F:** feto, **UC:** cordão umbilical, espaço em cinza: saco vitelino, espaço em branco: saco alantoide (Ginther, 1986).

De 35 a 40 dias começa a ser produzido o eCG (*equine chorionic gonadotropin* ou PMSG) pelos cálices endometriais (Lunn *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 2002b).. A fixação ocorre no dia 37 O pico de secreção de eCG ocorre ao redor dos 55 a 70 dias de gestação e corresponde ao período de tamanho máximo dos cálices endometriais (Allen, 2000).

Na égua, em associação com gonadotrofinas da hipófise, a eCG estimula a formação de corpos lúteos acessórios através da luteinização dos folículos das ondas foliculares, com ou sem ovulação (Ginther, 1992; Lunn *et al.*, 1997; Wooding *et al.*, 2001; Allen, 2001; de Mestre *et al.*, 2008). Dessa forma, aos 40 dias de gestação a concentração de progesterona sérica dobra seu valor (Lunn *et al.*, 1997).

Os corpos lúteos acessórios aumentam em número e persistem até a metade da gestação, quando a placenta já está madura o suficiente para assumir inteiramente o suprimento de progesterona para a manutenção da gestação, sem qualquer ajuda dos ovários (Allen, 2000; Allen, 2001; Hafez e Hafez, 2004).

No dia 40 (final do estágio de embrião) o embrião e seu âmnio já foram movidos para o polo oposto e o saco vitelínico desaparece, surgindo o cordão umbilical (de Mestre *et al.*, 2008). Por conveniência o 40º dia é designado como o término do estágio de embrião, portanto, essa estrutura passa a ser designada como feto. O cordão umbilical alonga-se após o 40º dia, direcionando o feto para o polo ventral do saco alantóideo, atingindo-o ao redor do 48º dia (Ginther, 1986).

2.3- Perda de prenhez

Em estudos realizados, foi observada uma maior porcentagem de perda de prenhez em éguas, das raças Puro Sangue Inglês e Standarbreed, entre os dias 14 a 28 (23 de 42 perdas) do que entre os dias 28 e 42 (9 de 42) ou 42 a 56

(10 de 42). Estudos ultrassonográficos fornecem subsídios para a hipótese formulada de que a maior incidência de perda embrionária ocorre antes do dia 20 ou 25 do que após estes dias. Essas considerações enfatizam a utilidade da ultrassonografia na detecção precoce de perda embrionária, tanto em nível clínico como em nível de pesquisa. Num outro estudo achou-se uma alta porcentagem de perda entre os dias 15 e 20 (26% de 61 perdas durante o período de 15 a 50 dias de gestação), uma taxa similar foi encontrada entre os dias 30 e 35, porém isso não tem sido confirmado em outros estudos. Já está estabelecido que a taxa de perda embrionária excede a taxa de perda fetal em éguas com gestação simples. Tal fato determina o manejo prático existente nos haras, no qual se consideram éguas com prenhez positiva aquelas que apresentam mais de 42 dias de gestação (Ginther, 1986).

Entre os parâmetros de estado reprodutivo: égua virgem, recém parida, vazia, com vulvoplastia e o fator idade, o único que teve relação com a perda de prenhez foi a idade das éguas. Éguas de 3 a 6 anos (15,1%) comparando-se com éguas de 7 a 9 anos (19,3%), 10 a 12 anos (21,5%) ou mais velhas (22,2%) (Ginther, 1986).

Outra consideração associada com perda de prenhez é a história de perdas prévias. Em um estudo verificou-se que a taxa de perda em éguas com prenhezes restabelecidas foi de 40% (8 de 20). Esse achado indica a presença de problemas crônicos em pelo menos algumas éguas desse grupo (Ginther, 1986).

2.4- Métodos de sexagem

A sexagem se baseia, fundamentalmente, na utilização do ultrassom ou da PCR (*polymerase chain reaction*) tanto em equinos quanto em bovinos e outras espécies. Assim como, também, há métodos de sexagem baseados em anticorpos específicos para o antígeno H-Y, um antígeno de transplantação específico do sexo masculino e bem representado na superfície dos espermatozoides (Wachtel, 1983).

Em humanos é possível realizar a sexagem fetal a partir de amostras de

sangue venoso materno, mas o mesmo não é possível em equinos devido à morfologia da placenta equina, que não permite a passagem de material genético fetal para a corrente sanguínea da égua gestante (Machado, L.V; 2007).

2.4.1- Ultrassonografia

A primeira técnica a ser descrita foi através da análise do posicionamento do tubérculo genital via ultrassonografia (Curran; Ginther, 1989). O tubérculo genital é a estrutura que dará origem ao pênis e ao prepúcio nos machos e à vulva e ao clitóris nas fêmeas, apresentando-se à ultrassonografia como uma estrutura bilobulada, com cada lóbulo alongado e ovóide, de poucos centímetros de tamanho e ecogenicidade intensa. No entanto, o tubérculo genital pode ser confundido com a cauda e a coluna vertebral, que são semelhantes em ecogenicidade e bilobuladas. O período ótimo para a sexagem fetal nas éguas é entre 59 e 68 dias de gestação. A partir do 69º dia de gestação, a acurácia cai drasticamente devido aos problemas na obtenção de uma adequada visualização da ultrassonografia (Wolf; Gabaldi, 2002).

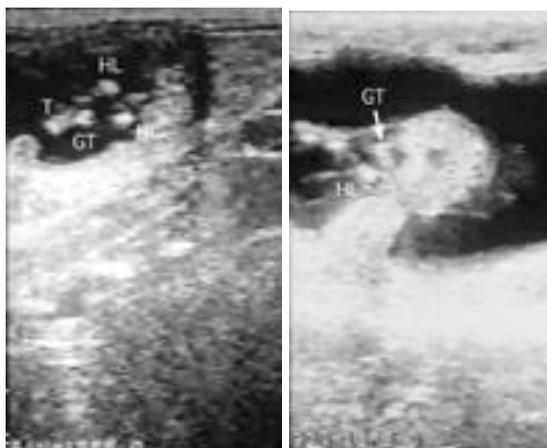


Figura 2: À esquerda, ultrassonografia de um feto equino fêmea, e à direita, macho. T: cauda, GT: tubérculo genital e HL: membros posteriores (Carmo *et al.*, 2007)

Outra técnica realizada é a de sexagem fetal em éguas entre 90 e 150 dias de gestação, utilizando ultrassom, que tem por finalidade a visualização da gônada e da genitália externa do feto. No macho pode-se observar o testículo,

o pênis e o prepúcio; já na fêmea: o ovário, tetos e clitóris (Carmo *et al.*, 2007). Há uma maior dificuldade de distinguir a genitália externa antes de 110 dias de gestação por esta ainda não estar muito bem desenvolvida (Holder, 2000) e após os 150 dias de gestação o feto começa a assumir uma apresentação anterior; isso significa que a cabeça será facilmente acessível, mas a pelve estará fora de alcance, o que dificulta a visualização das gônadas e prepúcio (Samper *et al.*, 2007). A realização do exame para a determinação da sexagem por ultrassonografia entre 90 e 150 dias de gestação foi possível em, aproximadamente, 85% (Holder, 2000) a 90% (Samper *et al.*, 2007). Carmo *et al.*, (2007), na primeira avaliação, conseguiram observar a gônada fetal em 92% dos casos e, dentre essa porcentagem, tiveram 90 % de acerto.

Determinar a localização do tubérculo genital em relação ao cordão umbilical e/ou da cauda por ultrassonografia tem sido utilizado para a sexagem fetal em vacas. A ultrassonografia do tubérculo genital e cordão umbilical, ou do tubérculo genital com a cauda, em fetos do sexo feminino, pode exigir considerável manipulação uterina e habilidade por parte do veterinário. Além disso, o período ótimo é limitado, geralmente dias 55 a 80 da prenhez.

Contudo, a responsabilidade do diagnóstico preciso requer conhecimento, treinamento e segurança por parte do médico veterinário, valendo frisar que o uso de equipamento com boa resolução de imagem é fundamental para o uso da técnica (Carmo *et al.*, 2007).

2.4.2- Sexagem molecular por PCR

A determinação do sexo pré-natal por PCR é uma alternativa precisa, sendo emitida através de um laudo laboratorial com 99,91% de certeza (Bydlowski; Leyton, 1998).

Em sexagem molecular de indivíduos fenotipicamente definidos, trabalhos mostram a análise de DNA por meio da identificação de duas regiões genômicas, uma encontrada apenas no cromossomo Y e outra localizada em ambos os cromossomos sexuais, X e Y; esta segunda região é utilizada como controle positivo da reação, já a região do cromossomo Y é detectada apenas

quando o indivíduo é do sexo masculino. O diagnóstico do sexo feminino é feito por exclusão, sendo possível a realização dessa técnica por meio da PCR, na qual há a multiplicação do fragmento de DNA alvo. (Machado, L.V; 2007).

A determinação rápida do sexo genético em mamíferos consiste na amplificação simultânea do gene SRY e do gene da amelogenina (AMEL), localizados em ambos os cromossomos sexuais X e Y. O gene SRY age como um indutor na determinação sexual masculina (Damiani *et al.*, 2000) .

Utilizando a técnica da PCR seguida da análise dos produtos de amplificação por eletroforese em géis de agarose, Hasegawa e colaboradores (2000) descreveram perfis eletroforéticos discriminatórios para machos e fêmeas: indivíduos típicos masculinos apresentam 1 pico de fluorescência para o marcador SRY e 2 picos para o marcador AMEL (AMEL X, AMEL Y). Já os indivíduos femininos apresentam somente 1 pico, que corresponde à amplificação do gene da AMEL localizada nos cromossomos X, e nenhuma amplificação relativa ao cromossomo Y.

O sistema QF-PCR biplex para os marcadores SRY e amelogenina se mostrou eficiente para a sexagem molecular em equinos adultos, revelando-se assim, um método confiável. (Machado, L.V; 2007).

O sexo fetal pode ser determinado por PCR, utilizando células de líquido amniótico e alantoide coletado via amniocentese transvaginal guiada por ultrassom (Kamimura, S. *et al.*, 1996).

2.5- Genotipagem

A tipagem dos animais para a identificação individual, controle de parentesco e a resolução de problemas de maternidade e paternidade vêm sendo um procedimento de rotina para criadores de cavalos. Assim, pode-se diferenciar geneticamente um animal de outro (Oliveira, 2001).

A aplicação de marcadores de DNA possui uma extensiva capacidade de distinção individual, e essa habilidade vem sendo utilizada em análises de parentesco (Tozaki *et al.*, 2001).

A reação quantitativa fluorescente em cadeia da polimerase (QF-PCR) entrou no campo do diagnóstico genético, permitindo o diagnóstico rápido de estudos cromossômicos (Jauniaux *et al.*, 2003; Nicolini *et al.*, 2004). A análise automatizada de STR usa o produto amplificado de DNA marcado com fluorocromos e a leitura da eletroforese se dá automaticamente em aparelho próprio, o que faz a QF-PCR ser mais confiável e precisa do que a PCR convencional por géis em que a análise é feita visualmente. Diferentes fluorocromos, agentes químicos fluorescentes são utilizados (Butler, 2005).

2.6- Amniocentese

2.6.1- Amniocentese em humanos

A amniocentese realizada a partir da 14^a semana é um dos métodos mais difundidos para a obtenção de material fetal com finalidade de diagnóstico pré-natal de alterações genéticas (Nazareth *et al.*, 1981).

O risco de sérias complicações, incluindo perda fetal, varia, nos diferentes centros, de 0,2% a 0,5%. Essa variação deve ser decorrente do método de monitoramento aplicado à punção. Os bons serviços só executam o procedimento de punção se realizado com toda a assepsia de um teatro operatório, incluindo o uso de material esterilizado e o revestimento da sonda de ultrassom com invólucro estéril, uma vez que ela acompanhará a introdução da agulha até o lago amniótico escolhido (Golbus *et al.*, 1979).

Transpassar a placenta não implica riscos maiores (Crane; Kopta, 1984).

O mais importante é, realmente, esse monitoramento, de modo a dar a certeza do caminho a ser percorrido pela agulha, o que implica menor probabilidade de obter líquido com sangue ao evitar que a agulha atravesse a cavidade amniótica e puncione vasos ou a placenta localizada posteriormente. O monitoramento evita, também, que a agulha seja introduzida mais de uma vez, o que diminui a possibilidade de lesões fetais. Outras complicações menores são as lesões fetais que aparecem ao nascimento como pequenas cicatrizes na região tocada pela agulha. Se não monitorizadas pelo ultrassom, poderão ocorrer lesões graves, dependendo da região atingida pela agulha,

tendo já sido descrita gangrena de membro e lesão de articulação de joelho (Milunsky, 1979).

A punção amniótica precoce pode ser realizada a partir da nona semana, preferencialmente da 13ª semana em diante (Elejalde *et al.*, 1990).

2.6.2- Amniocentese em bovinos

A aspiração de fluido amniótico via amniocentese vaginal é realizada de 70 a 100 dias de gestação, utilizando uma pipeta de inseminação acoplada, em uma das extremidades, a uma agulha hipodérmica 40 x 12 e na outra, a uma seringa de 60 mL, o que permite a obtenção de células para análise cromossômica. Esse método é simples e preciso, fornecendo um diagnóstico seguro para detecção do sexo pré-natal e defeitos citogenéticos em bovinos (Bongso; Basrur, 1975).

A concentração de testosterona no líquido amniótico, entre 90 e 150 dias de gestação em bovinos, pode ser utilizada para determinar o sexo fetal, com os valores de 442 ± 20 picogramas de testosterona por mililitro para feto masculino e 215 ± 8 picogramas por mililitro para fetos femininos (Bongso *et al.*, 1976).

As células cianofílicas (basofílicas) pequenas e nucleadas no líquido amniótico são as mais ativas e mitóticas e podem ser utilizadas para a detecção do sexo e perfil citogenético do feto bovino (Bongso; Basrur, 1975).

Kamimura e colaboradores realizaram 35 aspirados via transvaginal a partir de 30 vacas, obtendo 33 amostras. 5 vacas foram aspiradas duas vezes com um intervalo de 10 dias, utilizando-se um transdutor de 5,0 MHz equipado com uma guia de biopsia acoplada a uma agulha de 65 cm de comprimento com calibre de 8 mm. Ocorreram 5 abortos após 1 semana da punção. Concluiu-se que o procedimento requer considerável habilidade e oferece risco à viabilidade fetal.

3- Material e métodos

3.1- Materiais

3.1.1-Teste do Protótipo e do Aparelho de punção

O protótipo foi testado *in-vivo* e em peças de abatedouro (aparelho reprodutivo feminino equino). Foram testadas e adaptadas duas guias de biópsia que se utilizam em aspiração folicular, uma acoplada a uma sonda setorial móvel e outro a uma sonda setorial fixa. O protótipo compõe-se de um aparelho de punção acoplado de maneira adaptada a uma das guias de biópsia, ilustrado na figura 3.



Figura 3: Guias de biópsia: à esquerda, sonda setorial fixa introduzida em uma peça de abatedouro (aparelho reprodutivo feminino de um equino) e à direita, sonda setorial móvel introduzida *in-vivo* na vagina de uma égua com 18 dias de prenhez.

Também foram testados calibres e comprimentos de agulhas variados a fim de verificar a eficácia destes em transpassar as barreiras: fórnix, útero e anexos placentários.

Foram testadas as agulhas (comprimento x calibre): 89 x 0,4, 30x7, 30x8, 40x12, 40x16, 80 x 15 e 100 x 9, ilustradas na figura 4.

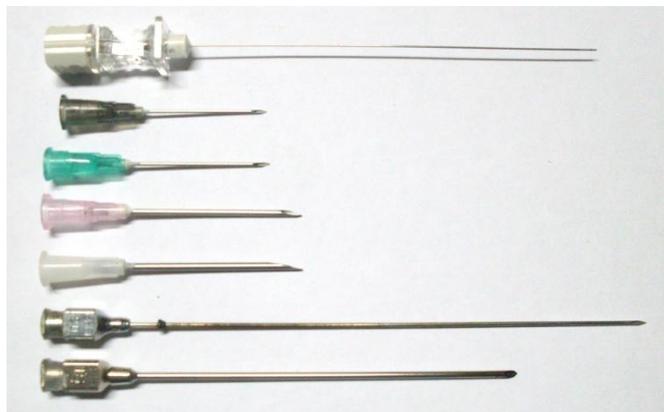


Figura 4: Agulhas testadas, de cima para baixo: 89 x 0,4, 30x7, 30x8, 40x12, 40x16, 100 x 9 e 80 x 15 (unidade adotada expressa em mm).

3.1.2- Aparelho de punção

O aparelho de punção é compõe-se de uma agulha acoplada a uma palheta de 0,5 mL (recipiente de armazenagem de amostra); este conjunto acopla-se a uma das extremidades de uma pipeta de inseminação equina e na outra extremidade da pipeta a uma seringa de 1 mL- ilustração na figura 5.

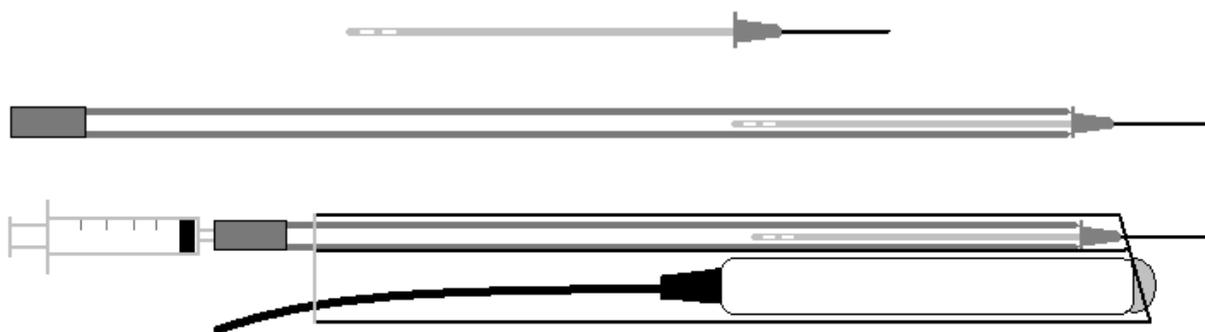


Figura 5: Sequência da montagem do aparelho de punção. De cima para baixo: recipiente de armazenagem de amostra, aparelho de punção e aparelho de punção acoplado à guia de biópsia.

A guia de biópsia se acopla a um transdutor setorial de cinco MHz, que é conectado a um aparelho de ultrassom Falcon Vet. O aparelho de ultrassom possui uma opção de programação, para o transdutor setorial móvel, que exibe

na tela uma linha indicando o trajeto da agulha (*biopse line*), (figura 6).



Figura 6: As figuras mostram, da esquerda para a direita, a extremidade da guia de biópsia (sonda setorial móvel e agulha exposta), a linha de biópsia (*biopse line*) e a imagem gerada pelo transdutor setorial fixo.

3.2- Método

Foram coletadas 29 amostras de líquido vitelínico e/ou alantoide de embriões e fetos equinos, num total de 64 punções, sendo que alguns conceptos sofreram mais de uma punção, num total de 29 éguas. Ilustrado no Apêndice A (página 44).

3.2.1- Técnica de coleta de amostra de DNA embrionário ou fetal

As amostras de anexos embrionários ou fetais de equinos foram coletadas por meio de punção via fundo de saco vaginal de éguas prenhes, utilizando o protótipo acoplado à guia de biópsia.

O procedimento ocorre da seguinte maneira: realiza-se a antissepsia do trato genital externo utilizando detergente e água corrente, secando-se a região perineal com papel-toalha. O embrião, ou feto, é localizado por meio de exame retal, enquanto a guia de biópsia é introduzida por via vaginal e guiada até o fórnix (figura 7), na área mais próxima ao *conceptus*. A guia de biópsia é revestida com Diguconato de Clorexidina 0,7 % em pasta (Furanil®), a fim de promover a antissepsia do local da punção, possuindo efeito antimicrobiano geral, antifúngico e antiprotozoário.



Figura 7: Ilustração do posicionamento da guia de biópsia no fórnix, preparada para perfurar o colo uterino local onde se fixou o concepto.

Em seguida, a agulha é exposta e atravessa as camadas da parede vaginal; logo após, o útero e anexos embrionários, ou placentários, chegando ao espaço preenchido por líquido vitelínico ou alantoide (figura 8). Este líquido proveniente do *conceptus* é puncionado e armazenado no interior do aparelho de biópsia. Todo o procedimento é guiado ultrassonograficamente com transdutor setorial, via fundo de saco vaginal. Após a punção do fluido dos anexos, a agulha volta à proteção da guia de biópsia e o conjunto é retirado da égua.

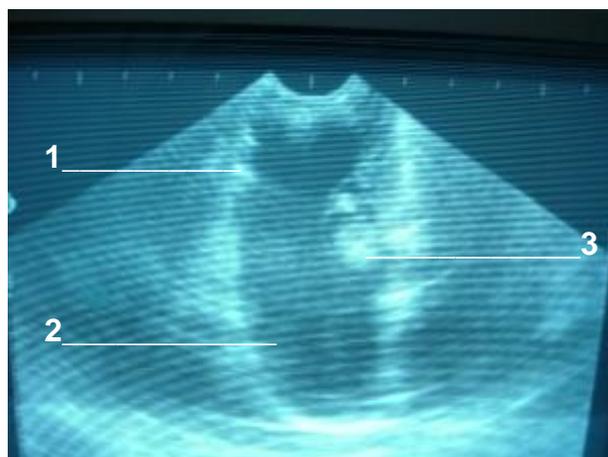


Figura 8: Imagem ultrassonográfica mostrando um concepto equino de 45 dias de gestação: 1 bisel da agulha sendo introduzido, 2 líquido alantoide e 3 o feto.

3.2.2- Período de punção

Não foi preestabelecido um período de gestação em que a punção pudesse ser feita, sendo que esta foi realizada entre D18 (18 dias de gestação: embrião) e 11 meses de gestação, com o intuito de testar em quais períodos a punção é mais fácil de ser executada e em relação e a relação com sua segurança e eficiência.

3.2.3- Coleta de amostra de DNA materno

Foram coletadas amostras de sangue da veia jugular das éguas prenhes submetidas à punção, as quais foram armazenadas em tubos de Vacutainer com anticoagulante (EDTA), a fim de extrair o DNA genômico dos leucócitos dessas amostras, para que se efetuassem as genotipagens nos casos em que o conceito apresentasse o sexo genético feminino e para comprovar que a amostra obtida na punção pertencia de fato ao conceito.

3.3- Processamento das amostras

O processamento das amostras de DNA foi realizado pelo laboratório NUDIM (Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular).

3.3.1- Extração do DNA

As amostras coletadas (sangue, líquido vitelínico e líquido alantoide) foram submetidas ao método de extração do DNA genômico utilizando o *kit* de extração e purificação de DNA genômico “GFX Genomic blood purification kit”, Armesham Pharmacia Biotech, USA, conforme a especificação do fabricante.

3.3.2- QF-PCR

3.3.2.1- Sexagem

Após a diluição apropriada, uma alíquota de aproximadamente 2 nanogramas de DNA total foi submetida ao processo de amplificação pelo método da QF-PCR com o emprego dos *primers* para os marcadores SRY e

AMEL (biplex para sexagem molecular em equinos). Um iniciador de cada par foi marcado com um fluorocromo, permitindo a análise mais precisa dos produtos da PCR (Sherlock *et al.*, 1998). Após a desnaturação a 95°C por 11 minutos foram, realizados 28 ciclos de 94°C por 1 minuto, 59°C 1 minuto, 72°C. A extensão final foi por 60 minutos a 60°C.

3.3.2.2- Genotipagem

Com a finalidade de diferenciar o genótipo materno do genótipo do concepto, quando este for fêmea, foi utilizado o *kit* de genotipagem e paternidade comercial *StockMarks for Horses Genotyping Kit* (Applied Biosystems, USA).

O exame de genotipagem é baseado na análise das características genéticas que são próprias e exclusivas para cada indivíduo, através de regiões altamente polimórficas (apresentam formas diferentes em indivíduos da mesma espécie) do DNA.

Após a diluição apropriada, uma alíquota de aproximadamente 2 nanogramas de DNA total foi submetida ao processo de amplificação pelo método da QF-PCR para os seguintes marcadores STR de dinucleotídeos: VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, LEX3, HMS1, CA425; completando um total de 17 marcadores polimórficos. Após a desnaturação a 95°C por 10 minutos, foram realizados 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto. A extensão final foi por 60 minutos a 72°C.

3.3.2.3- Eletroforese em capilar

Os produtos da QF-PCR foram submetidos à separação eletroforética em capilar utilizando o analisador automático *ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER* (Applied Biosystems USA). As amostras foram preparadas com adição de formamida (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems) e do marcador de peso molecular *GeneScan™ – 500 LIZ® Size Standard* da Applied Biosystems, conforme especificação do fabricante. Os perfis eletroforéticos

foram analisados utilizando os programas GeneScan™ e Genotyper™ (Applied Biosystems).

3.3.2.4- Identificação e caracterização dos perfis alélicos

Os perfis eletroforéticos foram analisados usando os programas *Genescan* e *Genotyper* da Applied Biosystems. Os alelos foram nomeados com o valor em pares de nucleotídeos dos produtos da PCR. A metodologia utilizada para a interpretação dos eletroferogramas está resumida na figura 9. Os produtos de amplificação correspondem a alelos que variam em comprimento (pares de base) para cada sistema. Os alelos são registrados como picos de fluorescência com intensidade variada (eixo Y) e comprimento variado (eixo X). Indivíduos heterozigotos para um determinado marcador exibem dois picos de fluorescência de intensidade comparável, porém de tamanhos em pares de bases diferentes.

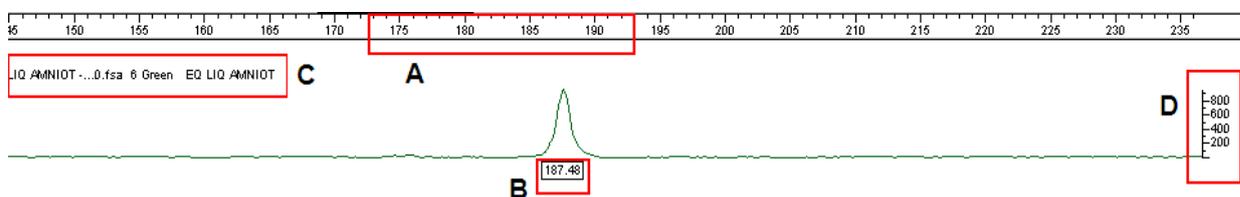


Figura 9: Método de interpretação de um eletroferograma. No eixo X, representado em A, escala em número de pares de bases (pb). Em B, informações alélicas representadas, caracterização dos alelos em pares de nucleotídeos. Em C, identificação da amostra analisada. No eixo Y, representado em D, escala da atividade de fluorescência em unidades arbitrárias. A intensidade de fluorescência está diretamente relacionada com a quantidade de sequências amplificadas.

3.4 Análises estatísticas

A análise estatística consistiu na comparação, pelo teste de qui-quadrado, entre a frequência de animais puncionados e a frequência de abortos de acordo com o tipo (100x9; 30x7; 30x8; 40x12; 40x16; 80x15; 89x0,4), comprimento (30; 40; 80; 89; 100) e o diâmetro da agulha (0,4; 7; 8; 9;

12; 15; 16). Também foi verificada a existência de correlação entre a frequência de animais puncionados e a frequência de abortos com o diâmetro e comprimento da agulha e idade dos animais. O aplicativo estatístico utilizado foi o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, versão 9.1), adotando-se o nível de 5% de significância.

4- Resultados e discussão

4.1- Eficácia da coleta.

O método de coleta é eficaz em trazer amostras de DNA dos conceptos tanto em quantidade como em qualidade, sendo possível a realização de testes genéticos de sexagem e genotipagem com eficiência.

Não houve nenhum dano às éguas mesmo quando houve reabsorção ou abortamentos, mostrando que a técnica é segura para as éguas, independente de suas fases gestacionais.

4.2- A técnica.

A assepsia dos equipamentos deve ser impecável e a antissepsia do trato reprodutivo da égua deve ser realizada de maneira rigorosa e eficiente, principalmente no ponto onde será realizada a punção, visto que alguns imprevistos ocorreram em alguns procedimentos de punção.

4.2.1- Ajustes metodológicos.

A guia de biópsia utilizada foi adaptada para a punção dos anexos do concepto e o aparelho de punção foi desenvolvido para realização da técnica, funcionando como protótipo, estando o conjunto (aparelho de punção mais guia de biópsia) em fase de aprimoramento. No entanto, o conjunto funcionou de maneira satisfatória.

Na maioria dos casos, a agulha transpassava a parede do útero mas não perfurava a placenta, empurrando-a mas sem penetrar, fato esse demonstrado na figura 10.

Nas gestações mais avançadas as agulhas de baixo calibre amassavam-se e não penetravam as barreiras, sendo necessária a utilização de agulhas de calibres maiores quanto fossem necessários.

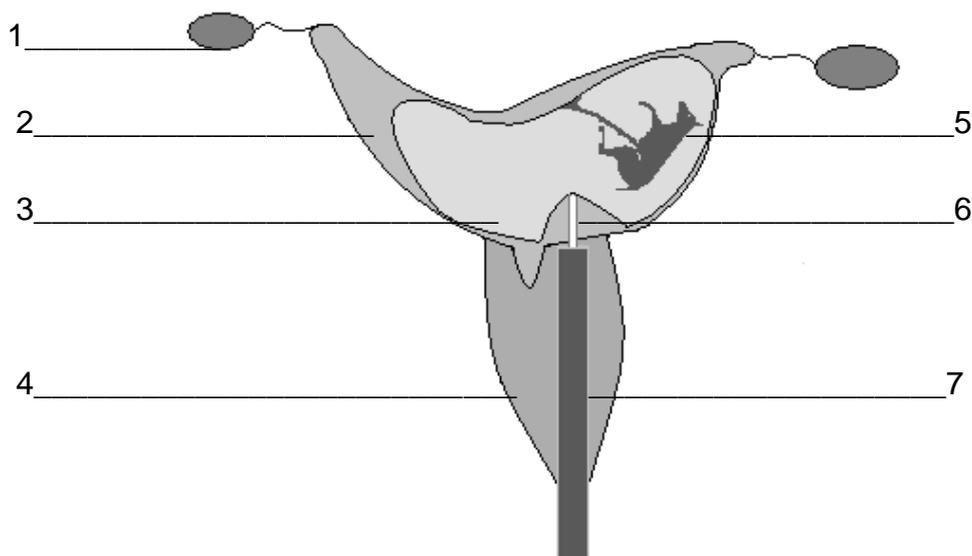


Figura 10: ilustração do aparelho reprodutivo feminino equino gestante ao ser perfurado na tentativa de uma punção: 1 ovário, 2 útero, 3 conceito, 4 vagina, 5 feto, 6 agulha e 7 guia de biópsia. Note que a agulha perfura o útero, mas não perfura a placenta.

A grande maioria das éguas puncionadas não possuía histórico reprodutivo e não foi estabelecida uma padronização das éguas, quanto ao manejo, sendo aconselhável, em estudos próximos, que haja uma preocupação com o manejo das éguas: utilizar um modelo experimental mais controlado. Faz-se necessário estabelecer um protocolo de avaliação inicial das éguas, a fim de determinar quais podem ou não ser puncionadas, utilizando critérios tais como: tonicidade do útero, ausência de infecções, escore corporal da égua, entre outros.

Período de punção ideal está compreendido entre dias 35 e 60, por ser um período de menor percentual de ocorrência de perdas naturais já ocorreu o desenvolvimento dos cálices endometriais, os anexos placentários ainda não estão tão espessos e o posicionamento do útero é bom.

4.2.2- Conceptos puncionados mais de uma vez e em dias diferentes

Quatro conceitos foram puncionados em dias diferentes, o da égua número 2 foi puncionado aos 23 dias e aos 7 meses de gestação, o da égua número 7 foi puncionado aos 30 dias e 60 dias de gestação, da égua 8 aos 60 dias e aos 3 meses, égua 9 aos 4 e 5 meses. A égua de número 10 foi puncionada aos 7 meses, e aos 8 meses realizou-se uma nova tentativa de

punção, mas devido a espessura da placenta, não foi possível puncionar. No segundo dia em que foi feita a punção da égua de número 8, ocorreu morte fetal. Ver Apêndice A.

4.2.3- Abortos e absorções

Um fator a ser considerado é a determinação do dia mínimo em que a técnica deve ser realizada, objetivando-se evitar o período em que há possibilidade de ocorrerem perdas embrionárias espontâneas, evitando dúvidas a respeito da causa da perda embrionária. Pode-se tomar como exemplo o caso da égua número 26 na qual houve perda embrionária e que foi puncionada nesse período (dia 30) em que ocorrem 21,4 % das perdas naturais (Guinter, 1986). Nesse caso não foi possível estabelecer a causa real da perda embrionária. A contração uterina no dia da punção não condizia com uma contração característica de prenhez, o que evidencia uma concentração ineficiente de progesterona. Em tal período ainda não há formação dos cálices endometriais (dia 33), que são responsáveis pela formação dos corpos lúteos acessórios produtores de progesterona. No dia seguinte à punção o embrião apresentava formato normal; após cinco dias (dia 35) foi realizada a ultrassonografia da égua e constatou-se a perda embrionária. Outro fator a ser considerado é a produção de prostaglandinas que levam à luteólise, decorrentes de agressões ao útero. Vale lembrar que essa égua, em específico, não possuía água para a hidratação a todo tempo, seu dono oferecia água somente três vezes ao dia e a égua apresentava-se magra. Não houve padronização dos animais.

Os abortos das éguas de número 8 (puncionada aos 3 meses de gestação) e 13 (puncionada aos 5 meses) ocorreram 5 dias após as punções, os dois conceitos foram puncionados na terceira tentativa. Não há constatação do que pode ter causado o aborto. Algumas hipóteses podem ser sugeridas: a higienização do fórnix pode ter sido ineficiente, ou as éguas possuíam algum tipo de infecção; pode ter ocorrido contaminação da agulha ao se introduzir o aparelho de punção no interior da guia de biópsia que não foi corretamente esterilizada, fatos esses, que levariam à contaminação do conceito, que não possui sistema imune formado e não teria como combater uma infecção. Nesse

caso, nem o sistema imune da égua poderia combater a infecção do concepto, pois não há como os anticorpos e células de defesa da égua atuarem no concepto sem prejudicá-lo. Até mesmo uma reação do sistema imune da égua pode levar ao aborto, visto que o concepto é um corpo estranho e que ocorre no início da gestação uma série de fatores que inibem a reação do sistema imune materno ao concepto.

A causa do aborto dos fetos de dez meses, éguas de número 20 e 21, provavelmente tenha sido da técnica, pois durante a punção os fetos se mexiam muito e as éguas encontravam-se inquietas, além de ter sido difícil perfurar as placentas e chegar ao lago alantoide, devido à espessura das placentas em relação ao comprimento das agulhas utilizadas. Primeiro com agulhas de calibre 40/12 não foi possível a realização da punção. Foram testadas agulhas de calibre 40/16 (maior calibre testado), foram necessárias várias tentativas, até que a agulha perfurasse os anexos placentários. Indicando-se, portanto, em casos de prenhez avançada, a utilização de agulhas de maior comprimento. Em uma das tentativas a agulha atingiu o feto da égua 21 notou-se a presença de sangue na amostra e na guia de biópsia. Esses fatores podem ter contribuído para o aborto que foi observado no dia seguinte. Os potros foram encontrados com vida, mas morreram em poucas horas sem conseguir mamar.

A técnica pode ser melhorada através da utilização de agulhas de calibre menor e de comprimento maior, principalmente em gestações de estágio avançado, devido à espessura da placenta. A utilização de tranquilizantes na égua e anestesia epidural deve ser levada em conta, de maneira semelhante à metodologia utilizada em bovinos (Kamimura *et al.*, 1996), visto que a inquietação da égua prejudica a realização da técnica.

A correlação entre idade do concepto e possibilidade de realização ou não da punção mostrou: quanto maior a idade gestacional, menor a possibilidade de realização da punção ($r = - 0,3877$; $P = 0,0005$).

Na análise da correlação entre idade do concepto e incidência de aborto foi verificada uma baixa correlação sem significância ($r = 0,1114$; $P=0,1888$).

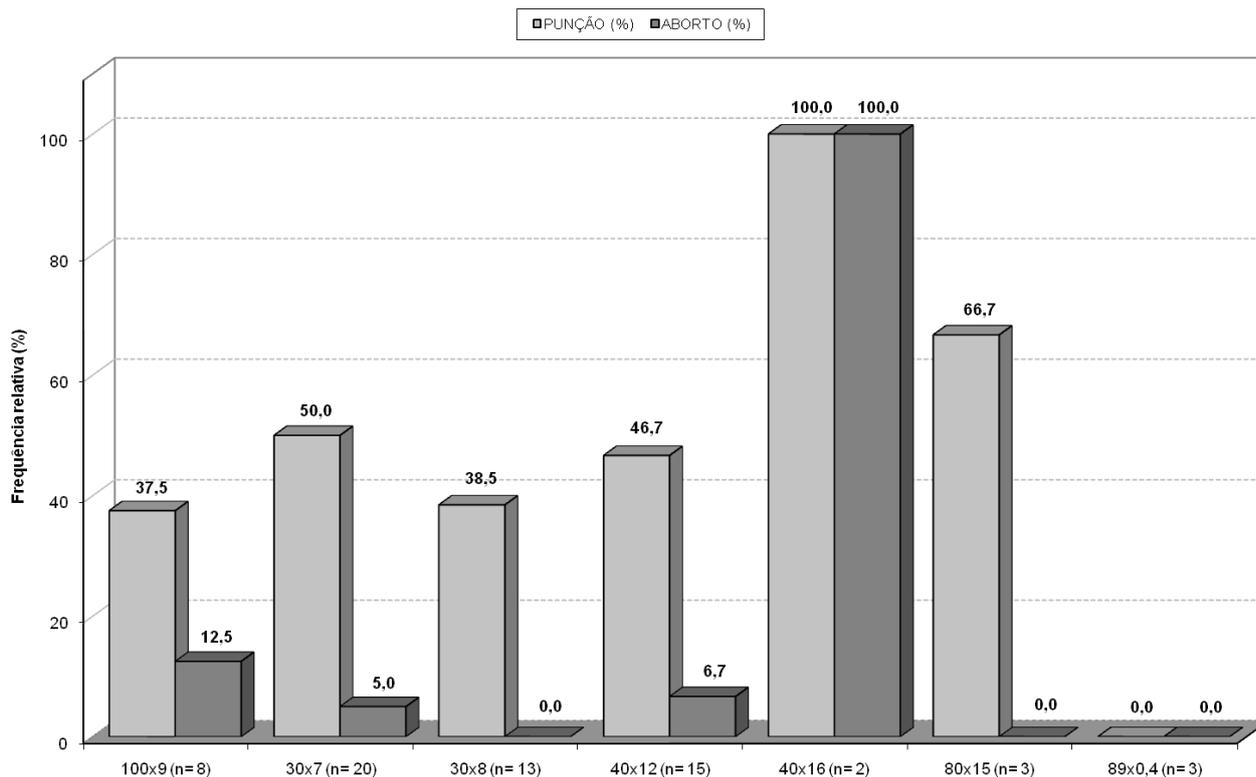


Figura 11: Comparação, pelo teste de qui-quadrado, entre a frequência de éguas puncionadas e a frequência de abortos de acordo com o tipo de agulha hipodérmica :100x9; 30x7; 30x8; 40x12; 40x16; 80x15; 89x0,4 (comprimento x calibre em mm).

Ao comparar as agulhas deve-se ressaltar a idade gestacional e consequente espessura fôrnix, útero e placenta em que elas foram utilizadas, visto que em gestações iniciais foram utilizadas agulhas de baixo calibre e em gestações mais avançadas as de calibre maior (ver Apêndice A). A agulha 40 x 16 mm obteve o pior desempenho no que diz respeito ao aborto; no entanto, foi eficiente na punção, apesar do número pequeno de eventos. Não houve nenhum aborto com as agulhas 30 x 8 e 80 x 15 mm- apesar de ter um diâmetro grande, a agulha 80 x 15 mm mostrou-se eficiente, pois foi utilizada em gestações mais avançadas (a partir de 210 dias). A agulha 89 x 0,4 mm não obteve sucesso em perfurar as estruturas, ela se curvava ao ser pressionada contra o fôrnix e não o perfurava; ao cessar a pressão, a agulha voltava a seu formato normal.

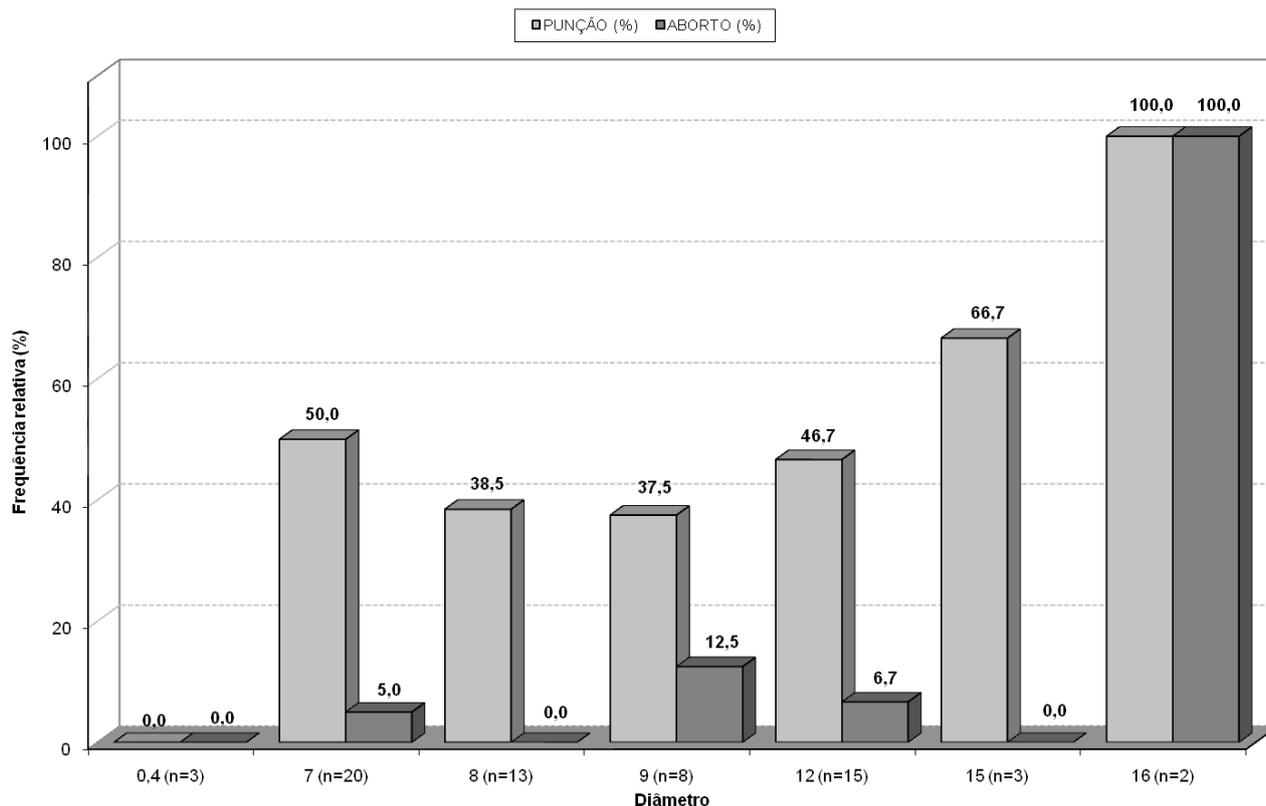


Figura 12: Comparação, pelo teste de qui-quadrado, entre a frequência de éguas puncionadas e a frequência de abortos de acordo com o diâmetro da agulha hipodérmica : 0,4; 7; 8; 9; 12; 15; 16 (comprimento em mm).

O diâmetro das agulhas está diretamente relacionado tanto ao sucesso da punção quanto à ocorrência de aborto. Quanto menor o diâmetro menor é a resistência da agulha em relação a dano estrutural (entortar-se) e menor é a porcentagem de sucesso na punção. Vale lembrar - quanto maior a espessura a ser perfurada, maior resistência é exigida da agulha. Quanto maior o diâmetro da agulha, maior é o diâmetro da perfuração e maior é a lesão na estrutura perfurada.

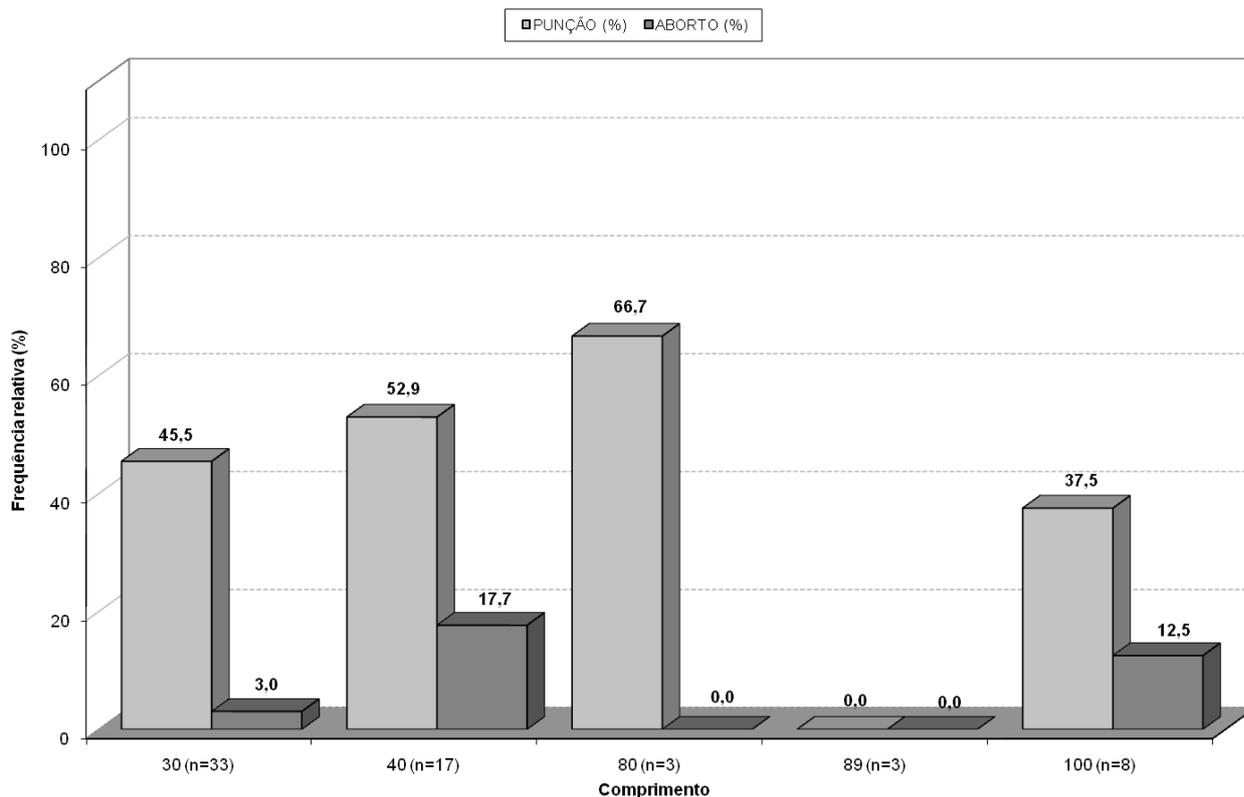


Figura 13: Comparação, pelo teste de qui-quadrado, entre a frequência de éguas punçoadas e a frequência de abortos de acordo com o comprimento da agulha hipodérmica: 30; 40; 80; 89; 100 (comprimento em mm).

O comprimento está diretamente relacionado ao sucesso da punção, uma vez que em gestações mais avançadas a espessura útero/placenta é maior. Verificou-se, na técnica da punção, que a distância não depende apenas das espessuras fundo de saco vaginal, parede uterina e placenta do concepto, uma vez que a aproximação dessas estruturas depende da força que o técnico exerce sobre elas, pressionando-as, além do grau de dificuldade, que é variável nos indivíduos. Soma-se a esse fato a variação da contração da musculatura retal, já que a aproximação da vesícula é realizada por esta via. É importante ressaltar que o fundo de saco vaginal funciona como um limitador do alcance da agulha, pois a força exercida na superfície deste é aumentada visto que a agulha se encontra no interior da guia de biópsia, que possui uma área de superfície muito maior, limitando a elasticidade e deslocamento do fórnix em direção ao útero durante a punção. Sugere-se que nos estudos subsequentes a guia de biópsia seja modificada de forma que o aparelho de punção possa ultrapassar a guia de biópsia, podendo haver, provavelmente,

uma perda momentânea da visualização correta do local da punção durante a pressão final da agulha sobre o fórnix.

No entanto, deve-se ressaltar que durante a punção ocorre visualização do caminho percorrido pela agulha, tornando diminuta a relação entre comprimento da agulha e porcentagem de aborto e que no cálculo estatístico dessa relação os valores obtidos estão influenciados pelo diâmetro.

4.4- Sexagem genética

As amostras obtidas, a partir dos anexos embrionários, mostraram possuir DNA genômico mesmo em poucos dias de gestação, sendo necessário identificar, em estudos posteriores, de que tecido seriam provenientes as células que continham o DNA analisado.

O *kit* de extração e purificação de DNA genômico “GFX Genomic blood purification kit”, Armesham Pharmacia Biotech, USA, comumente usado em amostras, contendo células provenientes de humanos, mostrou eficiência na extração e purificação de DNA genômico de células do sangue, de líquido vitelínico e de líquido alantoide de equinos.

A sexagem molecular de equinos se mostrou muito eficiente tanto em animais adultos (Machado, 2007) quanto em conceptos, obtendo resultados elucidativos e conclusivos. Corroborando os resultados de Hasegawa e colaboradores (2000), a amplificação simultânea da região determinante do sexo do cromossomo Y (gene SRY) e do gene da amelogenina resulta na determinação do sexo de equinos, mostrando-se um método eficaz. Em todas as amostras analisadas foi possível a realização da sexagem com precisão. Das 29 amostras obtidas, quatro foram analisadas, as demais foram estocadas. Verificou-se a presença de dois machos (dias 21 e 30) e duas fêmeas (3 meses e 6 meses). As amostras de DNA obtidas dos *conceptus* fêmeas foram genotipadas com sucesso, sendo possível distinguir o genótipo materno, do genótipo do conceito do sexo feminino, comprovando que o material obtido na punção era do conceito.

As amostras obtidas possibilitarão a realização, paralelamente na mesma amostra, de outras avaliações, tais como o teste de paternidade, exigido pelas associações de criadores de cavalos de raça, podendo comprovar precocemente se uma prenhez é ou não indesejada, verificação de anomalias genéticas, *pedigree* genético universal e avaliação da presença de características desejáveis.

A sexagem molecular de equinos e a genotipagem dos conceptos, assim como dos equinos adultos, levaram à obtenção de resultados conclusivos nas quatro amostras processadas.

4.4.1- Análise do perfil alélico da amplificação de Amelogenina e SRY

O eletroferograma evidencia os resultados obtidos pelo marcador para amelogenina: para o sexo feminino ocorre apenas um pico de fluorescência, para o sexo masculino dois picos de fluorescência.

Já o eletroferograma para o marcador SRY apresenta: presença de um pico de fluorescência para indivíduos do sexo masculino ou ausência de picos para indivíduos do sexo feminino.

As amostras de DNA de fêmeas exibem um perfil monoalélico para amelogenina, indicativo da condição XX (173 pb). Os machos exibem um perfil dialélico para amelogenina e a presença da amplificação do marcador SRY, indicativo da condição XY (173 pb e 157 pb).

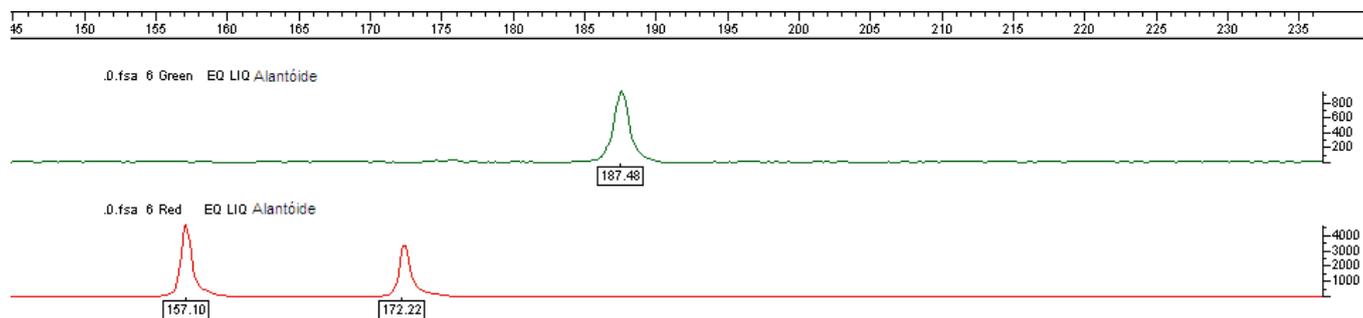


Figura 14: Eletroferograma dos produtos de amplificação do gene SRY (acima) e amelogenina (abaixo) para DNA presente no líquido alantoide, a amplificação do gene da amelogenina Y (157 pb), amelogenina X (172 pb) e do gene SRY (187 pb) indica um embrião de sexo masculino. O eixo X representa o tamanho dos produtos do QF-PCR em pares de bases. O eixo Y representa a atividade fluorescente em unidades arbitrárias. Os picos representam os alelos e estão marcados pelo tamanho utilizando uma escala alélica interna.

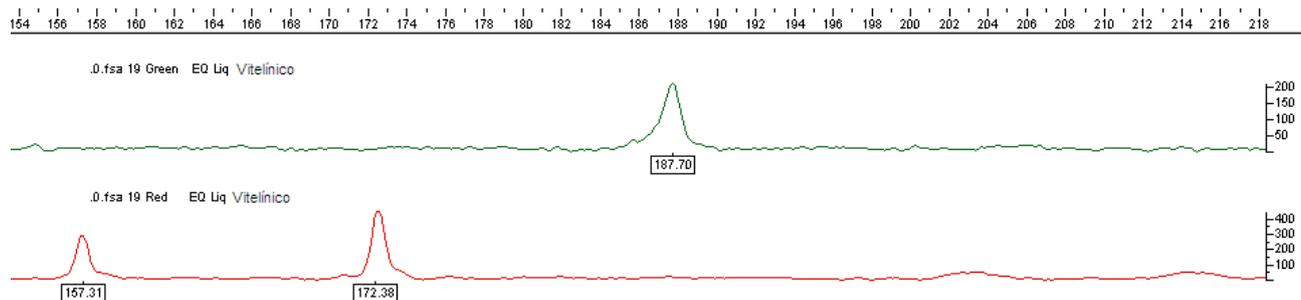


Figura 15: Eletroferograma dos produtos de amplificação do gene SRY (acima) e amelogenina (abaixo) para DNA presente no líquido vitelínico, a amplificação do gene da amelogenina Y (157 pb), amelogenina X (172pb) e do gene SRY (187 pb) indica um embrião de sexo masculino.

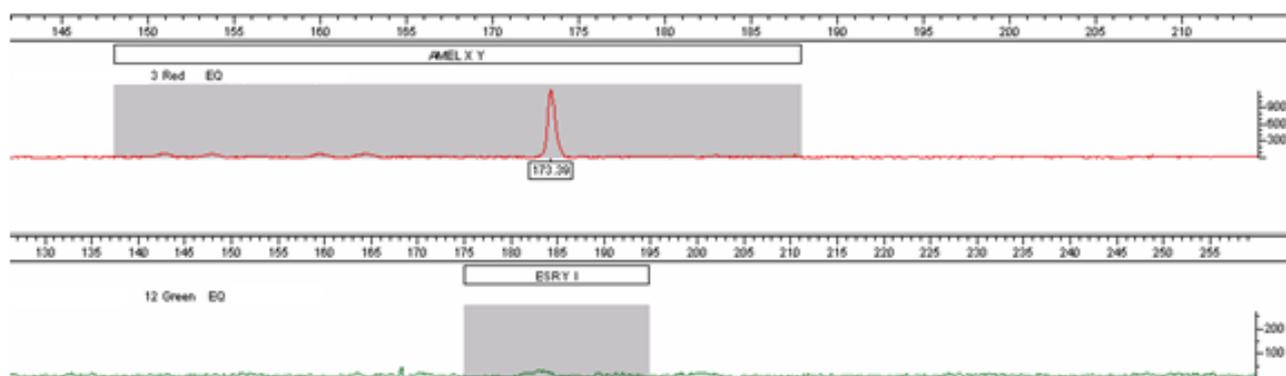


Figura 16: Eletroferograma dos produtos de amplificação do gene SRY (acima) e amelogenina (abaixo) para DNA presente no líquido alantóide, a amplificação do gene da amelogenina X (173 pb) e a não amplificação do gene SRY indica um embrião de sexo feminino.

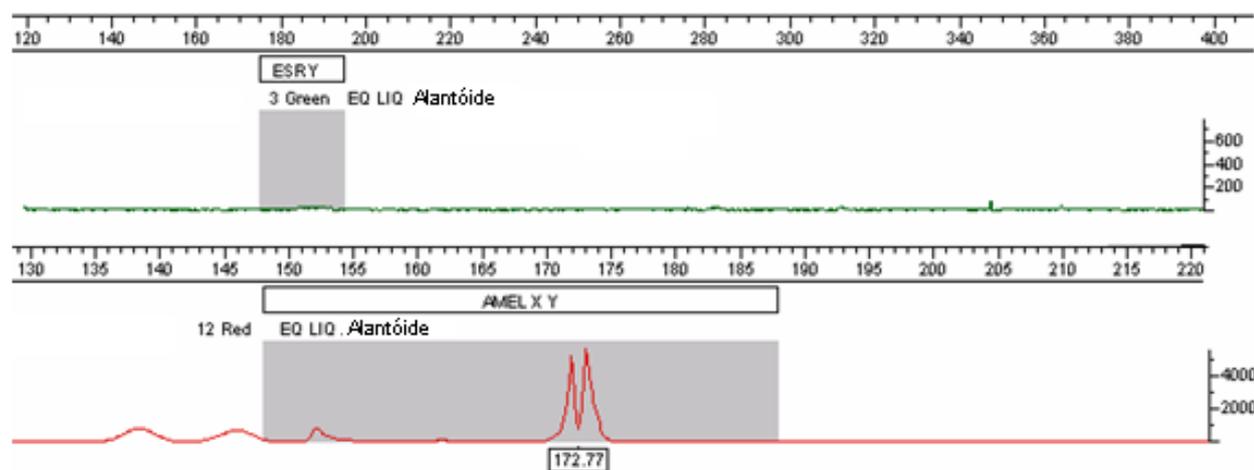


Figura 17: Eletroferograma dos produtos de amplificação do gene SRY (acima) e amelogenina (abaixo) para DNA presente no líquido alantóide, a amplificação do gene da amelogenina X (172 pb) e a não amplificação do gene SRY indica um embrião de sexo feminino.

4.5- Genotipagem

A genotipagem dos conceptos, assim como dos equinos adultos, obteve sucesso em caracterizar os perfis dos indivíduos e distingui-los (figuras 18 e 19), principalmente nos casos em que o concepto era do sexo feminino, comprovando que o perfil genético obtido a partir do DNA extraído da amostra puncionada era distinto do perfil genético obtido a partir do DNA da amostra de sangue da égua gestante. Comprovou-se que a punção foi realizada corretamente.

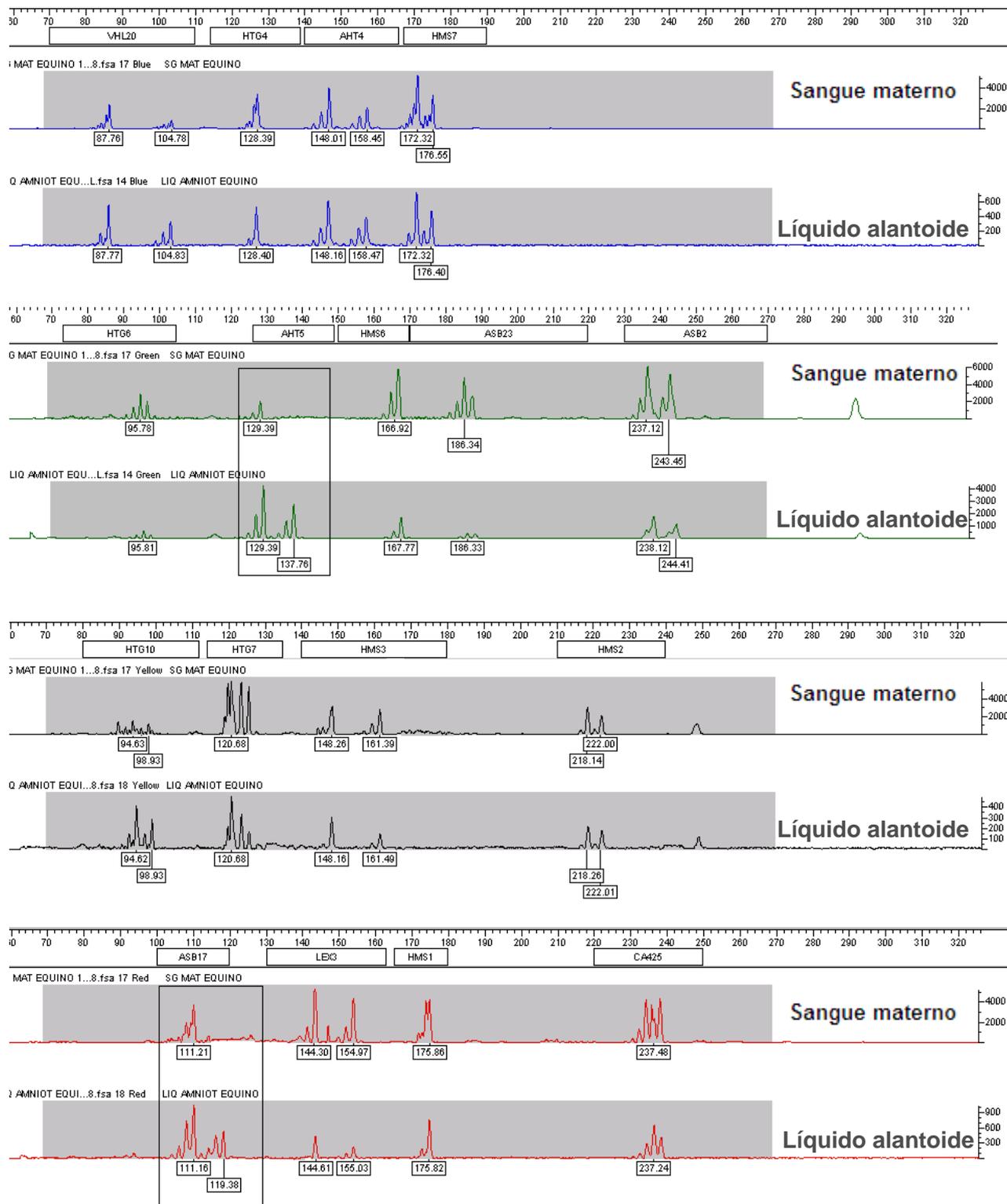


Figura 18: Eletroferograma 17 loci polimórficos (discriminados sempre na parte superior; exemplo: VHL20) a serem comparados. Os números indicados abaixo dos picos de fluorescência referem-se ao tamanho em pares de bases dos alelos determinados para cada marcador. Primeiro eletroferograma de cada fluorescência representa o genótipo materno e em segundo o do conceito. Foram marcados os loci em que os dois genótipos diferem (marcadores: AHT5 e ASB17).

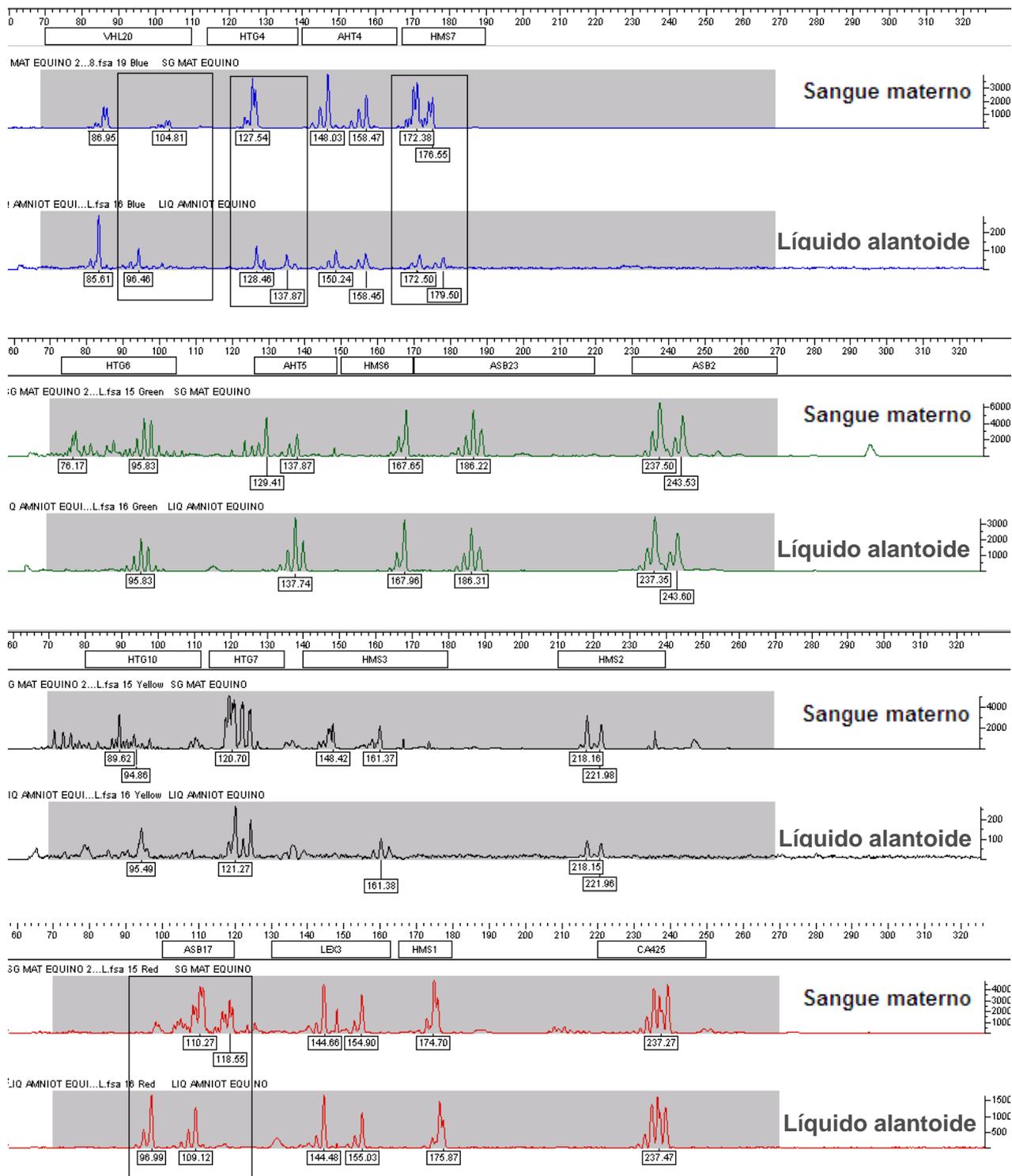


Figura 19: Eletroferograma 17 loci polimórficos a serem comparados. Os números indicados abaixo dos picos de fluorescência referem-se ao tamanho em pares de bases dos alelos determinados para cada marcador. Primeiro eletroferograma de cada fluorescência representa o genótipo materno e em segundo o do conceito. Foram marcados os loci em que os dois genótipos diferem (marcadores: VHL20, HTG4, HMS7 e ASB17).

5- Conclusão

Conclui-se que é possível realizar a punção de conceptos equinos, porém são necessários mais estudos a respeito da técnica. Nesse primeiro trabalho uma porta foi aberta para o surgimento de novos estudos, visando ao aprimoramento da técnica, haja vista a ocorrência de aborto/reabsorção. No entanto, comprovou-se que a sexagem a partir de células do concepto pode ser realizada com sucesso e que a equinocultura dispõe de uma nova técnica de sexagem fetal.

6- Referências bibliográficas

Abd-Elnaeim MMM, Leiser R, Wilsher S, Allen WR. Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. *Placenta*, 27: 1103-1113, 2006.

Allen WR. The Physiology of Early Pregnancy in the Mare. In: *American Association of Equine Practitioners. Proceedings...*, 46: 338-354, 2000.

Allen WR, Wilsher S, Stewart F, Ousey J, Fowden A. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. *Journal of Endocrinology*, 172: 237-246, 2002b.

Allen WR. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Journals of Reproduction and Fertility*, 121: 513-527, 2001.

Bongso, T. A.; Basrur, P. K. Prenatal diagnosis of sex in cattle by amniocentesis, *Vet. Rec.*, v. 96, n. 6, p. 124-126, 1975.

Bongso, T. A.; Basrur, P. K.; Younglai, E. V. Prediction of fetal Sex in cattle by testosterone levels in allantoic fluid, *J. Reprod. Fertil.*, v. 46, n. 2, p. 441-442, 1976.

Butler, J.M. *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Amsterdam; Boston, Elsevier Academic Press, 2005.

Bydlowski S. P.; Leyton J.; A tecnologia do DNA; *A Revista Oficial da ABCCMM*, n 36, 1998.

Carmo M.T.; Oliveira J.V.; Almeida M.T.; Alvarenga M.A. Sexagem em equinos através da avaliação ultrassonográfica da gônada fetal. In: *SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES*, 08, 2007, Costa do Sauípe. Anais...Costa do Sauípe: SBTE, 2007.

Crane, J.P.; Kopta, M.M. Genetic amniocentesis: impact of placental position upon the risk of pregnancy loss. *American Journal Obstetrics and Gynecology*, v.150: 813-816, 1984.

Curran, S. S.; Ginther, O.J. Ultrasonic diagnosis of equine fetal Sex by location of the genital tubercle. *J.Equine Vet. Sci.*, v. 9, p. 77-83, 1989.

Damiani, D.; Dichtchekian, V.; Setian, N. O Enigma da Determinação Gonadal, *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.44 n.3, 2000.

de Mestre AM, Bacon SJ, Costa CC, Leadbeater JC, Noronha LE, Stewart F, Antczak DF. Modeling trophoblast differentiation using equine chorionic girdle vesicles. *Placenta*, 29: 158-169, 2008.

Elejalde, B.R. *et al.* Prospective study of amniocentesis performed between weeks 9 and 16 of gestation: its feasibility risks, complications and use in genetic prenatal diagnosis. *American Journal of Medical Genetics*, v. 35, p.188-196, 1990.

Gerstenberg C, Allen WR, Stewart F. Cell proliferation patterns during development of the equine placenta. *Journals of Reproduction and Fertility*, 117: 143-152, 1999.

Ginther, O.J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2.ed. Cross Plains: *Equiservices*, 642p, 1992.

Golbus, M.S. *et al.* Prenatal diagnosis in 3.000 amniocenteses. *New England Journal of Medicine*, v.300: 157-163, 1979.

Hafez B, Hafez ESE. *Reprodução Animal*. 7ª Ed. Monole, São Paulo, 513 p., 2004.

Hasegawa, T.; Sato, F.; Ishida, N.; Fukushima, Y.; Mukoyama, H. Sex determination by simultaneous amplification of equine SRY and amelogenin genes, Tokyo Japão, *J. Vet. med. sci.*, 62(10):1109-1110, 2000.

Holder, R.D. Fetal Sex determination in the mare between 55 and 150 days gestation, *AAEP Proceedings*, v. 46: 321-324, 2000.

Jauniaux, E.; Cirigliano, V.; Adinolfi, M. Very early prenatal diagnosis on coelomic cells using quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Reprod Biomed online* 6(4): 494-498, 2003.

Kamimura, S.; Nishiyama, I. N.; Ookutsu, I. S.; Goto, K.; Hamanal, K. *Determination of bovine fetal sex by PCR using fetal fluid aspirated by transvaginal ultrasound-guided amniocentesis*, Kagoshima, Japan. Elsevier, 1996.

Lunn P, Vagnoni KE, Ginther OJ. The equine immune response to endometrial cups. *Journal of Reproductive Immunology*, 34: 203-216. 1997.

Machado, L. V. Genotipagem, sexagem molecular e verificação de pedigree em equinos por PCR quantitativo fluorescente, Centro de biociências e biotecnologia -NUDIM- Campos dos Goytacazes, *Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro*, 2007.

Milunsky, A. Sex chromosome and X-linked disorders, In: Milunsky A. *Genetic disorders and the fetus*. Plenum Press, Nova York, p. 157-208, 1979.

Nazareth, H. R. S.; Pinto Jr, W.; Andrade, J. A. D. Diagnóstico pré-natal de aberrações cromossômicas. Primeira experiência brasileira. *Revista Brasileira de Genética* IV n.3: 459-470, 1981.

Oliveira, D. A. A.; Kuabara, M. Y. A. genealogia, sua importância para o melhoramento e para a produção animal e os métodos de confirmação dos pedigrees. Pereira, J.C.C. *Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal*. Belo Horizonte, p.435-444, 2001.

Peippo, J.; Huhtinen, M.; Kotilainen, T. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction, Jokioinen Finlandia. *Theriogenology*, v 44, n. 5: 619-627, 1995.

Samper, J.C.; Pycock, J.F.; McKinnon, A.O. Fetal Sex determination, *Current therapy in equine reproduction*, Published Elsevier, p. 343-356, 2007.

Sharp DC. The early fetal life of the equine conceptus. *Animal Reproduction Science*, v.60-61: 679-689, 2000.

Sherlock, J., Cirigliano, V., Petrou, M. et al. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Ann. Hum. Genet.*, v. 62: 9–23, 1998.

Skidmore, J. et al. Micromanipulation of equine embryos to produce monozygotic twins. *Equine Veterinarian Journal*, v.3, Suppl. 8:126-128, 1989.

Stout TAE, Allen WR. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. *Journals of Reproduction and Fertility*, v.121: 771-775, 2001.

Tozaki, T.; Kakoi, H.; Mashima, S.; Hirota, K.; Hasegawa, T.; Ishida, N.; Miura, N.; Choi-Miura, N. H.; Tomita, M. Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. *J Vet Med Sci.*, v. 63: 1191-1197. 2001.

Wachtel, S. S. H-Y Antigen and the Biology of Sex Determination (Grune & Stratton, New York, 1983.

Wolf, A.; Gabaldi, S.H. Acompanhamento ultra-sonográfico da gestação em grandes animais, *Ciê. Agr. Saúde FEA*, Andradina, v. 2, n. 2: 77-83, 2002.

Wooding FBP, Morgan G, Fowden AL, Allen WR. A Structural and Immunological Study of Chorionic Gonadotrophin Production by Equine Trophoblast Girdle and Cup Cells. *Placenta*, 22: 749-767, 2001.

Número de punções	Numero das éguas	Idade gestacional da punção em dias	Não foi possível puncionar	Abortaram ou reabsorveram	Agulhas	Sexo confirmado
1	1	18			100 x 9	
2	2	23			30x7	
3	2	210	*		30x8	
4	2	210	*		100x9	
5	2	210			80x15	
6	3	21			30x7	
7	4	35			40x12	
8	5	45			30x7	
9	6	70	*		30x7	
10	6	70			30x8	
11	7	30	*		89x0,4	
12	7	30			30x7	
13	7	60			30x7	
14	8	60			30x7	
15	8	90	*		30x7	
16	8	90	*		40x12	
17	8	90		*	100x9	
18	9	120	*		30x8	
19	9	120			40x12	
20	9	150	*		89x0,4	
21	9	150			30x8	
22	10	210	*		30x7	
23	10	210			40x12	
24	10	240	*		30x8	
25	10	240	*		40x12	
26	10	240	*		80x15	
27	11	240	*		30x8	
28	11	240	*		100x9	
29	11	240			80x15	
30	12	150	*		30x8	
31	12	150		*	40x12	
32	13	150	*		30x8	
33	13	150			40x12	
34	14	90	*		30x7	
35	14	90			30x8	
36	15	120			30x7	
37	16	180	*		30x7	
38	16	180			40x12	
39	17	120	*		30x7	
40	17	120			40x12	

41	18	90	*		30x7	
42	18	90			30x8	
43	19	300	*		40x12	
44	19	300		*	40x16	
45	20	300	*		40x12	
46	20	300		*	40x16	
47	21	30			30x7	
48	22	21			30x7	macho
49	23	90			30x8	fêmea
50	24	180	*		30x8	
51	24	180			100 x9	fêmea
52	25	30		*	30x7	macho
53	26	150	*		89 x 0,4	
54	26	150	*		30x8	
55	26	150	*		40x12	
56	27	210	*		30x7	
57	27	210	*		40x12	
58	27	210	*		100 x9	
59	28	180	*		30x7	
60	28	180	*		40x12	
61	28	180	*		100 x9	
62	29	150	*		30x7	
63	29	150	*		40x12	
64	29	150	*		100 x9	

Apêndice A - Representação gráfica do número amostral, quantidade de éguas puncionadas, as idades gestacionais em que se encontravam, impossibilidade de realizar a punção, distúrbios causados pela punção e sexagem genética a partir de amostras obtidas. Obs.: o comprimento e o calibre das agulhas estão expressos em milímetros (40x12: 40 mm de comprimento e 12 mm de diâmetro).