

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

A Mula (*Equus mulus*) como Receptora de Embriões Equinos (*Equus caballus*): Aspectos Reprodutivos, Hormonais e Ultrassonográficos da Gestação

CARLOS EDUARDO CAMARGO

Tese de Doutorado

Porto Alegre – RS
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

A Mula (*Equus mulus*) como Receptora de Embriões Equinos (*Equus caballus*): Aspectos Reprodutivos, Hormonais e Ultrassonográficos da Gestação

Autor: **Carlos Eduardo Camargo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina Animal: Equinos na Área de Reprodução Animal, sob a orientação da **Professora Dra. Sandra Fiala Rechsteiner**

Porto Alegre – RS
Abril de 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Camargo, Carlos Eduardo

A Mula (*Equus mulus*) como Receptora de Embriões
Equinos (*Equus caballus*): Aspectos Reprodutivos,
Hormonais e Ultrassonográficos da Gestação / Carlos
Eduardo Camargo. -- 2018.

89 f.

Orientadora: Sandra Mara Fiala Rechsteiner.

Coorientador: Eduardo Leite Gastal.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto
Alegre, BR-RS, 2018.

1. equino. 2. reprodução. 3. transferência de
embriões. 4. mula. 5. desenvolvimento embrionário.
I. Fiala Rechsteiner, Sandra Mara, orient. II.
Gastal, Eduardo Leite, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

CARLOS EDUARDO CAMARGO

A Mula (*Equus mulus*) como Receptora de Embriões Equinos (*Equus caballus*) – Aspectos Reprodutivos, Hormonais e Ultrassonográficos da Gestação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina Animal: Equinos na Área de Reprodução Animal, sob a orientação da **Professora Dra. Sandra Fiala Rechsteiner.**

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Sandra Fiala Rechsteiner

Orientadora

Prof. Dr. Eduardo Leite Gastal

Co-orientador

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky

Membro da Comissão

Profa. Dra. Adriana Pires Neves

Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha esposa Carolina, minha grande amiga e companheira de todos esses anos e ao meu filho Pedro, o qual irei dedicar toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao chegar nesse momento tão importante da carreira acadêmica, não poderia deixar de agradecer a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de qualquer forma para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, pela coragem, vontade, determinação e principalmente pela força em todos os momentos.

Meu especial agradecimento aos meus pais por me ensinarem a lutar muito e sempre por tudo em minha vida. Obrigado Mãe e Pai, pela confiança em mim depositada em todos esses anos, pelo carinho e amor, que mesmo a distância, foram fundamentais em minha vida em todos esses anos. Não há palavras que expressem minha gratidão e meu amor.

Ao meu irmão, que sempre ao meu lado por muitos anos e alguns outros a distância, acreditou nos meus sonhos, ajudando e incentivando a minha profissão. Suas palavras de incentivo ficarão guardadas para sempre.

A Carolina, mais que uma esposa, uma grande amiga e companheira, pelo seu apoio incondicional mesmo durante os 9 meses de gestação e o primeiro ano do nosso amado Pedro e principalmente pela paciência nos momentos mais difíceis desses últimos anos.

Aos amigos e médicos veterinários Mário Duarte e Marília Pastorello, pelas primeiras oportunidades de estágios, primeiros trabalhos e por tudo que me ensinaram na reprodução equina. Devo muito a vocês!

Ao professor e amigo Marcio Segui, pelos primeiros incentivos dentro da reprodução animal ainda na graduação, bem como as oportunidades de aprimoramento profissional que foram essenciais em minha vida. Mas principalmente hoje, por todo apoio e companheirismo frente à Unidade Hospitalar de Fazenda e Equinos da PUCPR, local onde ocorreu todo experimento.

Ao professor Dr. Luiz Ernandes Kozicki, pelos ensinamentos, incentivos e principalmente pelas oportunidades de aprimoramento em minha prática de docência.

A professora Dra. Sandra Fiala Rechsteiner pela orientação e pelos ensinamentos passados através de sua vasta experiência e que mesmo a distância esteve sempre presente em todas as formas de comunicação.

Ao professor Dr. Eduardo Gastal, que prontamente abraçou a ideia do projeto se tornando co-orientador e engrandecendo todo esse trabalho pela pessoa que é, seja profissionalmente, mas principalmente pelo pessoal, dando conselhos e se tornando muito importante na minha

vida profissional e também pessoal. O meu muito obrigado também a Dra. Melba Gastal por todo apoio com as planilhas e estatística desse trabalho.

Ao médico veterinário e amigo Diego Lunelli pela parceria em todos esses anos, mas principalmente nesses últimos como companheiro de doutorado enfrentando junto várias viagens a Porto Alegre para cumprimentos dos créditos.

A professora e amiga Dra. Cláudia Pimpão, pela confiança e apoio a todo esse projeto permitindo que a PUCPR me desse todo o suporte para que o trabalho chegasse até aqui.

A toda equipe do professor e amigo, Dr. Pedro Michelotto, pela amizade, companheirismo e principalmente no auxílio com as dosagens hormonais por ELISA. Fernanda Zettel e Fernanda Mendes, sempre serei grato a vocês.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo financiamento de um ano do projeto através do fornecimento de bolsa de doutorado.

As empresas Botupharma e Zoetis pelo apoio com boa parte dos hormônios envolvidos no projeto e vacinas.

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná, instituição que me acolhe desde os tempos de universitário até hoje como docente a quase 9 anos. Obrigado pela confiança e por permitir que esse projeto fosse aqui realizado.

Aos funcionários da Fazenda Experimental Gralha Azul da PUCPR: Marcelo e Flávio, por todo suporte junto ao manejo dos animais do projeto nesses 3 anos intensos e a Priscila e Josyane por todo apoio administrativo. Também agradeço ao pessoal da segurança Rafael, Michel, Tadeu e Evandro por todo auxílio no monitoramento dos animais que estavam próximos ao parto. Obrigado por todas as madrugadas que nos auxiliaram juntos ao parto dos animais.

Ao Grupo de Estudos em Reprodução Equina da PUCPR, por todo apoio durante esse projeto, vocês foram muito importantes: Karina Camargo, Nathália Gonçalves, Daniela Cardozo, Marcela Miqueletto e Camila Meneghini. Especial agradecimento ao hoje Médico Veterinário Rodrigo Macan, que ao longo da sua graduação foi o braço direito desse projeto, sempre ao lado nas situações boas, mas também nas horas mais complicadas.

Aos professores Eduardo Malschitzky e Adriana Pires Neves pelo aceite e principalmente pela participação na banca de defesa, o que com certeza irá acrescentar e muito nesse momento.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que fizeram com que de alguma forma esse projeto saísse do papel e se tornasse essa dimensão.

“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem Por quê?
Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo: Por que não?”

(George Bernard Shaw)

RESUMO

Autor: Carlos Eduardo Camargo

Orientadora: Sandra F. Rechsteiner

O Brasil é um dos países com o maior número de transferências de embriões de equinos do mundo, mas as éguas receptoras são escassas e caras. Uma alternativa é usar mulas acíclicas como receptoras de embriões equinos. O objetivo deste estudo foi comparar pela primeira vez o desenvolvimento embrionário e fetal precoce em mulas e éguas receptoras do 10º ao 60º dia de gestação. Este estudo foi realizado na Fazenda Experimental Gralha Azul da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Cinco éguas de doadores de embriões com idades entre 4 e 10 anos foram utilizadas. Foram utilizados dois grupos de receptores: 10 éguas cíclicas com idades entre 4 e 15 anos (grupo controle) e 7 mulas acíclicas com idades entre 6 e 12 anos. Os animais foram mantidos em piquetes e/ou estábulos e tiveram acesso a água e sal mineral *ad libitum*, bem como a uma fonte de volumoso e concentrado. As éguas doadoras foram monitoradas diariamente por ultrassonografia transretal (transdutor linear de 5 MHz, A6V Sonoscape, China) após o início do estro. As éguas foram inseminadas artificialmente usando sêmen fresco de um garanhão com fertilidade comprovada. A coleta de embriões das éguas foi realizada 8 dias após a ovulação. Antes da transferência do embrião, as éguas receptoras cíclicas eram examinadas diariamente por ultrassonografia para usar a melhor sincronia com a ovulação da doadora. As mulas acíclicas foram preparadas antes da transferência do embrião com a administração de 17 beta-estradiol (10 mg/mL, 1 mL, im) no dia da ovulação da doadora, e após 2 dias quando a presença de edema uterino foi confirmada, com a administração de Altrenogest (60 mg/mL, 5 mL, im). O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia, 10 dias após a ovulação da doadora. Quando o diagnóstico foi confirmado, a avaliação ultrassonográfica foi realizada diariamente até o 60º dia de gestação. O primeiro dia de detecção da vesícula embrionária foi o Dia 10 por ultrassonografia em ambas as espécies e Dia $20,9 \pm 1,3$ (Média \pm DP) e $21,9 \pm 0,9$ por palpação transretal em mulas e éguas respectivamente. A fixação da vesícula ocorreu em média no dia $15,7 \pm 1,1$ em mulas e $16,6 \pm 1,7$ em éguas. O embrião propriamente dito foi detectado pela primeira vez em mulas (no dia $19,9 \pm 1,1$) em comparação com as éguas ($20,4 \pm 1,3$). O batimento cardíaco foi observado posteriormente em muares ($23,4 \pm 1,4$) do que em éguas ($22,6 \pm 0,8$). O saco alantóide foi detectado pela primeira vez entre os dias 23 e 26 ($25,3 \pm 1,1$ e $24,6 \pm 1,0$ em mulas e éguas, respectivamente) e o cordão umbilical foi detectado pela primeira vez no dia 39 ($39,7 \pm 2,1$ x $39,6 \pm 1,5$ em mulas e éguas, respectivamente). Os diâmetros ovarianos para os ovários esquerdo e direito foram semelhantes para as mulas ($21,4 \pm 0,4$ vs. $21,8 \pm 0,4$ mm) e para as éguas ($45,1 \pm 0,4$ vs $46,0 \pm 0,4$). Entretanto, o diâmetro ovariano das éguas ($45,5 \pm 0,3$ mm) foi duas vezes maior ($P < 0,0001$) que as mulas ($21,6 \pm 0,3$ mm). Apenas duas mulas apresentaram o CL acessório que foi observado pela primeira vez nos dias 49 e 51. Dentro dos grupos não houve diferenças entre os cornos esquerdo e direito, gravídicos e não-gravídicos. A média geral não foi diferente entre as mulas ($24,6 \pm 3,1$ mm) e as éguas ($25,4 \pm 0,1$ mm). Como conclusão, de acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo comparativo sobre desenvolvimento embrionário e fetal precoce entre mulas acíclicas e éguas receptoras de embriões equinos. Numerosas semelhanças foram encontradas nos aspectos estudados. Tais achados, associados ao fato de que potros vivos e saudáveis foram produzidos, sugerem que o uso de mulas acíclicas pode ser considerado como uma alternativa para aumentar a disponibilidade de receptoras em programas equinos de TE.

Palavras-chave: equino; reprodução; transferência de embriões; mula; desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

Author: Carlos Eduardo Camargo

Adviser: Sandra Fiala Rechsteiner

Brazil is one of the countries with the largest number of equine embryo transfers in the world, but recipients mares are scarce and expensive. One alternative is to use acyclic mules as recipients for equine embryos. The aim of this study was to compare for the first time the embryonic and early fetal development in recipient mules and mares from day 10 to 60 of pregnancy. This study was conducted at the Experimental Farm Gralha Azul of the Pontifical Catholic University of Paraná. Five embryo donor mares aged 4 to 10 years were used. Two groups of recipients were used: 10 cyclic mares aged 4 to 15 years (control group), and 7 acyclic mules aged 6 to 12 years. Animals were kept in paddocks and/or stables and had access to water and mineral salt ad libitum, as well as to a source of roughage and concentrate. Donor mares were monitored daily by transrectal ultrasonography (5-MHz linear transducer, A6V Sonoscape, China) after the beginning of estrus. The mares were artificially inseminated using fresh semen from a stallion with proven fertility. Embryo collection from the mares was performed 8 days after ovulation. Before embryo transfer, cyclic recipient mares were examined daily by ultrasonography to use the most synchronous with the donor's ovulation and have not received any hormonal treatment. The acyclic mules were prepared before the embryo transfer with the administration of 17 beta-estradiol (10 mg/mL, 1 mL, i.m.) on the day of the donor's ovulation, and after 2 days when the presence of uterine edema was confirmed, with the administration of Altrenogest (60 mg/mL, 5 mL, i.m.). The pregnancy diagnosis was carried out by ultrasonography 10 days after ovulation in the donor. When the diagnosis was confirmed, ultrasonographic assessment was carried out daily until day 60 of pregnancy. The first day of detection of an embryonic vesicle was Day 10 by ultrasound in both species and day 20.9 ± 1.3 (Mean \pm SD), and 21.9 ± 0.9 by transrectal palpation in mules and mares respectively. Fixation of the vesicle occurred on mean day 15.7 ± 1.1 in mules and 16.6 ± 1.7 in mares. The embryo proper was first detected in mules (on day 19.9 ± 1.1) compared to mares (20.4 ± 1.3). The heart beat was observed later in mules (23.4 ± 1.4) than in mares (22.6 ± 0.8). The allantoic sac was first detected between days 23 and 26 (25.3 ± 1.1 and 24.6 ± 1.0 in mules and mares, respectively) and the umbilical cord was first detected on day 39 (39.7 ± 2.1 x 39.6 ± 1.5 in mules and mares, respectively). The ovarian diameters for left and right ovaries were similar for mules (21.4 ± 0.4 vs. 21.8 ± 0.4 mm) and for mares (45.1 ± 0.4 vs. 46.0 ± 0.4). However, the ovarian diameter of the mares (45.5 ± 0.3 mm) was two times larger ($P < 0.0001$) than the mules (21.6 ± 0.3 mm). Within groups there were no differences between left and right and gravid and non-gravid horns. Data were combined for comparison of the endometrial diameter between mules and mares. The overall mean was not different between mules ($24.6 \pm 3.1 \pm 0.1$ mm) and mares (25.4 ± 0.1 mm). However, day ($P < 0.003$) and group-by-day ($P < 0.0001$) effects were detected. Only two mules presented accessory CL that was observed for the first time on days 49 e 51. In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first comparative study on embryo and early fetal development between noncycling mules and mares used as ET recipients of horse-horse embryos. Numerous similarities in embryo and early fetal development, and endocrinology aspects were seen. The findings of this study in mules, associated with the fact that alive and healthy offspring were produced, the use of mules may be considered as an alternative to increase the availability of recipients in equine ET programs.

Keywords: equine; reproduction; embryo transfer; mule; embryonic development.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Table 1. Mean (\pm SD) days at first detection and corresponding diameters for ultrasonographically identifiable characteristics of equine (horse-horse) conceptus examined daily between days 10 and 60 of pregnancy in mules and mares..... | 62 |
| Table 2. Mean (\pm SD) days at first detection and measurements of the embryo proper in mule and mare recipients..... | 63 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figure 1. Graphical representation of the nine uterine segments: anterior right horn (RA), medial right horn (RM), posterior right horn (RP), anterior left horn (LA), medial left horn (LM), posterior left horn (LP), anterior uterine body (BA), medial uterine body (BM), and posterior uterine body (BP)..... | 64 |
| Figure 2. Diameter of embryonic vesicle from days 10 to 38 of pregnancy in 7 mules and 7 mares..... | 65 |
| Figure 3. Crown-rump length (C-R), width (W) and diameter (D) of embryo/fetus from days 21 to 60 of pregnancy in 7 mules and 7 mares..... | 66 |
| Figure 4. Percentage of the embryonic vesicle constituted by the sac yolk sac from day 24 to 40 of pregnancy in 7 mules and 7 mares..... | 67 |
| Figure 5. Main aspects of embryonic and fetal development in mules and mares recipient of equine (horse-horse) embryo..... | 68 |
| Figure 6. Ultrasonographic characteristics of early pregnancy in a recipient mule carrying an equine (horse-horse) embryo fetus. (A) 10 th day of pregnancy – echogenic spots located dorsally and ventrally in the embryonic vesicle; (B) 11 th day of pregnancy; (C) 12 th day of pregnancy; (D) 13 th day of pregnancy; (E) 14 th day of pregnancy; (F) 15 th day of pregnancy – spherical shape of the vesicle; (G) 20 th day of pregnancy – irregular vesicle shape; (H) 25 th day of pregnancy – start of allantoic formation; (I) 30 th day of pregnancy – approximately 50% of the allantoid-occupied vesicle; (J) 35 th day of pregnancy – embryo in the dorsal pole of the vesicle; (K) 45 th day of pregnancy – presence of umbilical cord; (L) 55 th day of pregnancy – end of descent of the fetus..... | 69 |

| | |
|---|----|
| Figure 7. Mean (\pm sem) diameter of left and right ovaries for mule and mare recipients of equine (horse-horse) embryo..... | 70 |
| Figure 8a and 8b. Profile of the largest follicles for mules and mares..... | 71 |
| Figure 8c. Distribution of the number of mules and mares with follicles ≥ 25 mm during the experimental period..... | 72 |
| Figure 9. Mean (\pm sem) endometrial diameter for mule and mare recipients of equine (horse-horse) embryo..... | 73 |
| Figure 10. Temporal relationships amongst endometrial echotexture and uterine tone from days 0 to 60 of the pregnancy in mule and mare recipients..... | 74 |
| Figure 11. Mean (\pm sem) systemic levels of eCG and progesterone on various weeks of pregnancy of mules and mare recipients of equine (horse-horse) embryo.. | 75 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| CLP | Corpo lúteo primário |
| CLS | Corpo lúteo secundário |
| dCG | Gonadotrofina coriônica asinina |
| E2 | Estrógeno |
| eCG | Gonadotrofina coriônica equina |
| EP | <i>Embryo proper</i> |
| FSH | Hormônio folículo estimulante |
| GnRH | Hormônio liberador de gonadotrofina |
| hCG | Gonadotrofina coriônica humana |
| IA | Inseminação artificial |
| IETS | <i>International Embryo Transfer Society</i> |
| LA | Longa ação |
| LH | Hormônio luteinizante |
| P4 | Progesterona |
| PGF2 α | Prostaglandina |
| TE | Transferência de embriões |

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| AGRADECIMENTOS | viii |
| RESUMO | xi |
| ABSTRACT | ix |
| SUMÁRIO | xi |
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 Objetivos gerais | 16 |
| 2.2 Objetivos específicos | 16 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 3.1 A transferência de embriões em equídeos | 16 |
| 3.1.2 Sincronização do estro entre doadoras e receptoras | 18 |
| 3.1.3 A técnica de coleta e transferência de embriões em equídeos | 19 |
| 3.1.4 A utilização de receptoras de embrião cíclicas e acíclicas | 21 |
| 3.2 Transferência de Embriões Interespécies | 23 |
| 3.3 A gestação em mulas | 25 |
| 3.4 Desenvolvimento embrionário em equídeos | 27 |
| 3.5 Endocrinologia da gestação em equídeos | 31 |
| 3.5.1 Dinâmica folicular durante a gestação inicial | 31 |
| 3.5.2 Formação de cálices endometriais e gonadotrofina coriônica equina | 32 |
| 4 ARTIGO | 36 |
| 1. Introduction | 38 |
| 2. Materials and methods | 39 |
| 2.1 Animals | 39 |
| 2.2. Estrous cycle synchronization | 40 |

| | |
|--|----|
| 2.3. Artificial insemination..... | 41 |
| 2.4. Embryo recovery and transfer..... | 41 |
| 2.5. Pregnancy diagnoses and hormonal treatment..... | 42 |
| 2.6. Embryo and fetal assessment during pregnancy..... | 42 |
| 2.7. Ovary and uterus..... | 43 |
| 2.8. Blood samples and hormone assays..... | 43 |
| 2.9. Statistical analyses..... | 44 |
| 3. Results..... | 44 |
| 3.1. Embryo/fetus and uterus interactions during the first 60 days of pregnancy..... | 45 |
| 3.1.1. Embryonic Vesicle..... | 45 |
| 3.1.2. Embryo proper and fetus..... | 45 |
| 3.2. Ovarian dynamics..... | 46 |
| 3.2.1. Ovarian diameter..... | 46 |
| 3.2.2. Largest Follicle..... | 47 |
| 3.2.3. Primary and accessory corpus luteum..... | 47 |
| 3.3. Uterine dynamics..... | 47 |
| 3.3.1. Endometrial diameter..... | 47 |
| 3.3.2. Endometrial Echotexture and Uterine Tone..... | 48 |
| 3.4. Hormone profiles..... | 48 |
| 4. Discussion..... | 48 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 78 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 79 |

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos quinze anos, a Equideocultura foi uma atividade em destaque com significativo crescimento no Brasil e no mundo. Em 2015 a indústria do cavalo foi responsável por movimentar cerca de 16 bilhões de reais na economia nacional, empregando cerca de 3 milhões de trabalhadores de forma direta e indireta (LIMA e CINTRA, 2016). No entanto, a criação de equinos de alto valor genético enfrenta diversas barreiras. Uma delas se deve ao fato de que a alta seleção genética dessa espécie é baseada no padrão racial e desempenho atlético e não no aspecto reprodutivo, sendo assim diversos animais com problemas de fertilidade são selecionados como reprodutores ou matrizes. Desta forma, alternativas para melhorar os índices reprodutivos ao mesmo tempo melhorando a genética dos animais e baixando o custo, são almejadas pelos criadores, o que incentiva a utilização de biotecnologias ligadas à reprodução como a Inseminação Artificial (IA) e Transferência de Embriões (TE) (PAPA et al., 2005).

A TE é uma técnica reprodutiva comum na medicina veterinária que consiste na coleta de um embrião de uma fêmea doadora, geralmente de alto valor genético, e a transferência do mesmo para uma fêmea receptora, encarregada de levar a gestação a termo. Como vantagens, esta biotecnologia permite com que éguas possam produzir mais de um potro ao ano, se torna uma ferramenta para matrizes com problemas de saúde geral ou disfunção reprodutiva, possibilita que éguas mais velhas doem embriões a receptoras mais novas, bem como permite que as éguas que estão em carreira atlética possam deixar descendentes (SQUIRES et al., 1999; CAMPBELL, 2014; MCCUE e SQUIRES, 2015).

As primeiras transferências de embriões em equinos no Brasil aconteceram em 1986 e desde então o número de centros de reprodução equina vem aumentando significativamente no país. Em 2010, eram dezenas e que em sua maioria estavam concentrados nos estados de Minas Gerais e São Paulo (ALVARENGA, 2010). Atualmente se acredita que já são centenas

espalhadas de norte a sul do Brasil as quais são responsáveis por tornar o país o maior produtor de embriões equinos do mundo, segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (PERRY, 2015).

A Argentina e os Estados Unidos seguem o Brasil no ranking dos países que mais utilizam a TE em equinos no mundo. Segundo publicação do Comitê Estatístico IETS, em 2010 o Brasil foi responsável por 15.200 coletas de embrião equino, a Argentina, 12.655 e os EUA, 9.933. Já no ano de 2015, o Brasil foi responsável por realizar perto de 26.000 coletas de embrião nessa espécie, e por transferir quase 18.500 embriões (STROUD, 2010; PERRY, 2015).

A escolha e o manejo das éguas receptoras de embrião, são fatores cruciais para o sucesso de um programa comercial de TE, afetando significativamente as taxas de prenhez e de perdas embrionárias (SQUIRES et al., 1999; CARNEVALE et al., 2000). No Brasil, o mercado de receptoras de embrião se encontra aquecido, o que gerou recentemente uma grande valorização dessa categoria animal, tornando-se difícil encontrar éguas nos padrões desejáveis para essa categoria com preços razoáveis, consequentemente éguas fora desse padrão são selecionadas (ALVARENGA, 2010). Com a dificuldade em se obter receptoras de qualidade, novas opções de receptoras começam a surgir, sendo uma delas os muares, que são animais muito saudáveis e com grande longevidade, ou seja, receptoras desta espécie poderiam ser utilizadas durante um período de tempo bastante longo.

Durante os últimos 20 anos, alguns poucos estudos (DAVIES et al., 1985; QUINTERO e ZARCO, 1996; CAMILLO, 2003), e também relatos sem comprovação científica de profissionais que utilizaram mulas como receptoras de embrião, foram o incentivo para o desenvolvimento dessa pesquisa. Tem-se observado que as mulas apresentam exigências nutricionais menores que as das éguas, possibilitando boa produção de leite mesmo em condições pouco favoráveis (RIBEIRO, 2012). De acordo com relatos de profissionais que

utilizaram mulas como receptoras, a habilidade materna desses animais é muito boa, pois além da produção de leite satisfatória possuem um instinto materno forte, defendendo a cria. As mulas acíclicas respondem bem ao protocolo hormonal com progesterona e além disso são versáteis, podendo receber embrião equino, muar ou mesmo asinino e possuem um custo semelhante aos das éguas receptoras (RIBEIRO, 2012).

Camillo et al. (2003) publicaram um dos poucos estudos envolvendo muares como receptoras de embrião nos últimos anos, porém não abordaram aspectos relacionados a dinâmica folicular, embrionária, fetal e a endocrinologia durante a gestação em mulas receptoras de embrião equino. Sendo assim, um maior conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva das fêmeas muares pode proporcionar a possibilidade de utilizar as mesmas como receptoras de embrião em programas comerciais que utilizam esta biotecnologia, inclusive podendo incrementar os resultados obtidos. O objetivo deste estudo foi avaliar aspectos reprodutivos, hormonais e ultrassonográficos de mulas acíclicas receptoras de embriões equinos durante a fase inicial da gestação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo geral desse projeto foi verificar a viabilidade do uso de mulas acíclicas como receptoras de embriões equinos.

2.2 Objetivos específicos

Verificar a resposta de protocolos hormonais a base de estrógeno e progesterona em mulas acíclicas como receptoras de embrião equino;

Verificar a dinâmica folicular em mulas durante os primeiros 60 dias da gestação quando comparados a éguas receptoras de embrião;

Verificar a dinâmica embrionária e fetal em mulas durante os primeiros 60 dias da gestação quando comparados a éguas receptoras de embrião;

Verificar os níveis hormonais de progesterona e eCG em mulas durante as primeiras 17 semanas da gestação quando comparados a éguas receptoras de embrião.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A transferência de embriões em equídeos

A TE é uma técnica disseminada na maioria das associações de criadores de equinos, sendo o Brasil, a Argentina e os Estados Unidos da América os países que possuem o maior número de embriões transferidos por ano (IETS, 2015).

O primeiro relato de sucesso utilizando esta biotecnologia foi descrito por Allen e Rowson, em 1972 na Inglaterra. Esses autores realizaram a transferência cirúrgica de embriões híbridos (mula e bardoto) para uma jumenta e duas éguas. Dessa forma podemos afirmar que a primeira transferência de embriões de equídeos realizada com sucesso na história foi através de cruzamentos interespécies antes mesmo da transferência entre equinos de mesma espécie. A

técnica consistia na coleta e transferência cirúrgica via laparotomia, flanco ou linha média (ALLEN, 2005; KRAEMER, 2013).

Em equinos, a primeira transferência de embriões bem-sucedida e que gerou nascimentos foi relatada em 1974 no Japão (OGURI e TSUTSUMI, 1974). Dezoito embriões foram coletados pelo método não cirúrgico em éguas pônei utilizando um procedimento que havia sido publicado em 1972 também por Oguri e Tsutsumi (OGURI e TSUTSUMI, 1972). Em 1974, quinze blastocistos foram transferidos também pelo método não cirúrgico para o útero de 15 éguas receptoras, resultando em 6 gestações e 4 nascimentos.

A partir deste momento a TE foi difundida para diversos países, sendo considerada uma das biotécnicas mais utilizadas na reprodução assistida de equinos (KRAEMER, 2013; MCCUE e SQUIRES, 2015).

As primeiras transferências de embriões na espécie equina no Brasil foram descritas em 1987 através do método cirúrgico (FLEURY et al., 1987) e pelo método não cirúrgico (MEIRA e HENRY, 1991).

O sucesso em um programa comercial de TE depende do reconhecimento de fatores que afetam tanto as taxas de gestação quanto as perdas embrionárias. Dentre esses entraves, são descritos como principais: a qualidade da égua receptora, o manejo da doadora, a sincronização entre doadora e receptora e a habilidade do técnico (CARNEVALE et al., 2000).

Em relação as receptoras, Squires et al. (1999) e Carnevale et al. (2000) demonstraram que o fator mais importante é a escolha e o manejo das receptoras. Desde o momento em que o animal for incorporado ao plantel ele deverá passar por um rigoroso exame seleção, onde é importante avaliar a idade, condição corporal, conformação da genitália externa, patologias uterinas e ovarianas e funcionalidade das glândulas mamárias.

No Brasil, o mercado de receptoras encontra-se aquecido o que gerou ultimamente uma grande valorização dessa categoria animal, com isso novas opções de receptoras começam a aparecer, sendo uma delas os muares.

3.1.2 Sincronização do estro entre doadoras e receptoras

A sincronização do estro e da ovulação entre doadoras e receptoras na espécie equina quando realizada de forma errônea, acaba afetando as taxas de prenhez nas receptoras (CAMARGO, 2008), principalmente devido a longa fase de estro que as éguas apresentam e pela dificuldade que se tem em controlar o crescimento folicular (DOUGLAS, 1986).

A sincronização do estro e ovulação entre doadoras e receptoras representa um desafio maior quando comparada com outras fêmeas de animais domésticos, em contrapartida as éguas permitem um grau maior de assincronia comparada a outras espécies domésticas (bovinos e outros ruminantes) (WILSHER et al., 2006).

Embora os fatores descritos possam interferir nos resultados obtidos, a espécie equina apresenta como vantagem o fato de que o intervalo entre ovulação da doadora e receptora é maior, sendo esta espécie a menos rigorosa em suas exigências para sincronização da ovulação entre doadora e receptora no momento da TE, para o alcance de aceitáveis taxas de prenhez (ALLEN, 2005).

Existem controvérsias em relação a este intervalo, uma vez que diversos estudos demonstraram que os melhores índices de prenhez obtidos com éguas receptoras ocorrem quando a ovulação da doadora ocorre entre os dias +1 e -3 em relação às éguas receptoras (considerando “0” como o dia da ovulação) (PERES et al., 2007; CAMARGO et al., 2013; PANZANI et al., 2014). No entanto, outros pesquisadores demonstraram que essa janela pode ser mais flexível, e que o intervalo de sincronização entre doadoras e receptoras não precisa ser

tão restrito quanto os descritos anteriormente (WILSHER et al., 2006; JACOB et al., 2012). Taxas de prenhez aceitáveis (70%) foram obtidas mesmo quando a égua receptora ovulou 4 e 5 dias após a égua doadora (JACOB et al., 2012), o que demonstra que mais relevante que a sincronia entre doadora e receptora é o número de dias pós-ovulação que a receptora apresenta no momento da transferência, conforme salientado por Carnevale et al. (2000).

Além de uma boa sincronização, é preconizado que duas ou três receptoras devem ser preparadas para cada doadora, sendo que aquela com melhor sincronia e com melhores condições uterinas deve ser escolhida para a transferência (MCCUE e SQUIRES, 2015).

3.1.3 A técnica de coleta e transferência de embriões em equídeos

O embrião equino leva em média de 144-168 horas para percorrer o oviduto e entrar no útero (BATTUT et al., 2000) e por essa razão, a lavagem uterina para a recuperação do embrião deve ocorrer entre os dias 7 ou 8 após a ovulação (dia 0) momento o qual o embrião já está em expansão em fase de blastocisto e com medidas próximas de 300 µm (ALLEN, 2005).

Lavagens uterinas realizadas antes do sexto dia após a ovulação provavelmente não resultarão em recuperação do embrião e lavagens realizadas no sexto dia estão associados com uma taxa mais baixa de recuperação de embriões em comparação com aquelas realizadas após o dia 6 (BATTUT et al., 1998).

Embriões mais velhos, de 9 e 10 dias devido ao aumento da sua relação volume-superfície, podem ser mais suscetíveis a danos durante o procedimento (SQUIRES e GARCIA, 1985). Para a recuperação de embriões equinos, podem ser utilizados dois métodos: o método cirúrgico e o não cirúrgico, sendo esse último o mais utilizado na rotina (SQUIRES et al., 2003). A colheita não cirúrgica dos embriões é realizada pela via transvaginal, descrito primeiramente em equinos por Oguri e Tsutsumi (1972), que utilizaram um cateter de três vias.

Na colheita dos embriões de forma não cirúrgica são utilizadas sondas de Foley que possuem na extremidade um balão de capacidade para 75 mL, e cujo comprimento pode ser ampliado com mangueira plástica siliconizada. Após a introdução da sonda através da cérvix e colocação da mesma no corpo uterino, esse balão pode ser inflado com volume de ar que varia de 35 a 55 mL dependendo do tamanho da égua (FLEURY et al., 2001; MCCUE e SQUIRES, 2015). Após inflada, a sonda é tracionada para ser mantida em íntimo contato com a porção uterina da cérvix (FLEURY et al., 2001; SQUIRES et al., 2003). O extremo posterior da sonda pode ser ligado a um circuito de duas vias ou ser conectado diretamente no filtro que terá como objetivo reter o embrião. (VANDERWALL e WOODS, 2007; MCCUE e SQUIRES, 2015).

O embrião é recolhido por uma lavagem uterina (“flushing”) da égua doadora, utilizando para isso de 1 a 3 litros de meios apropriados (Exemplo: solução de Ringer Lactato) previamente aquecida a 37°C dividida em 3 etapas, ou seja, 1 litro por etapa em média. Quando o cateter se encontra bem posicionado procede-se à introdução do meio de lavagem e sua posterior retirada por sifonagem. Para facilitar este procedimento, uma massagem uterina associada a elevação dos cornos uterinos auxilia de forma positiva na retirada do fluido (RIERA, 2009; MCKINNON et al., 2011). Após o término da lavagem, o filtro é levado ao laboratório onde em placa de Petry se inicia a procura do embrião. Quando localizado, o embrião é identificado e classificado quanto à morfologia segundo McKinnon e Squires (1988).

A transferência pelo método não cirúrgico é a mais utilizada devido à facilidade e o processo é semelhante ao da IA sendo que o embrião é colocado em uma pipeta de inseminação e transferido para o corpo do útero (OGURI e TSUTSUMI, 1974).

3.1.4 A utilização de receptoras de embrião cíclicas e acíclicas

O uso de éguas receptoras cíclicas e acíclicas em programas de TE é uma prática comum na reprodução equina. No entanto, existem fatores limitantes nesses programas, como por exemplo o número reduzido de éguas receptoras, bem como a qualidade das mesmas durante a época de reprodução, especialmente em início e final da temporada de monta (GRECO, 2016).

A sincronização do estro em equinos pode ser realizada de diferentes formas: através do controle folicular intensivo de doadoras e receptoras ou através de terapia hormonal, seja com receptoras cíclicas ou mesmo acíclicas, ou seja, que não estão ovulando (MCCUE e SQUIRES, 2015)

Em programas comerciais em larga escala, as éguas receptoras de embriões são mantidas em grandes grupos e frequentemente verificadas por palpação transretal e ultrassonografia para determinar a melhor sincronia de estro e ovulação com as éguas doadoras de embriões (SQUIRES et al., 1999; RIERA, 2011).

A avaliação diária de éguas receptoras é uma atividade dispendiosa e demorada que requer pessoal bem treinado para realizar grande número de exames e determinação adequada da sincronia da ovulação com éguas doadoras de embriões (ZERLOTTI, 2012; OLIVEIRA NETO et al., 2018).

Quando a disponibilidade de receptoras é pequena, o uso da hormonioterapia é fundamental para sincronizar doadoras e receptoras de embrião equino. Com esta finalidade diferentes protocolos hormonais são descritos na literatura a fim de facilitar o trabalho a campo, os quais envolvem o uso de prostaglandina F_{2α} ou seus análogos, hormônios progestágenos, estrogênios e agentes de indução da ovulação, como gonadotrofina coriônica humana (hCG) e agonistas do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), por exemplo, acetato de deslorelinha e histrelina (KAERCHER et al., 2013; GRECO et al., 2016; PINTO et al., 2017).

Os hormônios prostaglandina, deslorelinha e/ou hCG têm sido utilizados na tentativa da sincronização da ovulação em éguas de forma mais econômica quando comparada ao uso de progestágenos (SQUIRES, 1993).

A combinação de progesterona e estradiol-17 β também têm se mostrado a mais eficiente, pois esse tratamento inibe o desenvolvimento folicular de forma mais uniforme do que a progesterona utilizada isoladamente. O resultado é uma menor variação no momento da ovulação. Progesterona (300 mg/mL) e estradiol-17 β (10 mg) em veículo oleoso são administrados via intramuscular diariamente durante 10 dias, com 10 mg de prostaglandina (PgF2 α), também intramuscular, aplicada no dia 10 (BRINSKO et al., 2011a).

Com a grande disseminação da transferência de embriões em todo o Brasil e em outros países, o uso de éguas receptoras acíclicas tornou-se uma rotina comum para aumentar a oferta de receptoras. A utilização dessas éguas como receptoras de embriões se torna uma alternativa viável, uma vez que as taxas de prenhez e de mortalidade embrionária são semelhantes comparado as éguas cíclicas (GRECO et al., 2012; KAERCHER et al., 2013; OLIVEIRA NETO et al., 2018).

Greco et al. (2012) obtiveram uma taxa de prenhez semelhante ao comparar o uso de éguas receptoras cíclicas e acíclicas. De 458 éguas gestantes, 139 eram acíclicas e 319 cíclicas, o que resultou em uma taxa de prenhez de 57,6% e 44,5%, semelhante ao observado por Carnevale et al. (2000) e Rocha Filho et al. (2004), em receptoras acíclicas.

O uso de mulas cíclicas como receptoras de equinos e asininos mostrou-se viável, levando ao nascimento de produtos normais tanto através de transferência pelo método cirúrgico (DAVIES et al., 1985), quanto pelo método não cirúrgico (CAMILLO et al., 2003). Ambos os pesquisadores citaram a dificuldade de sincronização entre doadora e receptoras como limitante da técnica devido a irregularidade do ciclo estral das mulas enquanto que no

único estudo que utilizou mulas acíclicas tratadas com protocolo hormonal os resultados não foram satisfatórios pois nenhuma gestação foi obtida. (CAMILLO et al., 2003).

Até o momento não foram encontrados na literatura, estudos que descrevam o padrão de desenvolvimento embrionário e fetal durante a gestação em mulas receptoras acíclicas tratadas com estrógenos e progestágenos exógenos para manter a gestação.

3.2 Transferência de Embriões Interespécies

A TE entre espécies diferentes demonstrou ser bem-sucedida em equinos e muares (ALLEN, 1992); no entanto, quando trata-se de cruzamentos interespécies, se observa uma incidência de perda gestacional mais elevada em éguas que são cobertas ou inseminadas por jumentos do que em éguas cobertas por garanhões (ANTCZAK et al., 1985;). Quando compararam a incidência de perda gestacional de éguas que carregavam embriões muares com éguas prenhas de embrião equino, Boeta & Zarco (2005) encontraram uma incidência de perda gestacionais significativamente maior ($P<0,05$) em éguas gestando embriões muares (36,8%) quando comparada às éguas gestando embriões equino (21,4%). As perdas ocorreram em média no dia 93 e 43 dias da gestação para as duas categorias, respectivamente. Da mesma forma, Boeta & Zarco, (2010) verificaram que a incidência de aborto em éguas gestando mulas foi de 30%, o que foi significativamente maior ($P<0,05$) quando comparada aos 5% observados em éguas gestando equinos. Isto ocorre devido diretamente a redução na secreção de eCG e progesterona que estão associadas com a formação inadequada e regressão prematura dos cálices endometriais que ocorrem em éguas com gestações interespécificas. A falta de eCG poderia facilitar a ocorrência de abortos que são ativados por luteólise (BOETA et al., 2005).

A transferência de embriões de jumentos para éguas fornece um modelo útil de estudo da morte fetal precoce em equídeos. Os cálices endometriais de forma adequada não se

desenvolvem neste tipo de gestação obtida por um cruzamento interespécie e 80% dos fetos de jumentos são abortados entre os dias 80 e 100 da gestação em conjunto com uma implantação anormal e um acúmulo intenso de leucócitos no endométrio da égua receptora (ANTCZAK et al., 1985; ALLEN et al., 1987). Da mesma forma, uma baixa taxa de natalidade foi observada quando os embriões muares foram transferidos para éguas receptoras resultando em reduzido desenvolvimento do córion avascular e uma falha na produção de eCG, com aborto em 70% das gestações entre os dias 80 e 95 (ALLEN, 2001b). Em contrapartida, a transferência cirúrgica de embriões de equinos e asininos em mulas cíclicas resultou no nascimento de potros vivos (DAVIES et al., 1985).

Infelizmente a TE interespécies é limitada por alguns fatores, tais como a dificuldade na sincronização do estro entre espécies diferentes. No caso de éguas e mulas, os trabalhos existentes na literatura demonstram resultados insatisfatórios (DAVIES et al., 1985; QUINTERO e ZARCO, 1996; CAMILLO, 2003). Gonzalez et al. (2015) avaliaram dados de mais de 70 ovários de mulas, e encontraram forte evidência de ciclicidade das mulas (45,8% (33/72) com corpo lúteo e 15,3% (11/72) com grandes folículos antrais) este resultado sugere que próximo de 50% das mulas são acíclicas, ou seja, em cada 100 mulas, quase 50 delas seriam acíclicas, o que dificultaria a sincronização com as éguas, obrigando assim o uso de protocolos hormonais.

Essa informação pode ser explicada pelos relatos de Cozzi e Ferrandi (1984a) que afirmam que a glândula pineal das mulas é muito mais desenvolvida que em equinos e por essa razão poderiam produzir maior quantidade de melatonina o que inibiria o ciclo estral dessas fêmeas. Em outro estudo, Guillaume et al. (2006) também afirmam que a concentração de melatonina é maior no híbrido interespécífico do que nos cavalos e maior nos jumentos do que nos cavalos. Além disso, o mesmo autor descreve que estes resultados sugerem que a

concentração de melatonina é determinada geneticamente e que o componente principal da alta concentração de melatonina nas mulas vem dos jumentos.

3.3 A gestação em mulas

Os equídeos possuem uma habilidade de cruzarem com espécies fenotípica e cariotipicamente diferentes e desses cruzamentos nascem animais conhecidos como híbridos. O mais comum destes híbridos, produzido e utilizado comercialmente há milhões de anos é o resultado do cruzamento de um macho asinino, *Equus asinus* ($2n= 62$) com uma fêmea equina, *Equus caballus* ($2n= 64$) que produz os muares, *Equus mulus* ($2n= 63$). Embora este cruzamento apresente produtos viáveis, estes são normalmente inférteis (ALLEN e SHORT, 1997).

Wodsedalek (1916) foi o primeiro a propor que espermatozoides não são produzidos nos testículos dos burros por uma incompatibilidade cromossômica entre as espécies progenitoras, ocorrendo um bloqueio da meiose. Taylor e Short (1973) demonstraram que na espécie *Equus mulus* ($2n= 63$) haveria um bloqueio parcial da meiose dos cromossomos sexuais femininos, produzindo um baixo estoque ou mesmo ausência de oócitos ao nascimento. Steiner e Ryder (2013), confirmaram que a infertilidade da maioria das mulas está relacionada apenas a um aspecto genético, aparentemente relacionado ao gene Prdm9, cujo locus codifica a histona H3 metiltransferase – meiose específica, interferindo na sua fase de paquíteno durante a gametogênese.

A gestação em mulas apesar de ser conhecida como algo incomum, pode se dar em duas situações: em casos raros (uma em um milhão de vezes), após uma monta natural ou inseminação (SHORT, 1997; HENRY, et al 1995) ou através da transferência de embriões, onde a mula pode ser receptora e levar a termo um produto sem sua carga genética.

Existem vários relatos de mulas férteis na literatura, em que se realizou cariotipagem da matriz e do produto, porém nesses casos os muares possuíam cariotípico de égua ou de jumenta (CHANDLEY e CLARKE 1985; RONG e WEI, 1985).

No Brasil e no mundo existem vários relatos de mulas utilizadas como receptoras de embrião, porém não há estudo encontrado na literatura sobre os aspectos relacionados com a gestação dessa categoria. Na literatura existem alguns estudos que utilizaram mulas como receptoras de embrião, sem avaliar a fisiologia da gestação. O primeiro, em 1985 onde Davies e colaboradores obtiveram quatro gestações e dois nascimentos; Quintero e Zarco (1996), transferiram 4 embriões híbridos para mulas acíclicas, obtendo apenas 1 gestação, porém com aborto antes de 60 dias de gestação. Camillo e colaboradores (2003) realizaram a transferência de 4 embriões para 1 mula acíclica e 3 mulas cíclicas. Os embriões foram transferidos de forma não cirúrgica e, embora a dificuldade encontrada no momento da passagem da pipeta de transferência através da cérvix, as mulas cíclicas levaram as gestações a termo, porém na mula acíclica (tratada com estrogênio e a progesterona) foram realizadas 3 tentativas sem sucesso.

3.4 Desenvolvimento embrionário em equídeos

A avaliação por ultrassonografia da vesícula embrionária, do embrião e do feto equino tem sido descrita ao longo de três décadas a partir de estudos pioneiros (PALMER e DRIANCOURT, 1980; GINTHER, 1983a).

Em jumentos, trabalhos que descrevem a gestação precoce são escassos (BESSENT e GINTHER, 1988; GASTAL et al., 1993; MEIRA et al., 1998) enquanto que em mulas, não foram encontrados na literatura estudos que avaliassem a gestação dessa espécie.

O diagnóstico precoce da gestação é essencial para o manejo da égua, especialmente para reduzir a necessidade de continuação da detecção de estro, porém exames repetidos são necessários para identificar falência embrionária precoce, uma vez que quanto mais cedo uma falha puder ser diagnosticada, maior a chance de se estabelecer uma nova prenhez (NEWCOMBE e CUERVO-ARANGO, 2012)

Muitos aspectos do início da gestação na égua mostram-se únicos no gênero Equus e têm importante significado prático na moderna medicina veterinária equina (ALLEN, 2000a).

O desenvolvimento embrionário tem início a partir da fecundação do óvulo pelo espermatozoide, e a partir deste momento, até o estabelecimento de uma placenta madura e funcional, aproximadamente aos 150 dias, uma série de alterações ocorrem no oviduto e útero, as quais podem ser presumidas como importantes componentes do estabelecimento e manutenção do estado gestacional, e que diferem de eventos equivalentes em outras espécies animais domésticas (GINTHER, 1992a; GINTHER, 1998; ALLEN, 2000a).

A espécie equina apresenta particularidades em relação ao desenvolvimento morfológico do embrião, dentre os quais podemos destacar: o desenvolvimento dos cálices endometriais e a mobilidade e atividade fetal (GINTHER, 1998).

O perfil de crescimento embrionário equino durante a gestação precoce foi sumarizado por GINTHER (1995), que produziu uma descrição detalhada do crescimento embrionário e fetal entre os dias 9 a 45 de gestação usando a ultrassonografia em modo B.

A égua é provida de uma distinta maneira pela qual o embrião possui uma total importância no sinal do reconhecimento materno da gestação. No momento apropriado, o embrião deve sinalizar a sua presença através de uma intensa migração no útero, sinal este necessário para a manutenção do corpo lúteo, a produção de progesterona e para a continuação do desenvolvimento do endométrio e da sua atividade secretora (ALLEN, 2000b).

O embrião equino é protegido por uma resistente e ajustada cápsula de glicocálix entre os dias 6,5 a 22 de gestação, sendo incapaz de reorganizar e alongar o trofoectoderma entre os dias 10 e 14 após a ovulação, permanecendo esférico e completamente solto dentro do lumen uterino onde ele se move continuamente de uma extremidade à outra do útero levado por fortes contrações do miométrio, nos dias 9 a 17 após a ovulação (GINTHER, 1983; GASTAL et al., 1996). O desenvolvimento embrionário está estreitamente relacionado com a idade do embrião e com o diâmetro da vesícula entre 11 e 15 dias após a ovulação, período que é um bom guia para viabilidade futura da gestação (NEWCOMBE, 2004).

A primeira visualização da vesícula embrionária pode ser realizada a partir do dia 9 pós-ovulação com o uso da ultrassonografia. Nesse momento encontra-se uma estrutura circular anecóica, com sua borda ventral e dorsal bem definida, porém o embrião nesses dias ainda não é visível (GINTHER, 1995).

Segundo a literatura, a primeira detecção da vesícula embrionária em jumentas foi relatada entre os dias 9-10, da gestação (GASTAL et al., 1993; MEIRA et al., 1998), no dia 8 em éguas gestando mulas (PAOLUCCI et al., 2012) e nos 9 a 11 em pôneis e éguas, respectivamente (GINTHER, 1986).

Nesta fase, a vesícula embrionária cresce entre 2,9 e 4,5 mm por dia. O diâmetro esperado da vesícula embrionária entre 13 e 15 dias pós ovulação é de $12,4 \pm 1,8$ mm e $20,1 \pm 3$ mm, respectivamente (CUERVO-ARANGO et al., 2009). Este é um momento da gestação que uma redução no diâmetro equivalente a dois dias de crescimento é altamente indicativa de falha no desenvolvimento embrionário. (NEWCOMBE, 2004). Em relação a detecção de uma vesícula de 14 ou 15 dias, afirma-se que a precisão é de 99% podendo a vesícula embrionária de forma esférica medir em torno de 17 a 22 mm (SQUIRES et al., 1988).

O fim da fase de mobilidade, também conhecida como "fixação embrionária", ocorre aproximadamente aos 15 dias após a ovulação. Vários fatores parecem atuar em conjunto para encerrar a fase de mobilidade do concepto (GASTAL et al., 1996; GINTHER, 1998).

Logo após o fim da fase de mobilidade, a vesícula embrionária perde sua forma esférica e um espessamento da porção dorsal do útero é visualizado no segmento que contém a vesícula. A partir da fixação ao dia 28 da gestação, a taxa de crescimento da vesícula observada pela ultrassonografia diminui a 0,5 mm/dia devido a um aumento progressivo do tônus uterino que comprime a vesícula. Finalmente, o concepto restabelece uma taxa de crescimento linear de 1,6 mm/dia entre os dias 28 e 46 da gestação (GINTHER, 1983).

À medida que a vesícula embrionária aumenta em tamanho, seu crescente diâmetro apresenta um impedimento físico para a mobilidade, ou seja, quanto maior a vesícula embrionária, mais cedo ocorre a fixação. O tônus uterino aumenta gradualmente entre os dias 11 e 21, enquanto o diâmetro dos cornos uterinos diminui, o que também apresenta um impedimento físico à mobilidade (GINTHER, 1983; GASTAL et al., 1996).

A imobilização do concepto no momento da fixação também coincide com a orientação adequada ("embryo proper" para baixo). O primeiro dos sinais desse processo pode ser detectado pela ultrassonografia Doppler (SILVA e GINTHER, 2006).

Próximo ao dia 21 da gestação, o alantoide começa a surgir, formando uma linha sobre o âmnio e o embrião (GINTHER, 1995). O surgimento do embrião propriamente dito dentro da vesícula embrionária é observado nessa fase na base (ou porção ventral) da vesícula, com formato esférico medindo aproximadamente 2,6 cm de diâmetro (SQUIRES et al., 1988).

A identificação desse disco embrionário ou “embryo proper – EP” (embrião propriamente dito) com o batimento cardíaco discernível é muitas vezes o “padrão ouro” para um diagnóstico de gestação preciso e consequente viabilidade do embrião, especialmente em situações onde cistos endometriais podem ser confundidos com uma vesícula ou mesmo quando a ovulação ocorreu em data desconhecida (NEWCOMBE e CUERVO-ARANGO, 2012).

O EP é primeiro visualizado com ultrassonografia modo B (em tempo real) entre os dias 19-22 dias da gestação (GINTHER, 1983). O batimento cardíaco também pode ser visualizado, logo que o EP for detectado, achado que é facilitado com a utilização de ultrassonografia no modo Doppler (SILVA e GINTHER, 2006).

A partir do 40º dia da gestação, o embrião passa a ser chamado de feto e o âmnio se move para o polo oposto substituindo o saco vitelino que foi integralmente consumido (GINTHER, 1998; PYCOCK, 2007). Nesse momento, existe a fusão das membranas que separam o saco alantóide e o saco vitelino quando o feto atinge o polo dorsal no 40º dia, formando o cordão umbilical, que normalmente vai de 50 a 100 cm de comprimento (GINTHER, 1998; TROEDSSON e SAGE, 2001).

3.5 Endocrinologia da gestação em equídeos

3.5.1 Dinâmica folicular durante a gestação inicial

Nas éguas cíclicas, ondas foliculares ovarianas associadas a periódicos aumentos na secreção de hormônio folículo estimulante (FSH) ocorrem a cada 10-12 dias (IRVINE, 1981; AURICH, 2011). Estas ondas foliculares também ocorrem durante os primeiros meses de gestação (BERGFELT e GINTHER, 1992).

Os corpos lúteos suplementares podem se formar de 2 maneiras diferentes durante a gestação de éguas: a partir de folículos ovulatórios (chamado corpo lúteo secundário – CLS) ou a partir de folículos luteinizados (corpo lúteo acessório) (GINTHER, 1992b; ALLEN, 2001a). O objetivo dessas estruturas é manter uma contínua secreção de progesterona para a manutenção da gestação em fêmeas equinas até 120 dias de gestação, pois a partir deste momento, a placenta responde pelas concentrações desse hormônio (MCKINNON et al., 2000).

Inicialmente a progesterona é sintetizada pelo corpo lúteo primário (CLP) formado após a ovulação em éguas. Posteriormente a secreção de progesterona (a partir dos 36-40 dias de gestação) é oriunda dos corpos lúteos secundários que se formam sob a influência da eCG secretada pelos cálices endometriais (SQUIRES et al., 1974; HOLTAN et al., 1979).

Aproximadamente aos 180 dias de gestação não há mais produção de progesterona pelos corpos lúteos da égua, e a unidade feto-placentária, embora já contribuindo com a produção de progestágenos no período anterior à regressão dos CLS, reassume agora a produção de progesterona até a fase final da gestação (GINTHER, 1992a; SILVA et al., 2012).

3.5.2 Formação de cálices endometriais e gonadotrofina coriônica equina

Gonadotrofina coriônica equina (eCG) é um hormônio secretado em grande quantidade durante a primeira metade da gestação equina pelos cálices endometriais (COLE e GOSS, 1943; SILVA et al., 2012). Estes cálices surgem por invasão do endométrio materno durante os dias 36-38 da gestação por células chamadas “*girdle cells*” (WOODING et al., 2001; ANTCZAK et al., 2013). Segundo Ginther, (1998), na superfície do embrião, entre os dias 25 e 35 após a ovulação se desenvolve um anel coriônico, uma discreta região anular de células trofoblásticas especializadas invasivas, o que revela uma das características singulares do desenvolvimento embrionário e da placentação nos equinos. Este anel é formado por uma série de ondulações superficiais no córion que se aprofunda marcadamente permitindo que as células binucleadas invadam e migrem através do tecido materno (ALLEN, 2000b).

A eCG aparece pela primeira vez no sangue materno por volta dos 37-40 dias de gestação e as concentrações aumentam abruptamente próximo aos dias 55-70 da gestação e diminuem de forma constante para desaparecer completamente do soro entre os dias 100 e 140 (COLE e HART, 1930; ALLEN, 1969; ALLEN, 2001a; BOETA, 2005). Este declínio no eCG sérico acontece em paralelo à degeneração e eventual morte e deiscência dos cálices endometriais. (CLEGG et al., 1954; ALLEN, 1975). A eCG tem como função a formação dos corpos lúteos acessórios e como consequência acredita-se também que seja um estímulo para a manutenção do corpo lúteo primário durante cerca de 35-120 dias. (GOSPODOROWICZ, 1972).

A liberação de progesterona pelo corpo lúteo primário eleva-se durante os dias 35-40, antes da produção de progesterona significativa pelos corpos lúteos suplementares (BRINSKO et al., 2011b).

Em estudo que utilizou mulas como receptoras de embrião equinos, as concentrações séricas e a duração da secreção de eCG nas duas mulas receptoras gestantes diferiram de forma significativa. Em uma das mulas avaliadas, o perfil de eCG era semelhante ao de uma gestação típica de égua, enquanto que na segunda o nível era muito baixo e típico de uma gestação de mulas em éguas (DAVIES, 1985; CAMILLO et al., 2003).

Foi demonstrado que o genótipo fetal exerce uma profunda influência no desenvolvimento dos cálices endometriais e sua secreção de eCG (ALLEN 1975; ALLEN e SHORT 1997). Os cálices são maiores e os níveis de eCG mais altos em éguas e jumentas acasaladas com garanhão para que elas estejam carregando, respectivamente, cavalo e bardoto, do que em éguas e jumentas acasaladas com um jumento, que no caso estão carregando, respectivamente, conceptos de muar e asinino (ALLEN et al. 1993).

Antczak et al. (1985) relataram de maneira similar diferenças acentuadas nos perfis de eCG nas quatro mulas receptoras prenhas descritas por Davies et al. (1985). A concentração máxima variou de 38 a 352 UI/mL entre elas e o hormônio permaneceu detectável no soro até os dias 92-119 da gestação. Uma diferença igualmente grande na produção de eCG foi evidenciada em duas mulas do mesmo estudo da Davies e colaboradores, em 1985, as quais apresentaram concentrações máximas de 74,7 contra 15,1 UI/mL e o desaparecimento da atividade de eCG do sangue materno ocorrendo em 151 vs. 85 dias de gestação.

Na jumenta ocorre a produção de uma gonadotrofina coriônica asinina (dCG) análoga ao eCG da égua. Esta gonadotrofina apresenta uma atividade mais relacionada com a função de hormônio luteinizante (LH) do que de FSH, ao contrário da eCG. Quimicamente foi verificado que estas gonadotrofinas são semelhantes, porém contém pequenas variações estruturais entre as quais a dCG apresenta menos carboidratos e diferenças na composição de aminoácidos (AGGARWAL et al., 1980).

1 4 ARTIGO
23 **The mule (*Equus mulus*) as an embryo recipient for horse (*Equus*
4 *caballus*): reproductive and hormonal aspects of pregnancy**
56 C. E. Camargo^{1,2}, S. F. Rechsteiner^{1,3}, R. C. Macan², L. E. Kozicki², M. O. Gastal⁴, E. L.
7 Gastal^{4*}
89 ¹ Postgraduate program in Animal Medicine: Equine, Faculty of Veterinary Medicine, Federal
10 University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil11 ² Veterinary School, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil12 ³ HISTOREP, Biology Institute, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil13 ⁴ Department of Animal Science, Food and Nutrition, Southern Illinois University, Carbondale,
14 IL, USA
1517 **Summary sentence:** Comparative study of embryo and early fetus development between
18 noncycling mules and cycling mares as recipients of horse-horse embryos.

19

20

21

22 *Corresponding author: Eduardo Gastal, Department of Animal Science, Food and Nutrition,
23 Southern Illinois University, 1205 Lincoln Drive, MC 4417, Carbondale, IL, 62901, USA.
24 Phone: (618) 453-1774; FAX: (618) 453-5231; e-mail: egastal@siu.edu

25 **Abstract**

26 The purpose of this study was to use repeated ultrasound scanning to determine and compare
27 the basic characteristics of early embryo/fetal development in noncycling mules and mares from
28 the time of the first detection of the embryonic vesicle to day 60 of pregnancy. Five embryo
29 donor mares aged 4 to 10 years were used. Two groups of recipients were used: 10 cyclic mares
30 aged 4 to 15 years (control group), and 7 acyclic mules aged 6 to 12 years. Donor mares were
31 monitored and were artificially inseminated using fresh semen. Embryo collection from the
32 mares was performed 8 days after ovulation. The acyclic mules were prepared before the
33 embryo transfer with the administration of 17 beta-estradiol (10 mg/ml, 1 ml, i.m.) and
34 Altrenogest (60 mg/ml, 5 ml, i.m.). When the diagnosis was confirmed, ultrasonography
35 assessment was carried out daily until day 60 of pregnancy. The first day of detection of an
36 embryonic vesicle was day 10 by ultrasound in both species and day 20.9 ± 1.3 (mean \pm SD),
37 and 21.9 ± 0.9 in mules and mares respectively. Fixation of the vesicle occurred on mean day
38 15.7 ± 1.1 in mules and 16.6 ± 1.7 in mares. The embryo proper was first detected in mules (on
39 day 19.9 ± 1.1) compared to mares (20.4 ± 1.3). The heart beat was observed later in mules
40 (23.4 ± 1.4) than in mares (22.6 ± 0.8). The allantoic sac was first detected between days 23
41 and 26 (25.3 ± 1.1 and 24.6 ± 1.0 in mules and mares, respectively) and the umbilical cord was
42 first detected on day 39 (39.7 ± 2.1 x 39.6 ± 1.5 in mules and mares, respectively). Only two
43 mules presented accessory CL that was observed for the first time on days 49 and 51. Based on
44 these findings, mules can be used successfully as equine embryo recipients.

45

46 **Keywords:** mule; embryo and fetus development; ovary; uterus; eCG.

47 **1. Introduction**

48 Embryo transfer (ET) is one of the most common equine assisted reproductive
49 technologies (ART). Brazil, along with the United States and Argentina, are the largest
50 producers of foals by ET in the world. The selection and handling of the recipient are crucial
51 for the success of this technique. Due to the increased need of a large number of recipients, new
52 alternatives became necessary to supply the equine ET industry. In this regard, the mules (*Equus*
53 *mulus*), the interspecific hybrids of the horse (*Equus caballus*) and donkey (*Equus asinus*), have
54 been suggested as an extraordinary option as recipients for equine ET since their reproductive
55 tracts are able to support the development of either horse or donkey conceptuses to term (Davis
56 et al., 1985; Camillo et al., 2003).

57 There are a few examples of fertile mules in the literature. Some of these cases were
58 confirmed with matrix and product karyotyping (Chandley and Clarke, 1985; Rong et al., 1985;
59 Henry et al., 1995). In general, the reproductive system and physiology of these hybrid animals
60 is very similar to horse mares and jenny donkeys, including hormone production and ovulation
61 (Davies et al., 1985; Quintero and Zarco, 1996; Camillo et al., 2003; Souza et al., 2013).
62 According to Gonzalez et al. (2015), signs of cyclicity were observed in 60% of mules' ovaries
63 with the presence of corpus luteum and largest antral follicles.

64 Cycling and noncycling mules have been used as an alternative for embryo recipient
65 (Davies et al., 1985; Quintero and Zarco, 1996; Camillo et al., 2003; Gonzalez et al., 2015).
66 These previous studies demonstrated that pregnancy was obtained mainly with cycling recipient
67 mules. Although cycling mules produced more pregnancies than the noncycling mules, the
68 ovulation synchronization between donor and recipient was considered as a limiting factor of
69 this technique in these studies (Camillo et al., 2003). After ET of both horse and donkey
70 embryos, endometrial cups were formed in the mule uterus and chorionic gonadotrophin were
71 able to stimulate secondary luteal development in the mules' ovaries (Davies et al., 1985).

72 However, it has been demonstrated that fetal genotype exerts a profound influence on the
73 development of the endometrial cups and their secretion of equine chorion gonadotrophin
74 (eCG) (Allen, 1975; Allen and Short, 1997). For instance, low birth rate occurred when donkey
75 embryos were transferred to horse recipient mares and was associated with a reduced chorionic
76 girdle development and a failure of eCG production (Allen, 2001). A large discrepancy in eCG
77 production in interspecies ET has been described (Davies et al., 1985; Camillo et al., 2003).
78 Factors other than simple genome of the conceptus and maternal uterine environment may
79 influence eCG production (Camillo et al., 2003). In this regard, individual and breed differences
80 seem to be one of the major factors in eCG production variability in horse-in-horse ET
81 pregnancies (Allen et al., 2002). In cycling recipient mules, the pattern and amounts of
82 progesterone have been demonstrated to be similar to mares carrying normal intraspecies horse
83 pregnancies (Camillo et al., 2003).

84 Transrectal real-time ultrasonography has greatly contributed to knowledge of the uterus
85 and embryo relationship during early pregnancy in mares (Palmer and Driancourt, 1980;
86 Squires et al., 1983; Ginther, 1983a; 1984; 1985; 1986) and jenny donkeys (Gastal et al., 1993;
87 Meira et al., 1998). However, no information is available concerning the conceptus during early
88 pregnancy in recipient mules after horse embryo transfer. The purpose of this study was to use
89 repeated ultrasound scanning to determine and compare the basic characteristics of early
90 embryo/fetal development in noncycling mules and mares from the time of the first detection
91 of the embryonic vesicle to day 60 of gestation.

92

93 **2. Materials and methods**

94 **2.1 Animals**

95 All animal procedures in this study were performed in compliance with the animal use
96 protocol by the Institutional Animal Research Ethics Committee at Federal University of

97 Pelotas, Brazil (protocol number #4587/2014) and Ethics Committee of Pontifical Catholic
98 University of Paraná (protocol number 01065/2016). Five donor mares 4 to 10 years old were
99 used in this study. Embryo recipient animals included two groups: 1) Mules (n = 7), noncycling
100 mules aging 6 to 12 years, with proofed chromosome number of 63 by karyotype analyses, and
101 2) Mares (n = 10), cycling mares aging 4 to 15 yr.

102 Animals were kept under natural daylight in pastures with free access to water and trace-
103 mineralized salt. Thirty days before foaling, recipient mules/mares were moved to a stall and
104 kept there until parturition. Feed consisted of pasture, hay (Tifton) and supplementation (12%
105 protein) with commercial ration. The study was done in Brazil and embryo transfers were
106 performed during the reproductive season in the southern hemisphere (Latitude = 25° 39' 24"
107 S and longitude = 49° 17' 16" W).

108

109 **2.2. Estrous cycle synchronization**

110 Donor and recipient mares were daily scanned by transrectal ultrasonography
111 (ultrasound information). When a mature corpus luteum was detected, the donor and recipient
112 (2 days after the former) mares received a luteolitic dose of prostaglandin (PGF2 α , 5 mg
113 Lutalyse®, Pfizer Animal Health). After detection of a \geq 35 mm follicle and an endometrial
114 echotexture score 3 (estrus-like; Ginther and Pierson, 1984), ovulation was induced with
115 deslorelin acetate (Sincrorelin®, OuroFino 750 mg, 3 ml, i.m.) 24 h before artificial
116 insemination.

117 Noncycling mules received an injection of 17 β -estradiol (17-Beta, Botupharma® 10
118 mg/ml, i.m.) on the day of the donor's ovulation. When uterine edema was detected (usually
119 within 2 days after estradiol administration), mules received an injection of Altrenogest
120 (Altrengest, Botupharma® 300 mg i.m.). The same dosage of the long-action altrenogest was
121 also administered on the day of embryo transfer.

122 **2.3. Artificial insemination**

123 Artificial insemination was performed 24 hours after deslorelin acetate injection and the
124 presence of endometrial echotexture score 3. Fresh semen ($\geq 70\%$ progressive motility) from a
125 fertile stallion was used. Mares were inseminated once with 500×10^6 progressively motile
126 sperm diluted in a ratio 1:1 of semen extender (Botusemen[®] Botupharma, Botucatu).

127

128 **2.4. Embryo recovery and transfer**

129 The embryos were recovered on days 7-9 by nonsurgical uterine flushing, using 3 L of
130 ringer-lactate solution at 37°C (Alvarenga et al., 1993). After identification under
131 stereomicroscopy, the embryos were graded (McKinnon and Squires, 1988), and only embryos
132 with a grade of 1 were used. The embryos were washed 9 times (Stringfellow, 1998) in Equihold
133 (Minitube, Tiefenbach, Germany). Embryos were transferred by non-surgical transcervical
134 (TC) transfer. Briefly, the embryo was loaded, along with 2.5 ml medium, into an insemination
135 pipette, which was inserted through the cervix of the recipient mule/mare and then deposited
136 deeply into the uterine body.

137 Before the embryo transfers, recipient mares were daily examined by ultrasound in order
138 to assign the ones with closer ovulation synchrony with the donor. In the present study the
139 embryos were transferred to cycling recipient mares with degrees of synchrony varying between
140 +1 to -3 (recipient ovulated 1 day before through 3 days after the donor) (Jacob et al., 2012).
141 While recipient mares did not receive any hormonal treatment, noncycling recipient mules were
142 assigned to receive an artificial hormonal-based protocol using a combination of estrogen and
143 progesterone (Oliveira Neto et al., 2018).

144 **2.5. Pregnancy diagnoses and hormonal treatment**

145 Pregnancy diagnoses were performed by ultrasonography 10 to 12 days post-ovulation
146 of the donors. Pregnant recipients were daily monitored until day 60. Afterwards,
147 ultrasonography was performed weekly until foaling.

148 After a positive pregnancy diagnosis, noncycling recipient mules were randomly
149 assigned to 2 groups based on the long-acting progesterone (P4-300, Botupharma®, 1500 mg
150 i.m.) treatment: 1) D30 (n = 3) weekly treatment until 30 days before foaling; and 2) D120 (n
151 = 4) weekly treatment until day 120 of pregnancy. The site of the intramuscular injection of
152 progesterone was rotated in different spots every week to avoid abscesses or other possible
153 reactions.

154

155 **2.6. Embryo and fetal assessment during pregnancy**

156 The diameter of the vesicle was taken by the average of width to height. The cross-bar
157 of each of the calipers was placed directly on a specular reflection. Specular reflections indicate
158 that the ultrasound field is perpendicular to the surfaces of the vesicle and that the area of the
159 cross-sectional image relative to horn is maximal. When the vesicle becomes irregular in shape,
160 the mean of maximal width and height were used. The locations of the vesicle within the uterus
161 and of the embryo within the vesicle were recorded daily during the 60 days of pregnancy. Each
162 uterine horn and the uterine body were divided into three proportional segments as described
163 (Ginther, 1984). The location of the embryonic vesicle was assigned to 1 of 9 uterine segments
164 (Fig. 1): anterior right horn (AR), medial right horn (MR), posterior right horn (PR), anterior
165 left horn (AL), medial left horn (ML), posterior left horn (PL), anterior uterine body (AB),
166 medial uterine body (MB), and posterior uterine body (PB).

167 The days of first detection of the embryo proper, of its heart beat, first visualization of
168 the allantois, and the first detection of the umbilical cord were recorded. In addition,

169 embryo/fetus measurements (crown-rump length, width, and diameter) were recorded daily
170 until day 60 of pregnancy. The proportion (%) amount of allantoic sac versus amount of
171 vitelline sac was also recorded.

172

173 **2.7. Ovary and uterus**

174 The diameter of the ovaries, diameter of largest and second largest follicles, number of
175 follicles ≥ 25 mm, and the area of the primary and secondary corpus luteum were recorded from
176 day 6 to 60 of pregnancy for all recipient mules and mares. The diameter of the ovaries was
177 measured using the average of height and width of the ovary. The diameter of the largest
178 follicles per mule/mare was measured using the average of height and width of the antrum,
179 regardless of the ovary side (left or right). The number of follicles ≥ 25 mm was counted and
180 recorded.

181 The area of the primary corpus luteum (CL) was measured using the specific tool of the
182 ultrasound machine. After day 30, the presence and number of the accessory CLs were
183 measured, counted, and recorded.

184 The uterine tone was determined by transrectal digital assessment. Uterine tone was
185 scored on a scale from 1 (flaccid, as during estrus) to 3 (hypertonic, as during early pregnancy).
186 The endometrial echotexture was scored from 1 to 3 (minimum to maximum, respectively). A
187 cross-sectional diameter at the outer limits of the endometrium (endometrial diameter) was
188 taken at the middle segment of each uterine horn. A circumscribed image of the horn with
189 minimal refraction and reflection artifacts at the sides of the cross-sectional image was chosen
190 and frozen. Height and width were measured, and the mean was used as a single value for each
191 day. The measurements of the gravid and non-gravid horn were taken daily and recorded.

192

193 **2.8. Blood samples and hormone assays**

194 Jugular blood samples were weekly collected into heparinized tubes and centrifuged,
195 (1500 x g for 10 min) and plasma was decanted and stored (-20°C) until assay. Plasma
196 progesterone and eCG (PMSG-ELISA, DRG Instruments, Marburg, Germany) concentrations
197 were determined by enzyme-linked immunoassay. All assays were performed following the
198 manufacturers' protocol. The intra-assay CVs and sensitivities for progesterone and eCG were
199 6.4% and 6.3%, and 0.045 ng/mL and __IU/mL, respectively.

200

201 **2.9. Statistical analyses**

202 The Shapiro-Wilk test was used for testing normal distribution of the data. Data not
203 normally distributed were transformed to log or rank before any statistical analyses. Sequential
204 data were analyzed by one-way ANOVA for main effects of group, time, and group-by-time
205 interaction. The analyses were done using SAS PROC MIXED (Version 9.2; SAS Institute,
206 Inc.), with a REPEATED statement to minimize autocorrelation between sequential
207 measurements. When a group effect or interaction was obtained, differences among groups
208 within time points were further analyzed. Differences between groups for single end point were
209 analyzed by an unpaired t-test. A probability of p<0.05 indicated that a difference was
210 significant and p>0.05 or <0.1 indicated that results tended to be different. Data are presented
211 as mean ± S.E.M.

212 **3. Results**

213 Pregnancy rates after ET were not different between mule (57.1%; 8/14) and mare
214 (69.2%, 9/13) recipients. However, more ET attempts were necessary to produce a pregnancy
215 in mules (range 1 to 4) than mares (range 1 to 2). Pregnancy losses occurred at day 20 (one
216 mule and one mare), day 45 (one mare), day 120 (one mare), and day 235 (one mule) of
217 pregnancy.

218

219 **3.1. Embryo/fetus and uterus interactions during the first 60 days of pregnancy**220 *3.1.1. Embryonic Vesicle*

221 The mean \pm SD of major events during early pregnancy are summarized in Table 1. The
222 embryonic vesicle was first detected by ultrasonography at the same day (day 10) for mules and
223 mares. However, by rectal palpation the embryonic vesicle was detected 1 day earlier in mules
224 (day 20.9) than in mares (day 21.9). The development profile of the embryonic vesicle from
225 day 10 to 60 is shown (Fig. 2). The mean diameter of the embryonic vesicle at first detection
226 (Table 1) by ultrasound was 3.5 and 3.9 mm for mules and mares, respectively. The diameter
227 growth rate of the embryonic vesicle was not different between mules and mares. However, the
228 growth rate of the embryonic vesicle was higher ($p<0.0001$) from days 10 to 17 (3.4 ± 0.4 and
229 3.6 ± 0.3 mm/day) than between 18 to 25 (0.5 ± 0.3 and 0.2 ± 0.3 mm/day), and 26 to 38 ($1.7 \pm$
230 0.1 and 1.9 ± 0.1 mm/day) for mules and mares, respectively.

231 The average fixation days were 15.7 and 16.6, and the mean diameters of the embryonic
232 vesicles on the days of fixation were 26.2 and 27.8 mm (Table 1) for mules and mares
233 respectively. In general, the embryonic vesicle was 100% round shape from day 10 to 13/14,
234 with the irregular shape starting at day 17, and 100% of irregular shape was detected at day 20
235 for mules and mares.

236 *3.1.2. Embryo proper and fetus*

237 The embryo was detected as a small echogenic dot on the ventral pole of the embryonic
238 vesicle. The embryo proper was first detected at days 19.9 and 20.5 for mules and mares,
239 respectively. The crown rump length, width, and diameter of the embryo proper is shown (Fig.
240 4). At its first detection the embryo measurements (Table 2) for crown rump length, width, and
241 diameter were 3.1, 1.9, and 2.5 mm, and 3.3, 2.1, and 2.7 for mules and mares, respectively.

242 The allantois sac was first detected as a small echogenic area under the embryo by day
243 25.3 ± 1.1 and 24.6 ± 1.0 (range, 23-26) in mules and mares, respectively. However, 85.7% of
244 the mule and mare vesicles, the allantois sac was first observed on days 25-26 and 23-25,
245 respectively.

246 The proportion of the allantois versus vitelline sac from day 24 to 40 is shown (Fig. 5).
247 At days 29, 30, and 31, the allantois filled approximately 48, 66, and 73% and 50, 59, 66% of
248 the embryonic vesicle for mules and mares, respectively. The vitelline and allantois sacs were
249 separated in the ultrasound scanning by an echogenic line that represented the overlaying of the
250 two placental structures.

251 The mean days of the first detection of heart beat (Table 1) were 23.4 and 22.6 for mules
252 and mares, respectively. In 57.1 and 85.7%, and 42.9 and 14.3% of the embryos, the first
253 heartbeat detection occurred between days 21-23 and 24-25 for mules and mares, respectively.

254 The umbilical cord (Table 1) was first detected on days 39.7 ± 2.1 and 39.6 ± 1.5 in
255 mules and mares, respectively. In 42.9 and 57.1%, and 28.6 and 71.4%, of the embryos, the
256 presence of umbilical cord was detected on days 36-39 and 40-43 in mules and mares,
257 respectively. Moreover, in 85.7% of the embryos, the umbilical cord was detected on the dorsal
258 pole in both recipients.

259 The first day of occurrence and ranges of the mean events observed during embryo/fetus
260 development in mule and mare recipients are summarized in a diagram (Fig. 6) and some
261 aspects visualized by ultrasonography are shown (Fig. 7).

262

263 **3.2. Ovarian dynamics**

264 *3.2.1. Ovarian diameter*

265 The ovarian diameters for left and right ovaries were similar for mules (21.4 ± 0.4 vs.
266 21.8 ± 0.4 mm) and for mares (45.1 ± 0.4 vs. 46.0 ± 0.4). However, the ovarian diameter of the
267 mares (45.5 ± 0.3 mm) was two times larger ($P < 0.0001$) than the mules (21.6 ± 0.3 mm). There
268 were a group ($P < 0.0001$), day ($P < 0.0003$), and group-by-day ($P < 0.009$) effect for the ovarian
269 diameter (Fig. 8).

270

271 *3.2.2. Largest Follicle*

272 The profile of the largest follicles for mules and mares is shown (Fig. 9a, b). Only two
273 mules presented follicles ≥ 25 mm from day 10 to day 60 of pregnancy. The distribution of the
274 number of mules and mares with follicles ≥ 25 mm during the experimental period is shown
275 (Fig. 9c). The number of follicles ≥ 25 mm/day ranged from 1-2/day for mules and 1-7/day for
276 mares.

277

278 *3.2.3. Primary and accessory corpus luteum*

279 The area of the primary corpus luteum for mares from day 0 to day 60 ranges from 4.8 ± 0.5 to 6.7 cm^2 . Only two mules had an accessory corpus luteum. On average, the detection of
280 accessory corpora lutea occurred at 50 ± 1.4 and 59.4 ± 33.9 days for mules and for mares,
281 respectively. The number of accessory corpora lutea ranged from 1-2 in mules and 1-7 in mares.

283 **3.3. Uterine dynamics**

284 *3.3.1. Endometrial diameter*

285 Within groups there were no differences between left and right and gravid and non-
286 gravid horns. Data were combined for comparison of the endometrial diameter between mules

287 and mares. The profile of the endometrial diameter is shown (Fig. 10). The overall mean was
288 not different between mules ($24.6 \pm 3.1 \text{ mm}$) and mares ($25.4 \pm 0.1 \text{ mm}$). However, day
289 ($P<0.003$) and group-by-day ($P<0.0001$) effects were detected.

290

291 **3.3.2. Endometrial Echotexture and Uterine Tone**

292 The endometrial echotexture and uterine tone profile from day -1 to day 60 is shown
293 (Fig. 11). For both parameters the day effect was significant ($P<0.0001$); however, no difference
294 was detected between mules and mares from day -1 to 8 or 13. A day-by-group effect
295 ($P<0.0001$) was detected for endometrial echotexture.

296

297 **3.4. Hormone profiles**

298 Concentrations of eCG and Progesterone during 17 weeks of pregnancy are shown (Fig.
299 12). A peak was detected at week 7 (day's range 50 to 60) for both species. Systemic eCG
300 concentration was higher ($P<0.05$) for mules ($124.6 \pm 10.3 \text{ IU/mL}$) than mares (86.44 ± 9.9
301 IU/mL). Progesterone levels for mares were high since day 0 and were kept high to day 126.
302 As expected, mules progesterone level was low before hormonal treatment and afterward
303 started to increase and was kept high until day 126.

304

305 **4. Discussion**

306 In the present study, noncycling mules were used as recipient for horse-horse embryos,
307 and the temporal interrelationships of the embryo/fetus and uterus were examined and
308 compared with recipient mares. The pregnancy rates after ET were similar between noncycling
309 mules and cycling mares. In addition, noncycling mares used as an alternative for ET programs
310 had pregnancy and embryonic loss rates similar to cycling mares (Carnevale et al., 2000; Rocha

311 Filho et al., 2004; Greco et al., 2012; Kaercher et al., 2013). However, former studies reported
312 failure in obtaining pregnancy in noncycling mules (Davies et al., 1985; Camillo et al., 2003).

313 Previous reports using mules as ET recipients are scarce and with small sample size.
314 Furthermore, success was obtained mainly when cycling mules were used (Davies et al., 1985;
315 Quintero and Zarco, 1996; Camillo et al., 2003). In fact, the use of noncycling mules as
316 recipients seems more reasonable than cycling animals, since some degree of difficulty has been
317 reported on ovulation synchronizing between cycling mules with the donors (Davies et al.,
318 1985; Camillo et al., 2003). In this regard, no ovulation synchronization was necessary in the
319 present study, and noncycling mules were only submitted to hormonal treatment protocols to
320 prepare the uterus environment to establish pregnancy.

321 To our knowledge, this is the first study on the interactions between uterus and
322 embryo/fetus during early pregnancy after ET in noncycling mules. By ultrasonography, the
323 mean first day of detection of the embryonic vesicle in noncycling mules after ET was 10.0
324 days after donors' ovulation, which was similar to cycling mares. The first day of
325 appearance/detection of embryonic vesicle has been reported to range from 9-10.9 in donkey
326 jennies (Gastal et al., 1993; Meira et al., 1998; Paolucci et al., 2012), on day 8 in cycling mules
327 (Ginther, 1995), and from 9-11 in ponies and mares (Ginther, 1986). In the present study, the
328 embryonic vesicle was observed by Day 10 in 100% of the mules and mares and had a mean
329 diameter of 3.5 and 3.9 mm, respectively. Mean diameter of the embryonic vesicle at first
330 visualization has been reported to be 4 mm in donkey jennies (Gastal et al., 1993) and ponies
331 and mares (Ginther, 1986). In a study in mules (Paolucci et al., 2012), the diameter of the
332 embryonic vesicle at first detection was 4.6 ± 1.1 mm, which corroborates the findings
333 aforementioned.

334 Embryonic vesicle was first detected by rectal palpation between days 19-23 and 21-23,
335 with a mean day of 20.9 and 21.9 for mules and mares, respectively. Although our results

336 showed an early detection by palpation for mules, in general they diverge from the literature
337 where the first detection has been reported to be day 17.7 for donkey jennies (Gastal et al.,
338 1993) and day 17 for mares (Ginther, 1983b). In this regard, the operator experience in early
339 pregnancy diagnosis without the use of ultrasonography may play a crucial role in the results.
340 Thus, in the present study, the diagnosis was recorded only when there was certainty of the
341 perception of the embryonic vesicle.

342 In this regard, the mean day of fixation of the embryonic vesicle was 15.7 and 16.6 after
343 donors' ovulation for mules and mares, respectively. These results are very close to previous
344 studies in horse (day 15.9 ± 0.3), pony (day 14.7 ± 0.2), and donkey jenny (day 15.6 ± 0.3)
345 (Ginther, 1995; Bessent et al., 1988; Gastal et al., 1993 and Meira et al., 1998, respectively).
346 However, Paolucci et al. (2012) reported that for mares carrying horse-donkey (mule) embryos,
347 the fixation day was later (day 17.1 ± 1.1). The mean diameters of the embryonic vesicle at the
348 day of fixation was 26.2 and 27.8 mm for mules and mares, respectively. In the present study,
349 the embryonic vesicle diameter at the day of fixation was greater than the previous one reported
350 for donkey jennies and mares (range, 21.8-21.7; Bessent and Ginther, 1988; Gastal et al., 1993).
351 The reason by which the day of fixation for mules and mares was similar, but the diameter of
352 the embryonic vesicle greater when compared to other reports, remains to be investigated. The
353 fact that in the present study the pregnancies were produced after an ET procedure may have to
354 be considered.

355 As previously reported for equine and asinine species, the embryonic vesicle grew in a
356 linear manner at 3.4 and 3.6 mm/day from days 10 to 17 for mules and mares, respectively. A
357 plateau phase with growth rate at 0.5 and 0.2 mm/day was observed from days 18 to 25;
358 thereafter, the growth rate increased again from 1.7 to 1.9 mm/day from days 26 to 38 for mules
359 and mares, respectively. Gastal et al. (1993) reported a linear increase of 3.3 mm/day from day
360 10 to 16, followed by a plateau phase from days 17 to 30 and another increase of growth rate

361 up to day 50 in donkey jennies. The same patterns in embryonic vesicle growth have been
362 reported in mare and ponies (Ginther, 1983a; Gastal et al., 1996). The present results were also
363 similar to findings reported after transferring mule embryos (horse-donkey) to mares; the
364 embryonic vesicles grew at a rate of 4.0 ± 1.3 mm/day, had a plateau phase (0.4 ± 0.1 mm/day)
365 between days 16 and 28, and afterward had an increase in growth rate of 1.8 ± 0.8 mm/day from
366 days 29 to 50 (Paolucci et al., 2012).

367 In the present study, the embryonic vesicles were 100% spherical from day 10 to 13-14
368 after donors' ovulation and started to become irregular by day 16. Embryonic vesicles for mules
369 and mares were 100% irregular by day 17. Similarly, in mares and donkey jennies, the vesicles
370 were spherical up day 16-17 (Ginther, 1983a; Gastal et al., 1993).

371 The embryo proper became visible by ultrasound at day 19.9 and day 20.5 for mules
372 and mares, respectively. Similar results have been reported in mares, ponies, donkey jennies,
373 and mules (Ginther, 1986; Gastal et al., 1993; Ginther, 1995; Meira et al., 1998; Canibal, 2008;
374 Paolucci et al., 2012). Additionally, the embryo development, as determined by the
375 measurements of crown rump length, width, and diameter, grew linearly up to day 60 as
376 previously described in donkey jennies (Gastal et al., 1993), and mares and ponies (Ginther,
377 1986).

378 The allantois sac, visualized as a small echogenic area under the embryo, was first
379 detected by days 25.3 and 24.6 (range, 23-26), for mules and mares, respectively. Despite the
380 absence of difference between mules and mares in the present study, the first detection of the
381 allantois sac occurs by day 20 in donkey jennies (Gastal et al., 1993; Meira et al., 1998), mares,
382 and ponies (Ginther, 1984; Ginther, 1986; Bessent and Ginther, 1988; Newcombe and Cuervo-
383 Arango, 2012).

384 The mean days of the first detection of heart beat were 23.4 and 22.6 for mules and
385 mares, respectively. The heart beat was visualized between days 21-23 in more than 50% and

386 85% of mules and mares, respectively. Our results were in accordance with reports in donkey
387 mules, jennies, ponies, and mares (Gastal et al., 1993; Curran and Ginther, 1995; Paolucci et
388 al., 2012). The umbilical cord was first detected by day 39 in mules and mares, and this finding
389 was similar to those observed in mares (Ginther, 1995), donkey jennies (Gastal et al., 1993),
390 and miniature ponies (Canibal, 2008).

391 In the present study, a close evaluation of ovarian and uterus dynamics was performed
392 in order to make a comparison between noncycling mules and cycling mares during the first 60
393 days of pregnancy. In this regard, the ovarian diameter from the left and right side did not differ
394 within each animal category. However, as expected, ovarian diameter from mares was
395 approximately two times larger than mules. In this regard, a recent study using mule ovaries
396 from an abattoir found 60% of cyclicity, characterized by the presence of CL and follicles ≥ 25
397 mm (Gonzalez et al., 2015). This information can be explained by reports that demonstrate that
398 the pineal gland of mules is much more developed than in equines, and the concentration of
399 melatonin is greater in interspecific hybrids than in horses, and higher in donkeys than in horses
400 (Cozzi and Ferrandi, 1984; Guillaume et al., 2006).

401 An interesting finding in the present study was that only two mules had follicles ≥ 25
402 mm during the first 60 days of pregnancy. Even though mules had higher levels of eCG, a small
403 number of follicles was recruited to produce accessory corpora lutea. All recipient mares and
404 only two noncycling mules start to develop accessory corpora lutea by day 40, which is in
405 accordance with the literature (Squires et al., 1974; Martin et al., 1989). Studies using
406 noncycling mares as ET recipients are controversial in regard to the development of accessory
407 corpora lutea. While Brinsko et al. (2011) described the absence of accessory corpora lutea in
408 noncycling mares, Aristizabal (2014) observed that in 27% of noncycling mares treated with
409 altrenogest had accessory corpora lutea by day 38 of pregnancy.

410 In regard to the endometrial diameter, there were no differences between the diameter
411 of left and right and gravid and non-gravid horns within or between groups of mules and mares.
412 These results are in agreement with Gastal et al. (1996), who observed no differences between
413 left and right uterine horns or between gravid and non-gravid horns in pony mares. Uterine tone
414 and endometrial echotexture during the first 60 days of pregnancy were similar between mules
415 and mares.

416 Mean systemic levels of eCG up to day 126 of pregnancy were higher for mules than
417 mares, and a peak was detected around days 50 to 60 for both species. A large range for eCG
418 concentrations in mules carrying horse-horse and donkey-horse (Davies et al., 1985; Camillo et
419 al., 2003) conceptuses has been reported. Higher values of eCG have been detected when mules
420 are carrying horse-horse than donkey embryos (Davies et al., 1985). In this regard, studies in
421 immunological aspects of pregnancy in equines have found that horse embryos implant
422 normally and develop to term in donkey jennies; however, donkeys embryos transferred to
423 mares usually only develop normally up to day 70 (Davies et al., 1985). After this period, a
424 vigorous maternal cell-mediated attack starts, and death and abortion can occur around days 80
425 to 95 (Allen, 1982). Thus, results of the present study support the previous hypothesis that a
426 genetically neutral environment of the mule uterus promotes the development of endometrial
427 cups and eCG production.

428 The systemic levels of progesterone were similar for mules and mares. Camillo et al.
429 (2003) reported that both cycling mules appeared to develop accessory CL after day 40 of
430 pregnancy, just as in a normal horse pregnancy, since serum progesterone concentrations
431 remained very high after this time. Although in the present study only 2 mules developed one
432 accessory corpus luteum, the external and placental progesterone was able to support the
433 pregnancy to term in 6 mules.

434 In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first comparative study on embryo
435 and early fetal development between noncycling mules and mares used as ET recipients of
436 horse-horse embryos. Besides the novel contribution regarding the temporal interrelationships
437 of the embryo/fetus and uterus in noncycling mules after ET, numerous similarities in embryo
438 and early fetal development, and endocrinology aspects were seen between recipient mules and
439 mares during the first 60 days of pregnancy. The findings of this study in mules, associated with
440 the fact that alive and healthy offspring were produced, the use of mules may be considered as
441 an alternative to increase the availability of recipients in equine ET programs.

442

443 **Declaration of interest:** The authors declare that there is no conflict of interest that could be
444 perceived as prejudicing the impartiality of this review.

445

446 **Acknowledgment**

447 The authors thank Botupharma and Zoetis for providing hormones and vaccines for the
448 animals, respectively, and the Pontifical Catholic University of Paraná for approving this
449 project and keeping the animals. CE Camargo was supported by a CAPES (Coordination for
450 the Improvement of Higher Personnel) PhD scholarship.

451

452 **References**

- 453 Allen WR. The Influence of fetal genotype upon endometrial cup development and PMSG and
454 progestagen production in equids. *J Reprod Fert* 1975; 23:405-413.
- 455 Allen WR, Immunological aspects of the equine endometrial cup reaction and the effect of
456 xenogenetic extraspecies pregnancy in horses and donkey. *J Reprod Fert*, 1982, 31: 57-94.

- 457 Allen WR, Short RV. Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: Anything Goes. *J
458 Hered* 1997; 88:384-392.
- 459 Allen WR. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction*
460 2001; 121:513-527.
- 461 Allen WR, Wilsher S, Stewart F, Ousey J, Fowden. The influence of maternal size on placental,
462 fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. *J. Endocrinol* 2002;
463 172:237-246.
- 464 Alvarenga MA, Alvarenga FCL, Meira C. Modifications in the technique used for recovery
465 equine embryos. *Equine Vet J* 1993; 25:111-112.
- 466 Aristizábal VHV. Utilização de altrenogest injetável para o estabelecimento e manutenção da
467 gestação em éguas receptoras de embriões acíclicas. São Paulo, SP: Universidade Estadual
468 Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2014. Dissertation.
- 469 Bessent C, Ginther OJ. Comparison of early conceptus mobility between mares and jennies.
470 *Theriogenology* 1988; 29:13-20.
- 471 Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Scumacher J, Love CC. Manual of equine reproduction.
472 3rd ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2011.
- 473 Camillo F, Vannozzi I, Rota A, Di Luzio B, Romagnoli S, Aria G, et al. Successful non-surgical
474 transfer of horse embryos to mule recipients. *Reprod Domest Anim* 2003; 38:380-385.
- 475 Canibal, MCHB. Aspectos fisiológicos da gestação de mini-pôneis. Porto Alegre, RS:
476 Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008. Dissertation.
- 477 Carnevale EM, Ramirez EL, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, McCue PM. Factors
478 affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer.
479 *Theriogenology* 2000; 54:965-979.

- 480 Chandley AC, Clarke CA. Cum Mula Peperit. *J R Soc Med* 1985; 78: 800-801.
- 481 Cozzi B, Ferrandi B. The pineal gland of the horse. Morphological and histochemical results
482 (With notes on the donkey and mule pineal). *Basic Appl Histochem* 1984; 28:81-90.
- 483 Cross DT, Ginther OJ. Uterine contractions in nonpregnant and early pregnant mares and
484 jennies as determined by ultrasonography. *J Anim Sci* 1988; 66:250-254.
- 485 Curran S, Ginther OJ. M-mode ultrasonic assessment of equine fetal heart rate. *Theriogenology*
486 1995; 44:609-617.
- 487 Davies CJ, Antczak DE, Allen WR. Reproduction in mules: embryo transfer using sterile
488 recipients. *Equine Vet J* 1985; 17:63-67.
- 489 Gastal EL, Santos GF, Henry M, Piedade HM. Embryonic and early foetal development in
490 donkeys. *Equine Vet J* 1993; 15:10-13.
- 491 Gastal MO, Gastal EL, Kot K, Ginther OJ. Factors related to the time of fixation of the
492 conceptus in mares. *Theriogenology* 1996; 46:1171-1180.
- 493 Ginther OJ. Fixation and orientation of the early equine conceptus. *Theriogenology* 1983a;
494 19:613-623.
- 495 Ginther OJ. Mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology* 1983b; 19:603-611.
- 496 Ginther OJ, Pierson RA. Ultrasonic anatomy of equine ovaries. *Theriogenology* 1984; 21: 471-
497 483.
- 498 Ginther OJ, Bergfelt DR, Leith GS, Scraba ST. Embryonic loss in mares: incidence and
499 ultrasonic morphology. *Theriogenology* 1985; 24:73-86.
- 500 Ginther OJ. Embryo: Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses, Book 2. Cross
501 Plains WI: Equiservices; 1995: 123-155.

- 502 Ginther OJ. Ultrasonic imaging and reproductive events in mare. 3rd ed. Wisconsin: Cross
503 Plains; 1986.
- 504 González SM, Gomes RG, Souza AK, Silva CS, Silva-Santos KC, Seneda MM. Evidences of
505 regular estrous cycles in mules and successful use of these animals as recipients for donkey
506 embryos. *J Equine Vet Sci* 2015; 35:869-872.
- 507 Greco GM, Burlamaqui FLG, Pinna AE, Queiroz FJR, Cunha MP, Brandão FZ. Use of long-
508 acting progesterone to acyclic embryo recipient mares. *R Bras Zootec* 2012; 41:607-611.
- 509 Griffin PG, Ginther OJ. Uterine contractile activity in mares during the estrous cycle and early
510 pregnancy. *Theriogenology* 1990; 34:47-56.
- 511 Guillaume D, Zarazaga LA, Malpaux B, Chemineau P. Variability of plasma melatonin level
512 in pony mares (*Equus caballus*), comparison with the hybrid: Mules and with jennies (*Equus*
513 *asinus*). *Reprod Nutr Dev* 2006; 46:633-639.
- 514 Henry M, Gastal EL, Plsjhelro LEL, Guimaraes SEF. Mating patterns and chromosome analysis
515 of a mule and her offspring. *Biol Reprod Monogr Ser* 1995; 1:273-280.
- 516 Jacob JCF, Haag KT, Santos GO, Oliveira JP, Gastal MO, Gastal EL. Effect of embryo age and
517 recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program.
518 *Theriogenology* 2012; 77:1159-1166.
- 519 Kaercher F, Kozicki LE, Camargo CE, Weiss RR, dos Santos IW, Muradas PR, Bertol MAF,
520 de Abreu RA. Embryo transfer in anovulatory recipient mares treated with estradiol benzoate
521 and long acting progesterone. *J Equine Vet Sci* 2013; 33:205-209.
- 522 Martin JL, Saltiel E, Evans JW. Progesterone synthesis by different types of corpora lutea
523 during the first 198 days of pregnancy. *J Equine Vet Sci* 1989; 9:84-87.

- 524 McKinnon AO, Squires EL. Morphologic assessment of the equine embryo. *J Am Vet Med*
525 *Assoc* 1988; 192:401-406.
- 526 Meira C, Ferreira JC, Papa FO, Henry M. Ultrasonographic evaluation of the conceptus from
527 days 10 to 60 of pregnancy in jennies. *Theriogenology* 1998; 49:1475-1482.
- 528 Newcombe JR, Cuervo-Arango J. The relationship between the positive identification of the
529 embryo proper in equine pregnancies aged 18-28 days and its future viability: A field study. *J*
530 *Equine Vet Sci* 2012; 32:257-261.
- 531 Oliveira Neto IV, Canisso IF, Segabinazzi LG, Dell'Aqua CPF, Alvarenga MA, Papa FO,
532 Dell'Aqua JA Jr. Synchronization of cyclic and acyclic embryo recipient mares with donor
533 mares. *Anim Reprod Sci* 2018; 190:1-9.
- 534 Palmer E, Driancourt MA. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. *Theriogenology*
535 1980; 13:203-216.
- 536 Paolucci M, Palombi C, Sylla L, Stradaioli G, Monaci M. Ultrasonographic features of the mule
537 embryo, fetus and fetal-placental unit. *Theriogenology* 2012; 77:240-252.
- 538 Quintero MF, Zarco QL. Transferencia de embriones híbridos (*E. caballus* x *E. asinus*) en
539 mulas. *Vet Méx* 1996; 27:175-177.
- 540 Rocha Filho AN, Pessôa MA, Gioso MM, Alvarenga MA. Transfer of equine embryos into
541 anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. *Anim Reprod*
542 2004; 1:91-95.
- 543 Rong R, Cai H, Wei J. Fertile mule in China and her unusual foal. *J R Soc Med* 1985; 78:821-
544 825.
- 545 Souza AK, Gonzalez MS, Gomes RG, Seneda MM. Estimativa da população folicular ovariana
546 de mulas: Resultados preliminares. *Anim Reprod* 2013; 10:271-271.

- 547 Squires EL, Douglas RH, Steffenhagen WP, Ginther OJ. Ovarian changes during the estrous
548 cycle and pregnancy in mares. *J Anim Sci* 1974; 38:330-338.
- 549 Squires EL, Heesemann CP, Webel SK, Shideler RK, Voss JL. Relationship of altrenogest to
550 ovarian activity, hormone concentrations and fertility of mares. *J Anim Sci* 1983; 56:901-910.
- 551 Stringfellow DA. Recommendations for the sanitary handling of in vivo-derived embryos. In:
552 Stringfellow DA, Seidel SM (eds.). Manual of the International Embryo Transfer Society.
553 Savoy, IL: Savoy; 1998: 79-84.

554 **Figure Legends**

555 **Figure 1.** Graphical representation of the nine uterine segments: anterior right horn (RA),
556 medial right horn (RM), posterior right horn (RP), anterior left horn (LA), medial left horn
557 (LM), posterior left horn (LP), anterior uterine body (BA), medial uterine body (BM), and
558 posterior uterine body (BP).

559 **Figure 2.** Diameter of vesicle (DV) of embryo vesicle from day 10 to 38 of pregnancy in 7
560 mules and 7 mares.

561 segment of the uterus being examined at 24-h intervals.

562 **Figure 3.** Crown-rump length (C-R), width (W), and diameter (D) of embryo/fetus from day
563 21 to 60 of pregnancy in 7 mules and 7 mares.

564 **Figure 4.** Percentage of the embryonic vesicle constituted by the sac yolk sac from day 24 to
565 40 of pregnancy.

566 **Figure 5.** Main aspects of embryonic and fetal development in mule and mare recipients of
567 equine embryo.

568 **Figure 6.** Ultrasonographic characteristics of early gestation in recipient. (A) 10th day of
569 pregnancy – echogenic points located dorsally and ventrally in the embryonic vesicle; (B) 11th
570 day of pregnancy; (C) 12th day of pregnancy; (D) 13th day of pregnancy; (E) 14th day of
571 pregnancy; (F) 15th day of pregnancy – spherical form of the vesicle; (G) 20th day of pregnancy
572 – irregular vesicle shape; (H) 25th day of pregnancy – start of allantoic formation; (I) 30th day
573 of pregnancy – approximately 50% of the allantoic-occupied vesicle; (J) 35th day of pregnancy
574 – embryo in the dorsal pole of the vesicle; (K) 45th day of pregnancy – presence of umbilical
575 cord; (L) 55th day of pregnancy – end of descent of the fetus.

576 **Figure 7.** Mean (\pm sem) of ovarian diameter for left and right ovaries for mule and mare
577 recipients of equine embryo.

578 **Figure 8a and 8b.** Profile of the largest follicles for mules and mares.

579 **Figure 8c.** Distribution of the number of mules and mares with follicles ≥ 25 mm during the
580 experimental period is shown.

581 **Figure 9.** Mean (\pm sem) for uterine horn diameter average in both uterine horns for mules and
582 mares recipients of equine embryo.

583 **Figure 10.** Temporal relationships among endometrial echotexture and uterine tone from day 0
584 to 60 of the pregnancy in mule and mare recipients.

585 **Figure 11.** Mean (\pm sem) systemic levels of eCG and progesterone on various days of
586 pregnancy in mule and mare recipients of equine embryo.

587 **Tables**

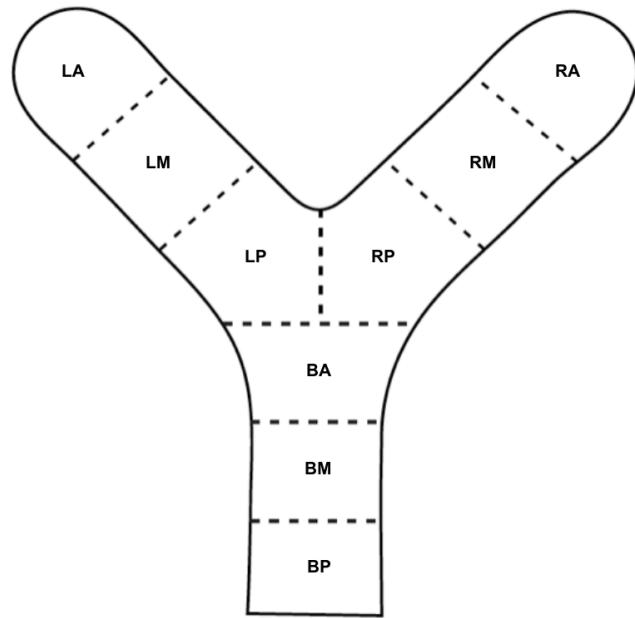
588 **Table 1.** Mean (\pm SD) days at first detection and corresponding diameters for
 589 ultrasonographically identifiable characteristics of the conceptus examined daily between days
 590 10 and 60 after ovulation in mules and mares.

| 591 | 592 | Days | Diameters (mm) | | | |
|-----|-----|-------------------|------------------|-------|------------------|---------|
| 593 | 594 | End Points | Mean (\pm SD) | Range | Mean (\pm SD) | Range |
| 595 | 596 | Embryonic vesicle | | | | |
| 597 | 598 | Ultrasound | | | | |
| 599 | 600 | Mule | 10.0 \pm 0.0 | 10–10 | 3.5 \pm 0.5 | 2.7–4.3 |
| 601 | 602 | Mare | 10.0 \pm 0.0 | 10–10 | 3.9 \pm 0.8 | 2.9–5.4 |
| 603 | 604 | Rectal palpation | | | | |
| 605 | 606 | Rectal palpation | | | | |
| 607 | 608 | Mule | 20.9 \pm 1.3 | 19–23 | | |
| 609 | 610 | Mare | 21.9 \pm 0.9 | 21–23 | | |
| 611 | 612 | Fixation | | | | |
| 613 | 614 | Fixation | | | | |
| 615 | 616 | Mule | 15.7 \pm 1.1 | 14–17 | | |
| 617 | 618 | Mare | 16.6 \pm 1.7 | 14–19 | | |
| 619 | 620 | Embryo proper | | | | |
| 621 | 622 | Embryo proper | | | | |
| 623 | 624 | Mule | 19.9 \pm 1.1 | 19–22 | 2.5 \pm 0.9 | 1.6–4.4 |
| 625 | 626 | Mare | 20.4 \pm 1.3 | 19–22 | 2.7 \pm 0.9 | 1.4–4.0 |
| 627 | 628 | Heart beat | | | | |
| 629 | 630 | Heart beat | | | | |
| 631 | 632 | Mule | 23.4 \pm 1.4 | 21–25 | | |
| 633 | 634 | Mare | 22.6 \pm 0.8 | 22–24 | | |
| 635 | 636 | Allantois | | | | |
| 637 | 638 | Allantois | | | | |
| 639 | 640 | Mule | 25.3 \pm 1.1 | 23–26 | | |
| 641 | 642 | Mare | 24.6 \pm 1.0 | 23–26 | | |
| 643 | 644 | Umbilical cord | | | | |
| 645 | 646 | Umbilical cord | | | | |
| 647 | 648 | Mule | 39.7 \pm 2.1 | 36–43 | | |
| 649 | 650 | Mare | 39.6 \pm 1.5 | 37–41 | | |

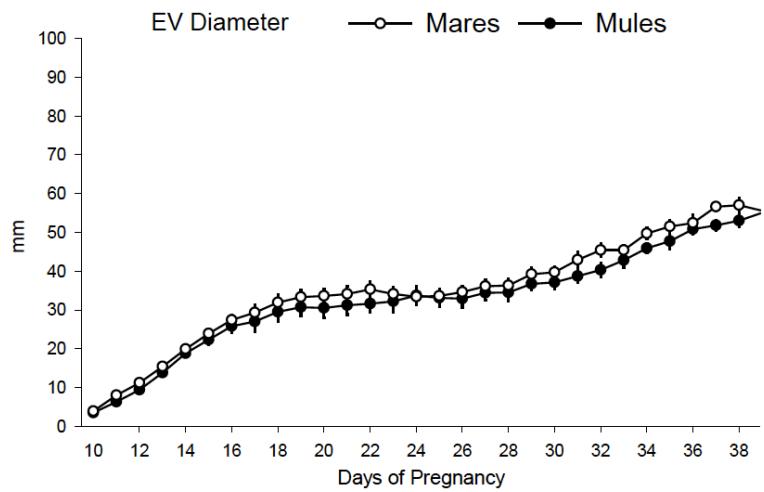
† N = 7 conceptuses (horse) in 7 mules and 7 conceptuses (horse) in 7 mares.

628 **Table 2.** Table 2. Mean (\pm SD) days at first detection and measurements of the embryo proper
 629 in mule and mare recipients.

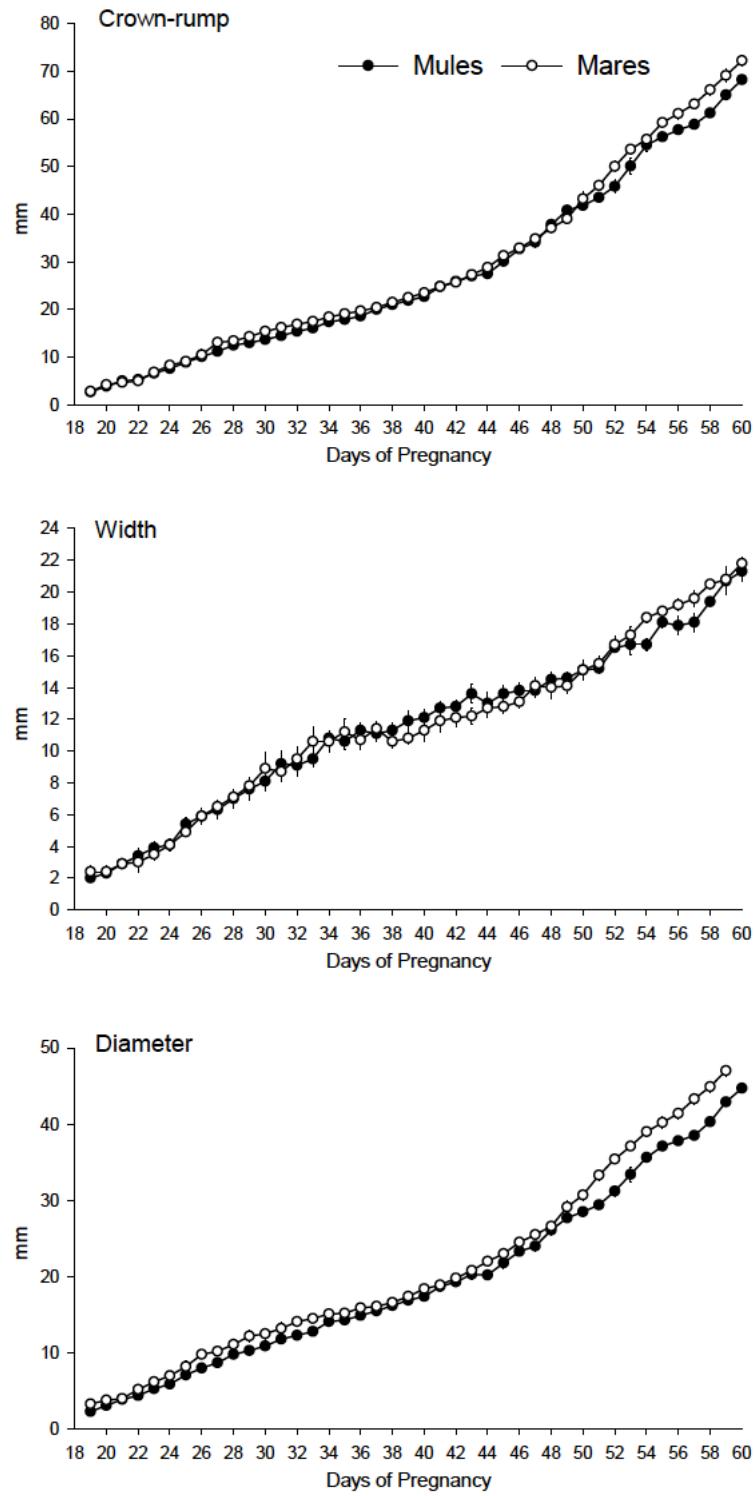
| 630 | 631 | | | Days |
|-----|--|------------------------|------------------|---------|
| 632 | 633 | End Points | Mean (\pm SD) | Range |
| 634 | 635 | Day of first detection | | |
| 636 | 637 | Mule | 19.9 ± 1.1 | 19–22 |
| 638 | 639 | Mare | 20.4 ± 1.3 | 19–22 |
| 640 | 641 | Crown-rump | | |
| 642 | 643 | Mule | 3.1 ± 1.1 | 2.3–5.6 |
| 644 | 645 | Mare | 3.3 ± 1.1 | 1.9–5.0 |
| 646 | 647 | Width | | |
| 648 | 649 | Mule | 1.9 ± 0.7 | 0.8–3.2 |
| 650 | 651 | Mare | 2.1 ± 0.9 | 0.9–3.1 |
| 652 | † N = 7 conceptuses (horse) in 7 mules and 7 conceptuses (horse) in 7 mares. | | | |

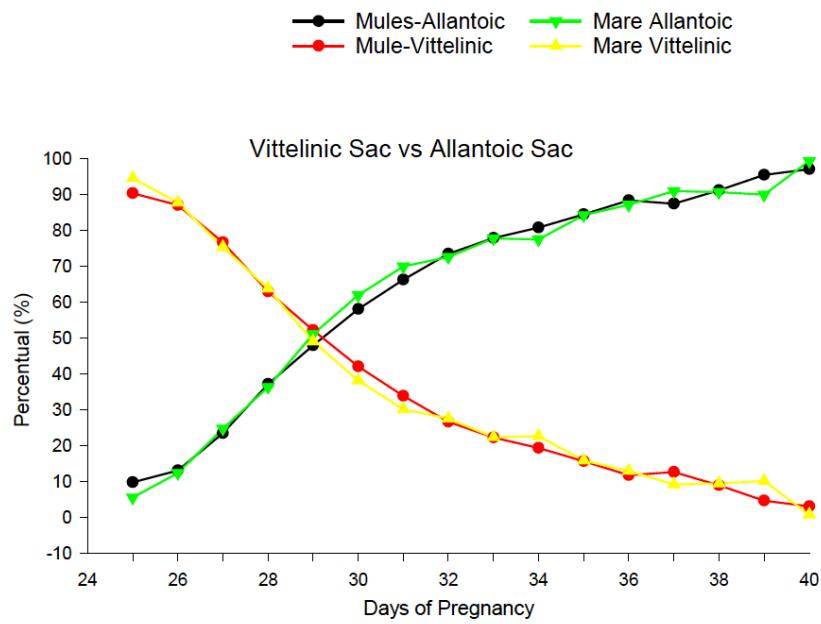
653 **Figure 1.**

654

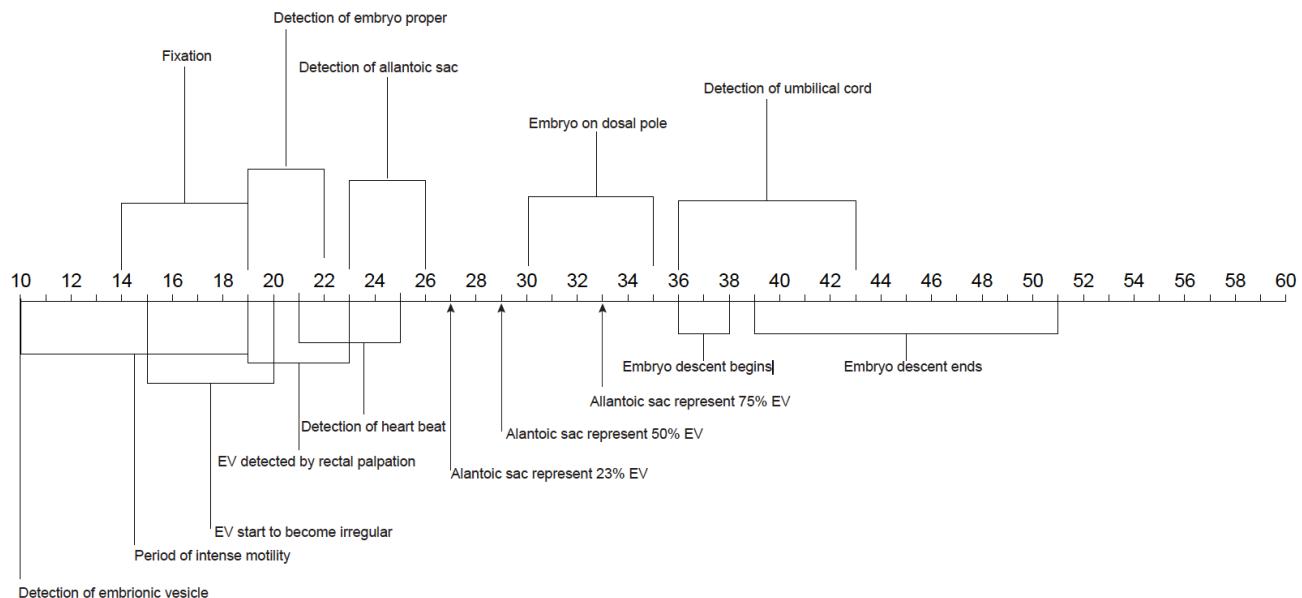
655 **Figure 2.**

656

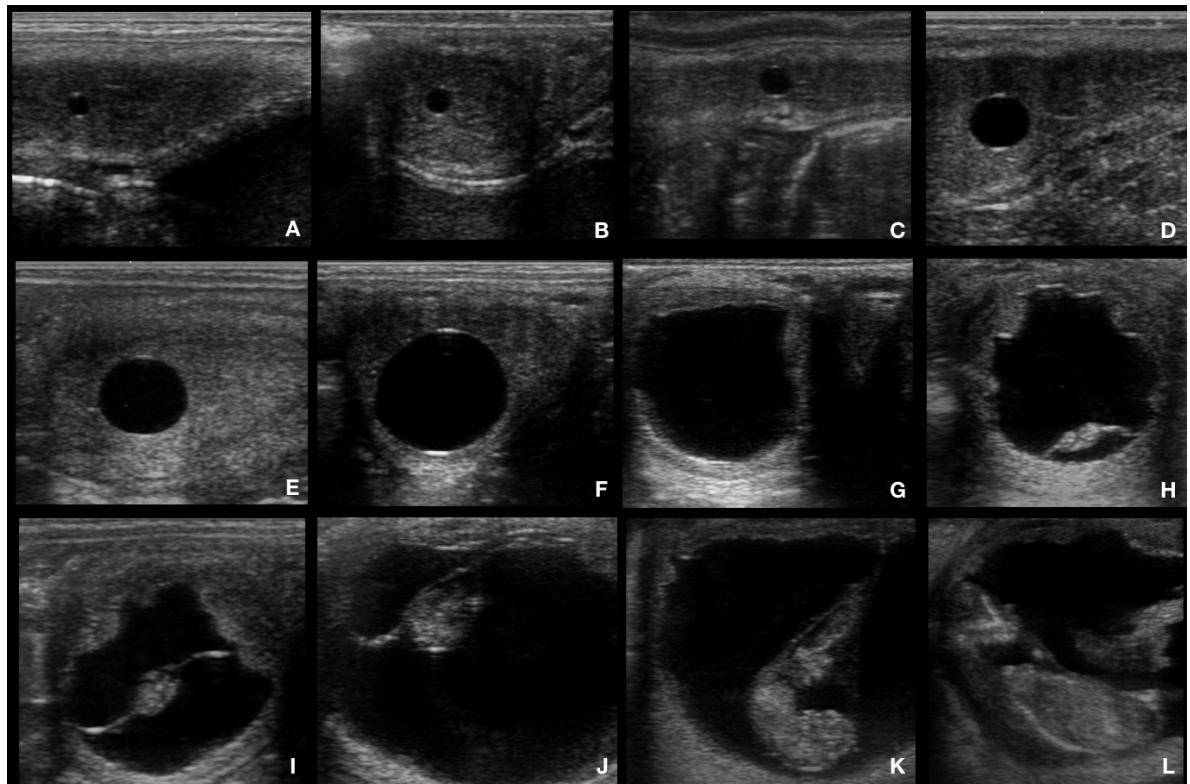
657 **Figure 3.**

659 **Figure 4.**

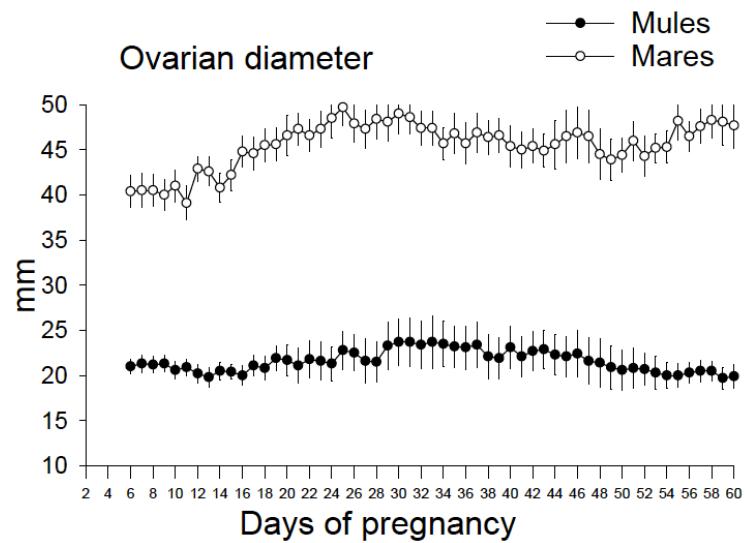
660

661 **Figure 5.**

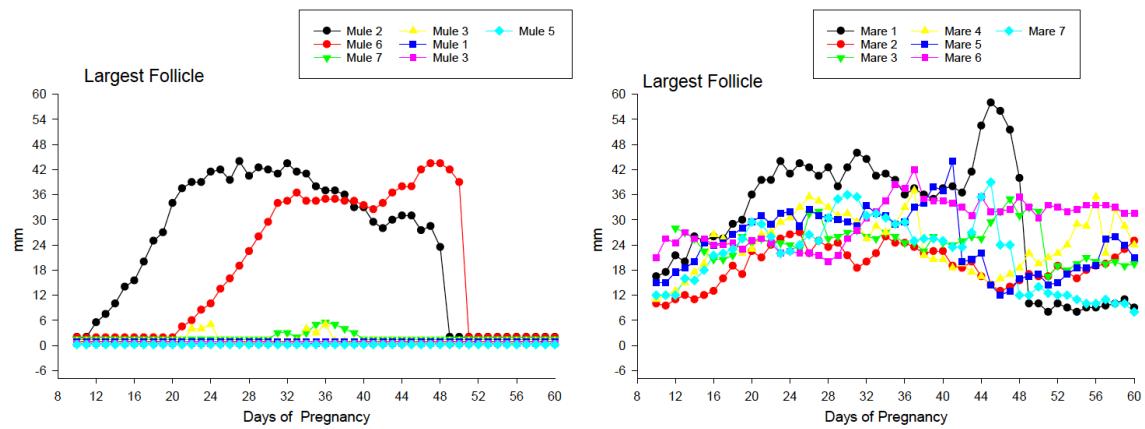
662

663 **Figure 6.**

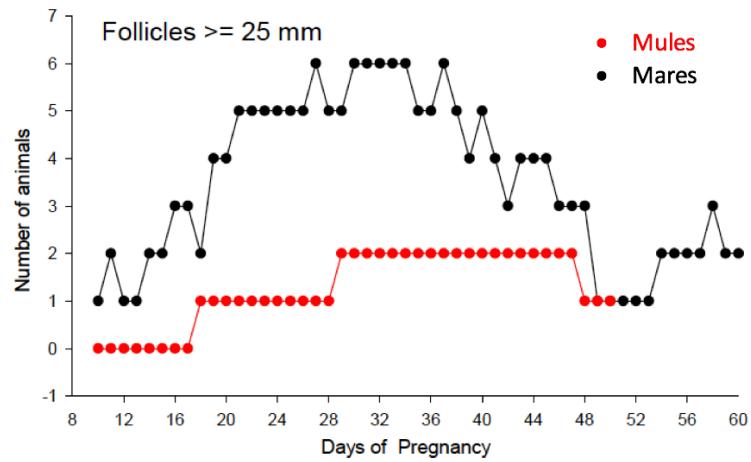
664

665 **Figure 7.**

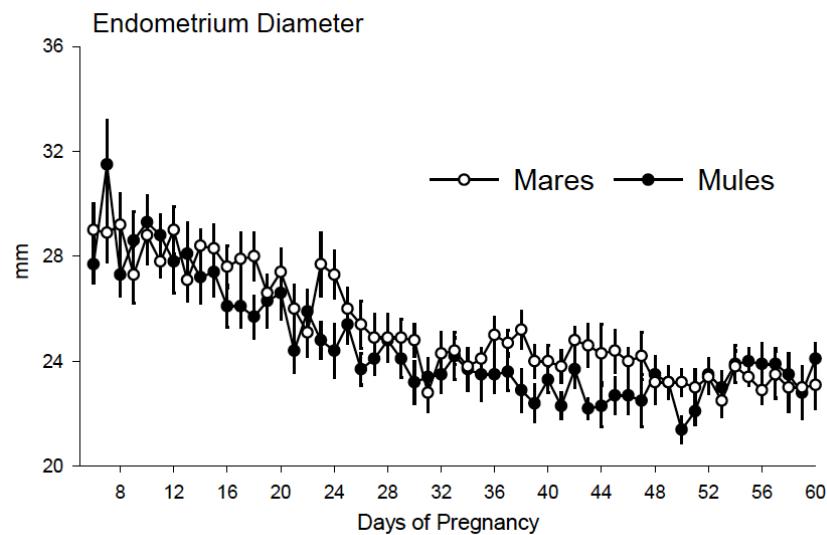
666

667 **Figure 8a and 8b.**

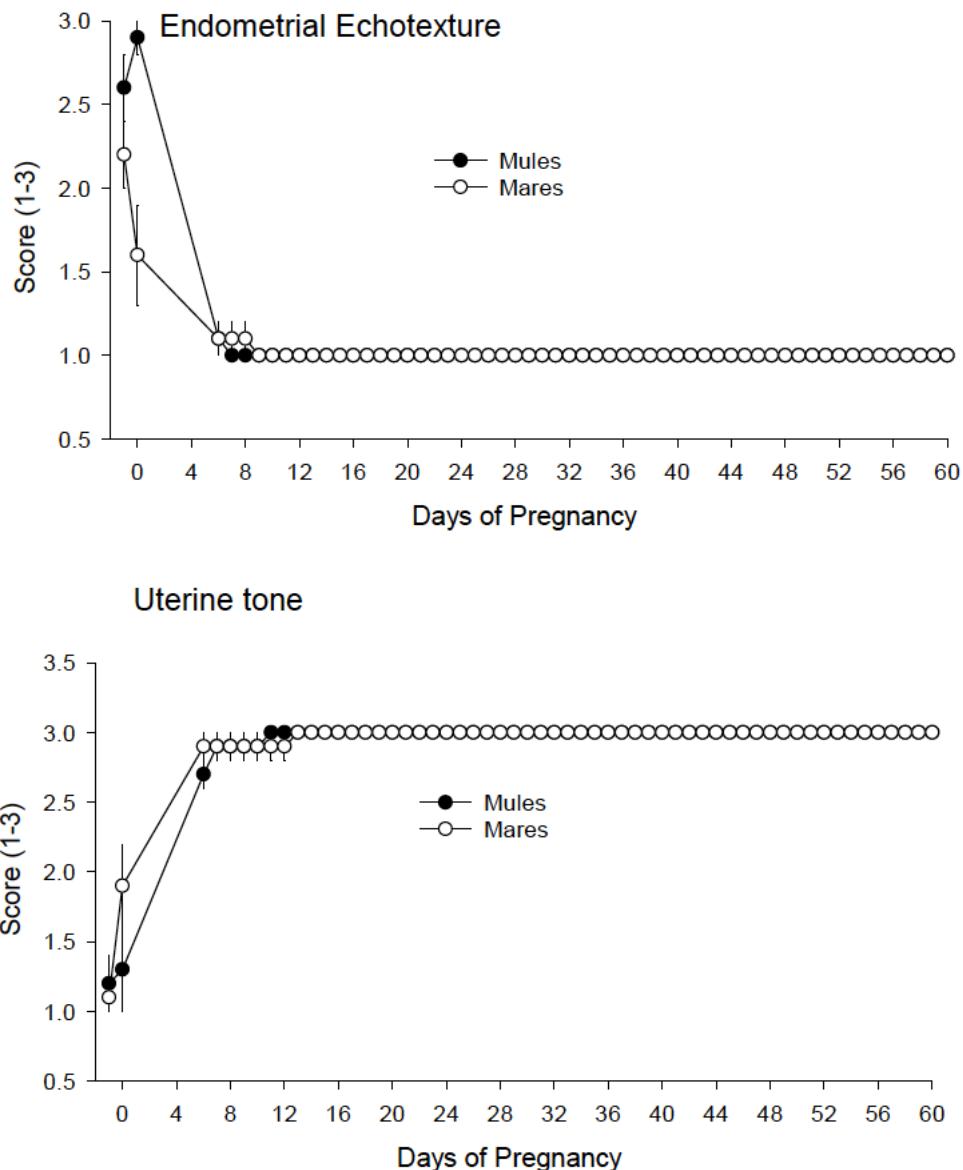
668

669 **Figure 8c.**

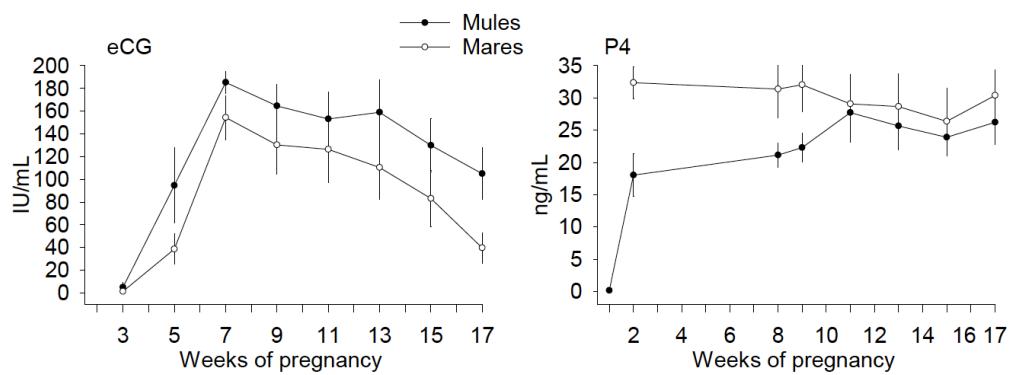
670

671 **Figure 9.**

672

673 **Figure 10.**

674

675 **Figure 11.**

676

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os protocolos hormonais a base de estrógeno e progesterona se mostraram eficientes na sincronização das mulas acíclicas e suas doadoras, assim como na manutenção da gestação.

Grande parte das mulas acíclicas não teve crescimento folicular significativo, bem como formação de corpos lúteos acessórios durante os primeiros 60 dias da gestação mesmo com altos níveis de eCG circulantes.

Apesar dos embriões transferidos terem sido sempre de equinos, conclui-se que o ambiente uterino das mulas receptoras respondeu de maneira diferente ao das éguas na produção de eCG, pois em mulas receptoras essa produção foi maior em relação a éguas receptoras.

A utilização de mulas acíclicas como receptoras de embrião se mostrou semelhante a éguas durante os primeiros 60 dias da gestação em relação aos aspectos reprodutivos, endocrinológicos e ultrassonográficos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, B. B.; FARMER, S. W.; PAPKOFT, H.; STEWART, F.; ALLEN, W.R. Purification and secretion of donkey chorionic gonadotrophin. **Journal of Endocrinology**, v. 85, p. 449-155, 1980.
- ALLEN, WR, Immunological aspects of the equine endometrial cup reaction and the effect of xenogenetic extraspecies pregnancy in horses and donkey. *J Reprod Fert.* 31: 57-94, 1982.
- ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**, v. 121, p. 513-527, 2001a.
- ALLEN, W. R. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 121-131, 2001b.
- ALLEN, W. R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 4, p. 310-329, 2005.
- ALLEN, W. R. The immunological measurement of pregnant mare serum gonadotrophin. **Journal of Endocrinology**, v. 32, p. 593-598, 1969.
- ALLEN, W. R. The Influence of fetal genotype upon endometrial cup development and PMSG and progestagen production in equids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 405-413, 1975.
- ALLEN, W. R. The physiology of early pregnancy in the mare. In: ANNUAL CONVENTION OF AAEP, 46., 2000. **Proceedings of 46th Annual Convention of AAEP**, 2000a, 46, p. 3-15.
- ALLEN, W. R. The physiology of later pregnancy in the mare. In: EQUINE SYMPOSIUM AND ANNUAL CONFERENCE OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 2000. **Proceedings of the Equine Symposium and Annual Conference of Society for Theriogenology**, 2000b, p. 3-15.
- ALLEN, W. R.; KYDD, J. H.; BOYLE, M. S.; ANTEZAK, D. F. Extra-specific donkey-in-horse pregnancy as a model of early fetal death. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 197-209, 1987.
- ALLEN, W. R.; ROWSON, L. E. A. Transfer of ova between horses and donkeys. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION & AI., 7, 1972. **Proceedings of**

7th International Congress Animal Reproduction & AI, Munich, Germany, 1972. p. 484-487. 1972:

ALLEN, W. R.; SHORT, R.V. Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: Anything Goes. **Journal of Heredity**, v. 88, p. 384-392, 1997.

ALVARENGA, M. A. Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p. s319-s333, 2010.

ANTCZAK, D. F.; DAVIES, C. J.; KYDD, J. H.; ALLEN, W. R. Immunological aspects of pregnancy in mules. **Equine Veterinary Journal**, v. 3, p. 68-72, 1985.

ANTCZAK, D. F.; DE MESTRE, A. M.; WILSHER, S.; ALLEN, W.R. The equine endometrial cup reaction: A fetomaternal signal of significance. **Annual Review of Animal Bioscience**, v. 1, p. 419-442, 2013.

AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 220-228, 2011.

BATTUT, I.; COLCHEN, S.; FIENI, F.; TANTURIER, D.; BRUYAS, J. F. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156, or 168 hours after ovulation. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, p. 60-62, 1998.

BATTUT, I.; GRANDCHAMP, A. D. R.; NICHAISE, J. L.; FIENI, F.; TAINTURIER, D.; BRUYAS, J. F. When do equine embryos enter the uterine cavity? An attempt to answer. In: KATILA, T.; WADE, J. F. (Orgs.). **Havemeyer Foundation Monograph Series**. 3.ed. R & W Publications Ltd., Newmarket, 2000. p. 66-68.

BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Relationships between circulating concentrations of FSH and follicular waves during early pregnancy in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 12, p. 274-279, 1992.

BESSENT, C.; GINTHER, O. J. Comparison of early conceptus mobility between mares and jennies. **Theriogenology**, v. 29, p. 13-20, 1988.

BOETA, M.; ZARCO, Q.L. Progesterone and equine chorionic gonadotropin concentrations around the time of pregnancy loss in mares impregnated by donkeys or stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.25, p.531-538, 2005.

BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C. Embryo Transfer. In: BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C. (Orgs.). **Manual of equine reproduction**. 3.ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2011. p. 276-287.

BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C. Pregnancy: physiology and diagnosis. In: BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C. (Orgs.). **Manual of equine reproduction**. 3.ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2011. p. 85-93.

CAIXETA, E. S.; FAGUNDES N. S.; CAIXETA, M. S.; PYLE, E. S. S. Desenvolvimento embrionário inicial equino – Revisão. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinárias**, v. 103, n. 565-566, p. 25-34, 2008.

CAMARGO, C. E. **Fatores reprodutivos que interferem em um programa comercial de transferência de embriões em éguas de hipismo**. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CAMARGO, C. E.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; DUARTE, M. P.; DUARTE, M. C. G.; LUNELLI, D.; WEBER, S.; DE ABREU R. A. Some factors affecting the rate of pregnancy after embryo transfer derived from the Brazilian jumper horse breed. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 11, p. 924-929, 2013.

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

CAMPBELL, M.L.H.: Embryo transfer in competition horses: Managing mares and expectations. **Equine Veterinary Education**, v. 26 (6). p.322-327, 2014

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

CHANDLEY, A. C.; CLARKE, C. A. Cum Mula Peperit. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 78, p. 800-801, 1985.

CLEGG M.T., BODA JM AND COLE H.H. The endometrial cups and allanto- chorionic pouches in the mare with emphasis on the source of equine gonadotropin. **Endocrinology** v. 54, p. 448-463, 1954.

COLE H.H. AND GOSS H., The source of equine gonadotrophin. In **Essays in Biology in Honour of Herbert M. Evans** pp 107-119. University of California Press, Berkeley, 1943

COLE, H. H.; HART, G. H. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. **American Journal of Physiology**, v. 93, p. 57-68, 1930.

COZZI, B.; FERRANDI, B. Fine structure and histochemistry of the equine pineal gland, with special reference to the possible functional role of the electron-dense intrapinealocyte bodies. **Clínica Veterinária**, v. 107, p. 337-346, 1984a.

COZZI, B.; FERRANDI, B. The pineal gland of the horse. Morphological and histochemical results (With notes on the donkey and mule pineal). **Basic and Applied Histochemistry**, v. 28, n. 1, p. 81-90, 1984b.

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

DAVIES, C. J.; ANTEZAK, D. F.; ALLEN, W. R. Reproduction in mules: Embryo transfer using sterile recipients. **Equine Veterinary Journal**, v. 3, p. 63-67, 1985.

DOUGLAS, R. H. Equine embryo transfer. In: MORROW, D. A. (Orgs.). **Current therapy in Theriogenology: Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 71-73.

FLEURY, J. J.; ALVARENGA, M. A.; FIGUEIREDO, J. B.; PAPA, F. O. Transferência de embriões em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, n. 3, p. 485-487, 1987.

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

equinos da raça Mangalarga. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 29-33, 2001.

GASTAL, E. L.; SANTOS, G. F.; HENRY, M.; PIEDADE, H. M. Embryonic and early foetal development in donkeys. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 10-13, 1993.

GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Factors related to the time of fixation of the conceptus in mares. **Theriogenology**, v. 46, p. 1171-1180, 1996.

GINTHER, O. J. Fixation and orientation of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 19, p. 613-623, 1983.

GINTHER, OJ, Bergfelt DR, Leith GS, Scraba ST. Embryonic loss in mares: incidence and ultrasonic morphology. **Theriogenology**. v. 24, p.73-86, 1985

GINTHER, O. J. Maternal aspects of pregnancy. In: GINTHER, O. J (Orgs.). **Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects**. 2.ed. Wisconsin: Equiservices; 1992. p. 324-328.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects**. 2.ed. Wisconsin: Equiservices; 642 p.1992.

GINTHER, O. J. **Embryo: Ultrasonic imaging and animal reproduction: Horses**. Book 2. Cross Plains WI: Equiservices, 1995. p. 123-155.

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

GONZÁLEZ, S. M.; GOMES, R. G.; SOUZA, A. K.; SILVA, C. S.; SILVA-SANTOS, K. C.; SENEDA, M. M. Evidences of regular estrous cycles in mules and successful use of these animals as recipients for donkey embryos. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 35, p. 869-872, 2015.

GOSPODOROWICZ, D. Purification and physiochemical properties of the pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG). **Endocrinology**, v. 91, p. 101-106, 1972.

GRECO, G. M. **Efficiency of Different Ovulation Inducing and Combinations on Uterine and Ovarian Characteristics and Plasmatic LH Concentrations in Mares**. 2016. 115 f. Tese

(Doutorado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

GRECO, G. M.; BURLAMAQUI, F. L. G.; PINNA, A. E.; QUEIROZ, F. J. R.; CUNHA, M. P. S.; BRANDÃO, F. Z. Use of long acting progesterone to acyclic embryo recipient mares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 3, p. 607-611, 2012.

GRECO, G. M.; FIORATTI, E. G.; SEGABINAZZI, L. G.; DELL'AQUA JR., J. A.; CRESPILO, A. M.; CASTRO-CHAVES, M. M. B.; ALVARENGA, M. A. Novel long-acting progesterone protocols used to successfully synchronize donor and recipient mares with satisfactory pregnancy and pregnancy loss rates. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 39, p. 58-61, 2016.

GUILLAUME, D.; ZARAZAGA, L. A.; MALPAUX, B.; CHEMINEAU, P. Variability of plasma melatonin level in pony mares (*Equus caballus*), comparison with the hybrid: Mules and with jennies (*Equus asinus*). **Reproduction Nutrition Development**, v. 46, p. 633-639. 2006.

HENRY, M., GASTAL, E.L., PINHEIRO, L.E.L., & GUIMARÃES, S.E.F. Mating pattern and chromosome analysis of a mule and her offspring. **Biology of Reproduction Monograph** v.1, p. 273-279, 1995.

HOLTAN, D. W.; SQUIRES, E. L.; LAPIN, D. R.; GINTHER, O. J. Effect of ovariectomy on pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, p. 457-463, 1979.

IRVINE, C. H. G. Endocrinology of the estrous cycle of the mare: Applications to embryo transfer. **Theriogenology**, v. 15, p. 85-104, 1981.

JACOB, J. C. F.; HAAG, K. T.; SANTOS, G. O.; OLIVEIRA, J. P.; GASTAL, M. O. L.; GASTAL, E. L. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1159-1166, 2012.

KAERCHER, F.; KOZICKI, L. E.; CAMARGO, C. E.; WEISS, R. R.; SANTOS, I. W.; MURADAS, P. R.; ABREU, R. A. Embryo transfer in anovulatory recipient mares treated with estradiol benzoate and long-action progesterone. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 205-209, 2013.

- KRAEMER, D. A History of Equine Embryo Transfer and Related Technologies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 5, p. 305-308, 2013.
- LIMA, R. A. S.; CINTRA A. G. **Revisão Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Piracicaba: MAPA, ESALQ/USP, 54 p. 2016.
- MCCUE, P. M.; SQUIRES, E. L. **Equine Embryo Transfer**. 1.ed. CRC Press, 184 p. 2015.
- MCKINNON, A. O.; LESCUN, T. B.; WALKER, J. H.; VASEY, J. R.; ALLEN, W. R. The inability of some synthetic progestagens to maintain pregnancy in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, p. 83-85, 2000.
- MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Morphologic assessment of equine embryo – A review. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 3, p. 401-406, 1988.
- MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine reproduction**. John Wiley & Sons, USDA, 3288 p. 2011.
- MEIRA, C.; HENRY, M. Evolution of two non-surgical equine embryo transfer methods. **Journal Reproduction Fertility**, suppl. 44, p. 712 – 713, 1991.
- MEIRA, C.; FERREIRA, J. C.; 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.
- NEWCOMBE, J. R. The relationship between the number, diameter, and survival of early embryonic vesicles. **Pferdheilkunde**, v. 20, p. 214-220, 2004.
- NEWCOMBE, J. R.; CUERVO-ARANGO, J. The relationship between the positive identification of the embryo proper in equine pregnancies aged 18-28 days and its future viability: A field study. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 5, p. 257-261, 2012.
- OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical egg transfer in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, n. 2, p. 313-320, 1974.
- OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical recovery of equine eggs, and attempt at non-surgical egg transfer in horses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, n. 2, p. 187-195, 1972.

OLIVEIRA NETO, I. V.; CANISSO, I. F.; SEGABINAZZI, L. G.; DELL'AQUA, C. P. F.; ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JR.; J. A. Synchronization of cyclic and acyclic embryo recipient mares with donor mares. **Animal Reproduction Science**, v. 190, p. 1-9, 2018.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M. A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, v. 13, p. 203-216, 1980.

PANZANI, D.; ROTA A.; MARMORINI, P.; VANNOZZI, I.; CAMILLO, F. Retrospective study of factors affecting multiple ovulations, embryo recovery, quality, and diameter in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 82, n. 6, p. 807-814, 2014.

PAOLUCCI, M.; PALOMBI, C.; SYLLA, L.; STRADAIOLI, G.; MONACI, M. Ultrasonographic features of the mule embryo, fetus and fetal-placental unit. **Theriogenology**, v. 77, p. 240-252, 2012.

PAPA, F. O.; MELO, C. M.; DELL'AQUA, J. A.; MACEDO, L. P.; CARVALHO, A. G.; ALVARENGA, M. A.; MEDEIROS, A. S. Inovações metodológicas na Biotecnologia de refrigeração e congelação de sêmen equino. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 19, 2005, Angra dos Reis. **Anais da 19ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**. 2005. p. 19-27.

PERES, C. F.; ALVARENGA, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. Effect of eFSH on ovarian cyclicity and embryo production of mares in spring transitional phase. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, p. 176-180, 2007.

PERRY, G., B. **IETS 2015 Statistics and Data Retrieval Committee Report**: The year 2015 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. [Denver]: IETS, 2015. 16 p.

PINTO, M. R.; MIRAGAYA, M. H.; BURNS, P.; DOUGLAS, R.; NEILD, D. M. Strategies for increasing reproductive efficiency in a commercial embryo transfer program with high performance donor mares under training. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 54, p. 93-97, 2017.

PYCOCK, J. F. The pregnant mare: diagnosis and management. In: SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. (Orgs.). **Current Therapy in Equine Reproduction**. 5.ed, Missouri: Saunders, 2007. p. 335-342.

- QUINTERO, M. F.; ZARCO, Q. L. Transferência de embriones híbridos (*E. caballus* x *E. asinus*) en mulas. **Veterinaria México**, v. 27, p. 175-177, 1996.
- RIBEIRO, E.A., MELLO, M.O. **Transferência de embrião muar para mulas acíclicas**. Disponível em: <http://www.mulaparida.com/sobre.pdf>. Acessado em: 21 de fev. 2012.
- RIERA, F. L. General techniques and organization of large commercial embryo transfer programs. **Clinical Theriogenology**, v. 3, p. 318-324, 2011.
- RIERA, F. L. Equine embryo transfer. In: SAMPER, J. C. (Orgs.). **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009. p. 185-199.
- ROCHA-FILHO, A. N.; PESSÔA, M. A.; GIOSO, M. M.; ALVARENGA, M. A. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. **Animal Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 91-95, 2004.
- RONG, R. H.; WEI, J. Fertile mule in China and her unusual foal. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 78, p. 821-825, 1985.
- SHORT, R. V. An introduction to mammalian interspecific hybrids. **Journal of Heredity**, v. 88, p. 355-357, 1997.
- SILVA, E. S. M.; PUOLI FILHO, J. N. P.; MEIRA, C. Aspectos relacionados à formação, função e regressão dos corpos lúteos suplementares em éguas. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 3, p. 283-293, 2012.
- SILVA, L. A.; GINTHER, O. J. An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 337-343, 2006.
- SQUIRES, E. L.; DOUGLAS, R. H.; STEFFENHAGEN, W. P.; GINTHER, O. J. Ovarian changes during the estrous cycle and pregnancy in mares. **Journal Animal Science**, v. 38, p. 330-338, 1974.
- SQUIRES, E. L.; GARCIA, R. H. Factors affecting success of equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal**, v. 3, p. 92-95, 1985.

- SQUIRES, E. L.; MCKINNON A. O.; SHIDELER, R. K. Use of ultrasonography in reproductive management of mares. **Theriogenology**, v. 29, p. 55-70, 1988.
- SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, p. 91-104, 1999.
- SQUIRES, E. L. Human Chorionic Gonadotropin. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Orgs.). **Equine Reproduction**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. p. 357-367.
- SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 151-170, 2003.
- STEINER, C. C.; RYDER O. A. Characterization of Prdm9 in equids and sterility in mules. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. 1-7, 2013.
- STOUT, S. S.; STEWART, F.; ALLEN, W. R. The role of allantoic mesenchyme in the formation of the chorionic girdle. **Theriogenology**, v. 58; p. 813-815, 2002.
- STROUD., B. **IETS 2010 Statistics and Data Retrieval Committee Report**: The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. [Denver]: IETS, 2015. 23 p.
- TAYLOR MJ, SHORT RV. Development of the germ cells in the ovary of the mule and hinny. *Journal of Reproduction and Fertility*. v. 32 p.441–445, 1973
- TROEDSSON, M.; SAGE, A. M. Evaluación del feto y de la placenta en la yegua. In: BALL, B. A. (Orgs). **Recent advances in equine reproduction**. 6 p. IVIS, 2001.
- VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses. In: YOUNGQUIST, R. S.; THRELFALL, W. R. (Orgs.). **Current therapy in large animal theriogenology**. Missouri, 1088p. 2007.
- WILSHER, S.; KÖLLING, M.; ALLEN, W. R. Meclofenamic acid extends donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, p. 428-432, 2006.
- WODSEDALEK, J. E. Causes of sterility in the mule. **The Biological Bulletin: Marine Biology Virtual Lab**, v. 30, p. 1-56, 1916.

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**, v. 22 p. 749-767, 2001.

ZERLOTTI, M. Como selecionar e preparar éguas receptoras para a transferência de embriões. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 13., 2012, Campinas. **Anais da Revista Brasileira de Medicina Veterinária Equina**, Campinas, v. 41, p. 68- 712012.