

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

FATORES RELACIONADOS A DETERMINAÇÃO DO SEXO DE POTROS DA
RAÇA PSC

JONAS GOMES FLORES

PORTO ALEGRE

2018

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

**FATORES RELACIONADOS A DETERMINAÇÃO DO SEXO DE POTROS DA
RAÇA PSC**

Autor: Jonas Gomes Flores

Tese apresentada ao
programa de Pós-Graduação da
Faculdade de Veterinária da
UFRGS como requisito para
obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na área
de Reprodução Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Mara da Encarnação Fiala Rechsteiner

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Flores, Jonas
FATORES RELACIONADOS A DETERMINAÇÃO DO SEXO DE
POTROS DA RAÇA PSC / Jonas Flores. -- 2018.
52 f.
Orientador: Sandra Mara da Encarnação Rechsteiner.

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. Sexo Potros. 2. Manejo Reprodutivo. 3.
Cromossomo Y. 4. Proporção Macho:Fêmea. 5. Ovulação.
I. Rechsteiner, Sandra Mara da Encarnação, orient.
II. Título.

JONAS GOMES FLORES

**FATORES RELACIONADOS A DETERMINAÇÃO DO SEXO DE POTROS DA
RAÇA PSC**

APROVADO POR:

Prof. Dra. Sandra Mara da Encarnação Fiala Rechsteiner
Orientadora e Presidente da Comissão

Dra. Adriana Kroeff Tarouco
Membro da Comissão

Prof. Dra. Adriana Pires Neves
Membro da Comissão

Dr. Henrique Boll de Araújo Bastos
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus.

Minha família por todo o apoio que recebo em minha vida.

Agradeço muito a minha orientadora Sandra Fiala pela orientação e paciência na execução deste trabalho.

Agradeço aos médicos veterinários, os quais me auxiliaram para a coleta dos dados da pesquisa.

Agradeço ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos - UFRGS, pela iniciativa de desenvolver um programa de mestrado e doutorado, exclusivo em equinos no Brasil, e por compartilhar os seus conhecimentos com os alunos.

Agradeço a CAPES por toda a ajuda financeira para realização dessa pesquisa.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos.

“Só tem convicções aquele que não aprofunda nada.”

Emil Cioran

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores médio, mínimo e máximo; desvio padrão das variáveis contínuas (idade das éguas, dos garanhões e diâmetro do folículo).....	34
Tabela 2- Frequência de distribuição da idade das éguas utilizadas no experimento.....	35
Tabela 3- Frequência da distribuição da idade dos garanhões utilizados no experimento.....	35
Tabela 4- Avaliação dos fatores de influência no sexo dos potros.....	36
Tabela 5- Modelos de Regressão Logística Simples.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – antes de Cristo

CL – corpo lúteo

cm - centímetros

°C – graus Celsius

d – dias

dp – desvio padrão

FSH – hormônio folículo estimulante

FISH – hibridização fluorescente *in situ*

FIV – fertilização *in vitro*

G - grupo

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas

h – horas

hCG – gonodotrofina coriônica humana

IM – intramuscular

Kg – quilograma

LH – hormônio luteinizante

mg – miligramas

MHz – megahertz

mm – milímetros

m - metro

PSC – puro sangue de corrida

reLH - hormônio luteinizante recombinante equino

RS – Rio Grande do Sul

UI – unidades internacionais

U\$- dólar

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Características do Sêmen Equino	14
2.2 Centrifugação em Gradiente de Densidade	15
2.3 Citometria de Fluxo	16
2.4 Ovulação	17
2.5 Indutores da Ovulação	18
2.6 Fecundação	20
2.7 Fatores que Influenciam o Sexo dos Produtos	21
2.7.1 Momento da Ovulação.....	22
2.7.2 Condição Corporal da Progenitora.....	23
2.7.3 Assincronia do Desenvolvimento.....	23
2.7.4 Ovários.....	23
2.7.5 Corno Gestante.....	24
2.7.6 Idade dos Progenitores.....	25
3 ARTIGO	26
4 CONCLUSÕES	38
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMO**FATORES RELACIONADOS A DETERMINAÇÃO DO SEXO DE POTROS DA
RAÇA PSC**

Autor: Jonas Gomes Flores

Orientadora: Sandra Mara da Encarnação Fiala Rechsteiner

As biotécnicas da reprodução na espécie equina avançaram na última década e os criadores de equinos começaram a questionar as possibilidades de interferência na determinação do sexo dos potros. A determinação do sexo é importante, pois o sexo do potro possui grande influência no valor comercial do mesmo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do momento da cobertura em relação ao momento da ovulação no sexo dos potros e outros fatores como: idade da égua e garanhão; indutor da ovulação; ovário em que ocorreu a ovulação e o diâmetro do folículo pré-ovulatório também foram avaliados. O estudo foi realizado em Haras na região de Bagé e Aceguá (RS) – Brasil (31°24'06.1"S 54°07'47.5"W) e (31°30'16.0"S 54°07'45.5"W) nas estações de monta de 2011 a 2015. Utilizou-se 259 ciclos reprodutivos de 160 éguas e 22 garanhões da raça Puro Sangue de Corrida. Informações como agente indutor de ovulação utilizado (Deslorelina; n = 187 ou hCG; n = 72); data da cobertura (n = 259); momento da ovulação em relação a cobertura (+ 24 horas; n = 69 e - 24 horas; n = 190); idade da égua (G1: até 8 anos; n = 123, G2: 9 até 14 anos n = 110 e G3: >14 anos; n = 26); idade do garanhão (Até 14 anos; n = 11 e >15 anos; n = 11) ; ovário em que a ovulação ocorreu (Direito; n = 122 e Esquerdo; n = 137); foram registrados e avaliados. No total de potros nascidos, 136 foram machos (52,51%) e 123 foram fêmeas (47,49%). O tempo decorrido após a cobertura não influenciou o sexo dos produtos, nas éguas que ovularam com – 24h após a indução da ovulação: 104 potros (54,74%) eram machos e 86 (45,26%) eram fêmeas, enquanto que nas éguas que ovularam com + 24h, 32 potros (46,38%) eram machos e 37 (53,62%) eram fêmeas. A porcentagem de fêmeas nascidas em relação a idade da égua foi de 46,34% (n=57), 47,27% (n=52) e 46,15% (n=12) nos grupos G1, G2 e G3 respectivamente. Garanhões com idade até 15 anos tiveram 44,14% (n=49) de fêmeas e com mais de 15 anos

49,66% (n=73) eram fêmeas. Não houve diferença no sexo dos produtos quanto ao agente indutor da ovulação (Deslorelina x hCG) e ovário em que ocorreu a ovulação. O presente estudo concluiu que nenhum dos fatores estudados alterou a proporção macho:fêmea dos potros nascidos.

Palavras-chave: Macho:Fêmea; Ovulação; Espermatozóiide; Égua; Garanhão.

ABSTRACT**FACTORS RELATED TO THE SEX OF FOALS IN THOROUGHBRED HORSES**

Author: Jonas Gomes Flores

Advisor: Sandra Mara da Encarnação Fiala Rechsteiner

The biotechnologies of reproduction in equine species have been improved in the last decade and the horse breeders started to inquire about the possibility of intervention regarding to the sex determination in foals. Sex determination is important because the sex of the foal has a great influence on the commercial value of the foal. The aim of the present study is was to evaluate the influence of the time of the breeding in relation to time of ovulation in the sex of the foals, besides analyzing other factors such as: the age of the mare and the stallion; ovulation inductor, ovary and the diameter of the preovulatory follicle. The study was accomplished in studs located Bagé/RS and Aceguá/RS – Brazil ($31^{\circ}24'06.1''S$ $54^{\circ}07'47.5''W$) and ($31^{\circ}30'16.0''S$ $54^{\circ}07'45.5''W$) during the breeding seasons from 2011 to 2015, using 259 reproductive cycles of 160 mares and 22 stallions of Thoroughbred breed. Information like the induction of ovulation agent that was used (Deslorelin; n = 187 or hCG; n = 72); date of breeding (n = 259); time of ovulation in relation to the breeding (+24 hours; n = 69 and -24 hours; n = 190); age of the mare (G1: up to the age of 8; n = 123 G2: from the age of 9 to the age of 14; n = 110 and G3: >14 years old; n = 26); age of the stallion (up to the age of 14; n = 11 and >15 years old; n = 11); ovary in which the ovulation occurred (Right; n = 122 and Left; n = 137) were catalogued and evaluated. As result, 136 (52,51%) were born colts and 123 (47,49%) were born fillies. The elapsed time from breeding to ovulation did not influence on the sex of the product, on mares that ovulated in less than 24 hours after the ovulation induction: 104 foals (54,74%) were male and 86 (45,26%) were female, whereas in the mares that ovulated in more than 24 hours, 32 foals (46,38%) were male and 37 (53,62%) were female. The percentage of born females regarding to the age of the mare was 46,34% (n = 57), 47,27% (n = 52) and 46,15% (n = 12) in the groups G1, G2 and G3, respectively. From stallions up to the age of 15 years, 44,14% (n = 49) were females and from those which were older than 15 years old, 49,66% (n = 73) were females. There was no difference regarding the

sex of the product in relation to the ovulation inducer agent (Deslorelin x hCG) and ovary in which the ovulation occurred. None of the factors studied modified the male:female proportion of the born foals.

Keywords: Male:Female; Ovulation; Sperm cells; Mare; Stallion.

1 INTRODUÇÃO

Em nossa sociedade, o cavalo apresenta diversos papéis: força de trabalho, lazer, esporte, produção de soros hiperimunes e em tratamentos como na equoterapia, denotando sua tamanha importância para o homem. Referida grandeza é confirmada pelos dados do IBGE, segundo os quais, no ano de 2015, o Brasil ocupava a quarta posição no rebanho mundial, com cerca de 5,5 milhões de animais (IBGE, 2015). Entre as prestações de serviços da equinocultura encontram-se a reprodução e o melhoramento genético utilizando as biotecnologias da reprodução, conseqüentemente este setor cresce acompanhando a demanda da atividade (PESSOA, 2016). Somente com a produção de cavalos, o agronegócio movimentou valores próximos a R\$ 7,3 bilhões, gerando, ainda, 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (ALMEIDA e SILVA, 2010).

Conforme escritos de Demócrito de Abdera, os gregos do século V AC acreditavam que cada testículo dava origem a um dos sexos, e que a retirada do esquerdo resultava no nascimento de filhos de sexo masculino, preferidos em sociedades altamente machistas (HUNTER, 1995).

Sabe-se que a metade dos espermatozoides contém o cromossomo Y, que gera machos; a outra metade, o X, que origina as fêmeas. O sexo do descendente é determinado pelo tipo de espermatozoide que fertiliza o óvulo, logo, é o gameta paterno que determina o sexo da prole (PARISOTTO et al., 2003).

O sexo do potro possui grande influência no valor comercial do animal, eis que certas linhagens de cavalos apresentam melhores resultados (morfológicos, performáticos etc.), a depender dos descendentes serem machos ou fêmeas.

Com o avanço das biotecnologias, os criadores de equinos começam a questionar as possibilidades de interferência na determinação do sexo dos potros. Para criadores de cavalos, o interesse em gerar um potro com o sexo pré-determinado é subjetivo. Eis algumas das possíveis razões: substituir uma égua; gerar um animal de linhagem nobre que mais tarde possa se tornar um garanhão; alguns garanhões aparentemente produzem melhores potros do que potras ou vice-versa; ou, ainda, por interesses econômicos (SAMPER et al., 2012).

Segundo CHEZUM e WIMMER (1997), na raça Puro Sangue de Corrida (PSC), potros machos apresentaram melhores preços em leilões realizados nos Estados Unidos.

A possível separação dos espermatozoides portadores do cromossomo sexual masculino (Y) e do cromossomo sexual feminino (X) é uma alternativa interessante para a

indústria de produção animal devido à possibilidade de ganho econômico e gerencial, resultante da escolha programada do sexo dos descendentes (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003).

Algumas abordagens tecnológicas são utilizadas na tentativa de selecionar o sexo em mamíferos, seja nas espécies de interesse zootécnico, seja em espécies ameaçadas de extinção, em animais de companhia ou mesmo na reprodução humana assistida. Neste sentido, destacam-se duas alternativas: a separação de espermatozoides portadores do cromossomo X daqueles portadores do cromossomo Y, através da citometria de fluxo, técnica, todavia, cujo equipamento ainda é muito caro; ou a sexagem de embriões pré-implantação, o que não é permitido na criação de cavalos PSC (LIMA, 2007).

O estro na égua dura de cinco a sete dias, enquanto que a maioria das ovulações ocorre de 24 a 48 horas antes do final do estro, dificultando, desta forma, a determinação do momento exato da ovulação. Existem substâncias capazes de induzir a ovulação em éguas, como a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) e a Deslorelina. Com a utilização destas, e desde que a égua se encontre apta, é possível obter uma ovulação em um intervalo de até 48 horas, com 80% e 83,3% de eficácia, respectivamente (BERGFELT, 2000; SAMPER et al., 2002). Através desta abordagem, é possível aproximar ou afastar o momento da cobertura da ovulação; e, com o exame ultrassonográfico, via transretal, pode-se obter o diagnóstico preciso da ovulação.

Em algumas espécies, como bovinos, ovinos, camundongos e humanos, estudos demonstraram que o momento da cópula ou inseminação artificial, em relação à ovulação, influencia na proporção macho:fêmea da prole (MARTINEZ et al., 2004; HORNING e McCLINTOCK, 1996; PAUL e KUESTER, 1987; WEHNER et al., 1997). Todavia, até o momento, nenhum estudo com equinos neste mesmo sentido foi publicado.

Ainda hoje, é muito comum proprietários de cavalos e Médicos Veterinários discutirem se o momento da cobertura e o momento da ovulação da égua teriam influência no sexo do potro. Muitos acreditam na hipótese que coberturas realizadas próximo à ovulação geram potros machos, considerando que o espermatozóide Y é mais rápido e chegaria primeiro em condições de fertilizar o oócito.

O objetivo do trabalho foi avaliar se o momento da cobertura pode ou não alterar a proporção macho:fêmea, bem como investigar eventuais outros fatores que possam ter interferência no sexo dos potros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do Sêmen Equino

O período de tempo para uma espermatogônia ser convertida em um espermatozoide incorporado dentro do lúmen do túbulo seminífero é de 55-57 dias no garanhão (HAFEZ e HAFEZ, 2000).

Aproximadamente nove dias são necessários para o transporte dos espermatozoides através do sistema de ductos, conseqüentemente, uma população nova de espermatozoides pode ser ejaculada após 64-66 dias (LOVE, 2002). Bilhões de espermatozoides são produzidos a cada dia (16 milhões de espermatozoides por grama de tecido testicular por dia no garanhão) sendo que muitas das células produzidas são defeituosas e são eliminadas através de apoptose e fagocitose pelas células de Sertoli, e outras são eliminadas no ejaculado (HENINGER et al., 2004).

Em média, um garanhão ejacula entre 10 e 100ml de sêmen e cerca de 6 bilhões de espermatozoides por ejaculado, havendo uma enorme variação entre indivíduos (MOREL, 2003). Touros ejaculam de 5 a 7ml de sêmen, com uma concentração de 7 a 11 bilhões de espermatozoides (SILVA et al., 2009). Uma das características mais comumente avaliada é a motilidade espermática, que expressa a proporção de espermatozoides móveis presentes no sêmen, tal avaliação é feita colocando-se uma gota de sêmen entre uma lâmina e lamínula previamente aquecidas entre 35-37°C e analisado por microscópio em um aumento de 200X em uma escala de porcentagem variando de 0 a 100%, a motilidade total para a maioria dos garanhões varia de 40 a 80% (CBRA, 2013).

Existe uma diferença no conteúdo de DNA dos espermatozoides, em bovinos o cromossomo X contém aproximadamente 4% a mais de DNA do que cromossomo Y (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003), em garanhões a proporção é de 3,4%-3,7% (GARNER, 2006). Conforme Wilcox et al. (1995), o cromossomo X possui maior massa do que o cromossomo Y, e essa diferença de densidade poderia influenciar o movimento espermático.

O espermatozoide que carrega o cromossomo Y tem cabeça menor, é mais rápido e menos resistente em comparação àquele que carrega o X. Dessa maneira, se a cobertura ocorrer perto do período da ovulação, há mais chances do espermatozoide Y encontrar o oócito e, conseqüentemente, a prole nascer com o sexo masculino. Já se a cobertura ocorrer muito tempo antes da ovulação, o espermatozoide X, mais resistente e mais lento, terá

maiores chances de sobreviver até o período da ovulação, resultando em prole do sexo feminino (MARTINEZ et al., 2004).

Shettles (1961) estudando diferenças morfológicas de espermatozóides humanos, constatou que as cabeças dos espermatozóides com o suposto cromossomo sexual Y eram menores e ovais, enquanto que nos portadores do X eram maiores e arredondadas. Homens cujos ejaculados possuíam predomínio da primeira ou da segunda forma, tiveram mais filhas do que filhos e vice-versa, respectivamente. Nos animais, porém, não existem diferenças morfológicas detectáveis microscopicamente.

Hossain et al. (2001), separando os espermatozóides humano quanto ao seu cromossomo X e Y através da técnica Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) e os avaliando em microscopia eletrônica, não encontraram diferenças morfológicas entre ambos.

Segundo Almeida e Alvarez (2003) existem diversas técnicas que tentam separar os espermatozóides quanto ao seu cromossomo (imunológicas, eletroforéticas, de motilidade em meios viscosos, centrifugação em gradientes de densidades, citometria de fluxo, entre outras).

2.2 Centrifugação em Gradiente de Densidade

A centrifugação ou sedimentação dos espermatozóides permite a separação das células contendo cromossomo X ou Y, porque existe uma diferença de massa relacionada com a quantidade de DNA e proteína nuclear, sendo maior nos portadores do cromossomo X. Duas substâncias são conhecidas como gradientes de alta densidade na separação dos espermatozóides: Percoll e OptiPrep (RESENDE et al., 2010).

A centrifugação em gradiente de densidade é capaz de separar os espermatozóides X dos Y a um custo bem menor e sem prejuízo a viabilidade espermática, apesar de uma acuidade menor (ao redor de 70%) à obtida na citometria de fluxo (HOSSEPIAN DE LIMA, 2005).

Blottner et al. (1993) utilizaram, em bovinos, como gradiente solução de Percoll em concentrações variadas. Esta tecnologia possibilitou o fracionamento dos espermatozóides, onde em sua maioria, os mais densos (X) ocuparam a parte inferior e os menos densos (Y) ocuparam a porção superior da fração. As frações foram posteriormente utilizadas para fertilização *in vitro* (FIV) e a sexagem dos embriões por PCR revelou 75% machos da fração superior e 92% de fêmeas da porção inferior.

Em estudo realizado por Carvalho et al. (2009), os pesquisadores avaliaram se o sêmen bovino criopreservado de um mesmo ejaculado e submetido a sexagem pelo método de

citometria de fluxo apresentaria motilidade diferente antes e após passagem por gradiente de Percoll. Os autores concluíram que o sêmen não sexado apresentou motilidade superior antes e após passagem pelo gradiente de Percoll, enquanto os espermatozóides X e Y não apresentaram diferença quanto a motilidade e movimento progressivo.

2.3 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é o método físico de separação de espermatozóides que tem hoje o maior reconhecimento. A citometria de fluxo explora o maior conteúdo de DNA do espermatozóide X em comparação ao espermatozóide Y. Esta diferença física é pequena e varia entre espécies, sendo em bovinos de apenas 3,7 a 4,2%, dependendo das raças (GARNER et al., 1983).

A citometria de fluxo permite a sexagem do sêmen por separação dos espermatozóides contendo cromossomo X dos Y com base no DNA. As células são coradas com Hoechst 33342 e, de acordo com a intensidade da fluorescência, são separadas (DELL'AQUA et al, 2011). O corante se liga 4% a mais ao DNA dos espermatozóides X do que aos de Y e através de um feixe de laser ligado a um computador é possível diferenciar os espermatozóides conforme seu grau de fluorescência (SEIDEL JR, 2007).

A classificação das células funciona da seguinte forma: quando o fluido passa pelo citometro ele é quebrado por um cristal vibratório em pequenas gotículas, formando de 70 000 a 80 000 gotas por segundo, cada gota pode possuir um espermatozóide, mais de um e outras ficam vazias. A gotícula que possuir espermatozóide com cromossomo X, conforme analisada pelo computador, recebe uma carga elétrica positiva, se possuir um espermatozóide Y uma carga elétrica negativa e se estiver vazia ou com mais de um espermatozóide não recebe carga nenhuma (SEIDEL JR, 2007).

A medida que as gotas passam pelo bico do citômetro a uma velocidade de 80km/h, passam por dois campos elétricos positivo de um lado e negativo no outro. Como cargas elétricas opostas se atraem, gotículas com uma carga positiva (contendo espermatozóide X) movem-se para a parte negativa do campo, aquelas com carga negativa (espermatozóide Y) movem-se em direção ao campo positivo, e aquelas sem carga, continuam direto para baixo. Portanto, são produzidos três fluxos de gotículas que podem ser coletados em três tubos de ensaio, separando assim o espermatozóide X do espermatozóide Y (SEIDEL JR, 2007).

A citometria de fluxo utiliza principalmente sêmen fresco, uma vez que o sêmen descongelado é mais frágil às agressões do processo de sexagem (DELL'AQUA et al, 2011).

Embora com bons resultados na separação espermática, a citometria de fluxo apresenta pontos negativos, em relação ao investimento com o equipamento (US\$ 250,000) e pela baixa produção/equipamento/hora, que não ultrapassa 12×10^6 espermatozoides em alta velocidade de separação (JOHNSON e WELCH, 1999) restringindo bastante sua utilização na indústria da inseminação artificial. Outros fatores limitantes são: a) o baixo número de espermatozoides sexados viáveis; b) a longa exposição ao corante sob alta temperatura (37°C); c) a necessidade de utilizar sêmen *in natura*, já que ocorre a diminuição da eficiência de sexagem de espermatozoides descongelados, devido ao fato do congelamento prejudicar a uniformidade da coloração dos núcleos, com o corante Hoechst 33342 (JOHNSON et al., 1994).

2.4 Ovulação

O tempo de viabilidade dos gametas e a duração do estro são fatores determinantes no estabelecimento do momento e da frequência de coberturas a serem realizadas. Além disso, na espécie equina o momento da ovulação está relacionado ao término do estro e não ao seu início, como na maioria das espécies domésticas (GINTHER, 1992).

Espermatozoides estão presentes no oviduto de éguas duas horas após a inseminação ou monta natural (WATSON e NIKOLAKOPOULOS, 1996) e ainda, mesmo que raramente, podem fecundar o ócito até seis dias após a cobertura (THOMAS et al., 1994).

Alguns pesquisadores relatam que a viabilidade do espermatozoide após a cobertura é de 48 a 72 horas, enquanto o ócito permanece viável por 6 a 18 horas após a ovulação. Preconiza-se a realização da cobertura, ou inseminação, em intervalos de 48 horas até a detecção da ovulação ou interrupção do estro. Com a utilização desse manejo, têm sido relatadas taxas de prenhez por ciclo de 58,2% a 71,4% (FERRAZ e VICENTE, 2006).

Durante o processo ovulatório, ocorrem três alterações: a) maturação citoplasmática e nuclear, b) ruptura da coesão entre as células do *cumulus oophorus* e as células da granulosa e c) adelgaçamento e ruptura da parede folicular externa (HAFEZ, 2000).

Em muitas espécies, a ovulação ocorre após um pico de LH, na égua a ovulação ocorre após uma constante e lenta elevação na concentração plasmática de LH (GINTHER, 1992), ovulação é resultado de alterações citológicas e bioquímicas na parede do folículo.

Para que a ovulação seja bem sucedida, o fluido folicular contendo o ócito tem que passar através do epitélio folicular, da lâmina basal, teca interna, teca externa, estroma ovariano, túnica albugínea e epitélio germinativo. Geralmente próximo ao momento que o folículo é estimulado pelo LH, este cresce o suficiente para fazer uma protuberância na

superfície do ovário, tanto que o estroma oferece pouca ou nenhuma resistência à ovulação (MCKINNON e VOSS, 1993).

Após sofrer estímulo do LH, o folículo se rompe e o oócito é expelido através da fossa de ovulação. O oócito é, então, capturado pelas fímbrias, liberado no infundíbulo e migra até a ampola do oviduto onde irá ocorrer a fertilização. Após a ruptura do folículo, ocorre uma hemorragia na parede folicular rompida que vai dar origem à formação do corpo hemorrágico. As células da granulosa e da teca se transformam estrutural e funcionalmente se luteinizando e na sequência vão formar o corpo lúteo (HAFEZ e HAFEZ, 2000).

A maturação oocitária, fundamental para o oócito adquirir capacidade de ser fecundado, ocorre em duas fases. A primeira é conhecida como fase de crescimento e confere ao oócito a capacidade de reiniciar a meiose, regulando a síntese de proteínas e a formação de organelas, que o diferencia em um gameta funcional. A segunda fase, caracterizada pelo reinício da meiose, é normalmente denominada de maturação final do oócito e ocorre após a puberdade, em folículos pré-ovulatórios (FERNANDES, 2004).

A maioria das éguas ovula com folículo medindo 40 a 45mm, como no caso das raças PSC e crioula, no período correspondente a 24 a 48 horas antes do final do estro, que tem duração de 7 dias em média na égua. Entretanto, apesar destes parâmetros estarem bem estabelecidos para a maioria das éguas, tanto o diâmetro folicular pré-ovulatório, bem como a duração do ciclo estral são amplamente variáveis. Algumas éguas podem ovular com um folículo de 35mm de diâmetro e com a consistência firme, considerando que outras não ovularão até que o folículo atinja 50mm (SAMPER, 1997).

2.5 Indutores da Ovulação

Em éguas que estão ciclando normalmente a finalidade de se induzir a ovulação é melhorar o manejo reprodutivo e sincronizar a ovulação de modo que esta ocorra o mais próximo possível da cobertura. Quando a monta natural ou sêmen fresco são utilizados, o intervalo entre a inseminação e a ovulação pode variar entre 0 a 48 horas (PALMER, 1993).

A melhor maneira para selecionar o momento de induzir a ovulação consiste na utilização de agentes indutores quando um folículo de 35mm e edema uterino são diagnosticados na égua, momento em que o folículo se encontra responsivo ao LH (PALMER, 1993).

Desta forma, após a indução da ovulação, a maioria das éguas irá ovular no período correspondente a 36 e 48 horas, demonstrando uma variação individual acentuada, a qual pode estar relacionada ao diâmetro ovulatório de cada animal (SAMPER, 1997).

A ultra-sonografia é uma ferramenta bastante eficiente no controle da ovulação, pois proporciona a mensuração do diâmetro folicular, como também a classificação do grau de edema endometrial (variando de 0 a 5, onde 0 é a ausência de edema e 5 o edema máximo) (SAMPER, 1997).

Nos dias de hoje, protocolos hormonais na reprodução equina utilizam agentes como indutores da ovulação a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), os agonistas do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), geralmente a Deslorelina e o Hormônio Luteinizante Recombinante equino (reLH) (SQUIRES, 2008). Estes agentes possuem máxima eficiência quando são administrados a éguas com edema endometrial, cérvix relaxada e na presença de um folículo com diâmetro superior a 35mm (SAMPER, 2002).

O hCG é um hormônio glicoprotéico, produzido pelas vilosidades coriônicas da placenta durante a gestação da mulher. Apresenta seu pico quando a gestação chega à nona semana e começa a decair progressivamente até desaparecer por completo um mês após parto (NEWCOMBE e WILSON, 2007).

Nas espécies domésticas, o hCG tem função de LH, provocando ovulação e desenvolvimento do corpo lúteo (GINTHER, 1992).

O hCG se encontra comercialmente em uma fração liofilizada em frascos de 500 a 5000 unidades internacionais (UI), com um solvente. As vias endovenosa, intramuscular e subcutânea são eficazes (NEWCOMBE E WILSON, 2007).

Não existe uma dose padrão, variando entre 750 UI a 5000 UI ou mais, sendo que a maioria das doses utilizadas é entre 2000 a 3000 UI, geralmente de 1 a 2 ml em dose única (FLEURY et al, 2007).

Depois da aplicação do hCG, a sua meia vida se divide em duas fases, a primeira ocorre entre 5-9 horas e a segunda se inicia entre 24-33 horas. Esta diferença na meia vida se deve a presença do ácido siálico na molécula, diminuindo a capacidade de metabolização pelo fígado, aumentando o período de permanência no plasma (HERSHMAN, 2004).

Alguns autores acreditam que o uso contínuo de hCG pode estar associado a uma diminuição na eficiência em induzir a ovulação, pois sendo uma proteína heteróloga, sua administração resultaria na produção de anticorpos, diminuindo sua eficácia, fato que também pode ocorrer com o aumento da idade da égua (McCUE et al., 2004).

O GnRH é um decapeptídeo, sintetizado e armazenado no hipotálamo basal médio. Ele estabelece a ligação entre o sistema humoral e os sistemas endócrino e nervoso, de modo que, em resposta à estimulação nervosa, pulsos de GnRH são liberados no sistema porta-hipotálamo-hipofisário induzindo a hipófise anterior a liberar LH e FSH (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A deslorelina é um análogo do GnRH produzido pela substituição da glicinana posição 6 pelo triptofano, retirando a glicina da posição 10 e adicionando uma amida na prolina da posição 9 (6-D-triptofano-9-(N-etil-L-prolinamida)-10-Desglicinamida LH-RH). Este hormônio tem se demonstrado eficiente em aumentar as concentrações de LH e induzir a ovulação em éguas cíclicas (MUMFORD et al., 1995).

O desenvolvimento de agonistas e análogos de GnRH aumentou a meia vida deste hormônio através de modificações estruturais no GnRH natural, o que permitiu o aumento nos níveis de LH por 12 a 24 horas após a administração dos mesmos (BERGFELT, 2000).

A dose recomendada de acetato de deslorelina é de 1 a 2 mg em veículo de liberação lenta, provocando ovulação até 48 horas em 90% das éguas (FLEURY et al., 2003)

2.6 Fecundação

Os espermatozoides depositados no trato genital da égua devem atravessar o útero e através da junção útero-tubárica, chegar ao oviduto, interagir com o epitélio deste e fertilizar o oócito (BERGER, 1996).

O encontro entre espermatozoide e oócito ocorre na ampola do oviduto e contrações peristálticas da ampola aumentam a chance de contato entre os gametas masculino e feminino (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Na égua, o estro tem uma duração de cinco a sete dias e a fecundação pode ocorrer até cinco dias após a monta ou inseminação, portanto pode ser necessário um armazenamento prolongado de espermatozoides viáveis no trato reprodutivo da fêmea (THOMAS et al., 1994).

O ejaculado é depositado no útero da égua durante a cópula. Em função disso, a junção útero-tubárica é a principal barreira que os espermatozoides devem transpor para atingirem a ampola, o local da fecundação (TROEDSSON et al., 1998).

Após a chegada ao oviduto, os espermatozoides se aderem às células do epitélio tubárico formando o reservatório espermático. Nos mamíferos, o reservatório se forma no istmo do oviduto algumas horas após a monta ou inseminação artificial (BADER, 1982).

Nas espécies onde o sêmen é depositado dentro do útero durante a cobertura, os espermatozoides se encontram totalmente ou a maior parte deles capacitados nas partes iniciais do istmo, onde os espermatozoides “fertilizadores” estão armazenados (FLESCH e GADELLA, 2000).

Fiala et al. (2007) concluíram que com duas horas após a inseminação artificial havia espermatozoides suficientes para permitir a fecundação na junção útero-tubárica, em mais de 54% das éguas, fato observado para 67% e 74% delas as 4 e 24 horas, respectivamente.

A passagem dos espermatozoides pelo útero deve ser rápida, pois o útero se torna um ambiente hostil após a cobertura para os espermatozoides, que devem alcançar o oviduto em até 4 horas, a fim de sobreviver e fertilizar o oócito (TROEDSSON et al., 1998).

O transporte e a sobrevivência dos espermatozoides variam de acordo com a fertilidade da égua e do garanhão (TROEDSSON et al., 1998).

2.7 Fatores que Influenciam o sexo dos Produtos:

Para muitos pesquisadores não há nenhuma evidência de uma capacidade de fertilização do espermatozoides relacionada ao cromossomo sexual que ele transporta. Com isto, a probabilidade de um oócito ser fertilizado por um espermatozoide com o cromossomo X ou Y é a mesma, portanto o resultado esperado no sexo da prole ocorre na proporção de 1:1 (KING et al., 1991). Porém, a cobertura ou inseminação em um determinado período do ciclo estral da fêmea demonstrou ter influência na proporção entre os sexos no nascimento de roedores, primatas e ruminantes (HAMMON, 1934; HORNING e McCLINTOCK, 1996; PAUL e KUESTER, 1987; WEHNER et al., 1997).

Em algumas espécies, como, por exemplo, os bovinos, há um grande interesse econômico em se determinar o sexo da prole. Na pecuária leiteira, o interesse maior seria por fêmeas (AURICH e SCHNEIDER, 2014); já na pecuária de corte, por machos (HOHENBOKEN, 1999).

Uma pesquisa de mercado realizada na Holanda por Graff em 2010 com criadores de cavalos da raça Friesian, apontou que 65,3% dos proprietários teriam interesse em escolher o sexo do potro (GRAFF, 2010 apud SAMPER et al., 2012).

De acordo com pesquisadores (Martinez et al., 2004; Gutierrez et al., 1998; Cameron et al., 2007; Giraldo et al., 2010; Hylan et al., 2009; Santos et al., 2015) outros fatores, como: momento da ovulação, condição corporal e idade dos progenitores também são capazes de interferir na proporção macho:fêmea.

2.7.1 Momento da Ovulação

Um estudo realizado por Martinez et al. (2004) com bovinos, onde 716 vacas foram inseminadas em intervalos de 8-18h, 18-36h e mais de 30h a partir da detecção visual do estro, mostrou diferença na proporção macho:fêmea da prole. Nas vacas que foram inseminadas no intervalo de 8-18h após a detecção do estro o percentual de fêmeas nascidas foi de 73,05% e nas vacas inseminadas com 30h ou mais o percentual de machos nascidos foi de 72,06%.

Em outro estudo realizado por Gutiérrez et al. (1998), 380 ovelhas foram inseminadas gerando 537 cordeiros. As ovelhas foram inseminadas 5h antes da ovulação e 5h após a ovulação, o primeiro grupo gerou mais fêmeas e o segundo mais machos.

Estudos em humanos apresentam resultados divergentes. Para Shettles e Rorvik (1984), casais que desejam filhos homens devem ter relações sexuais próximo à ovulação. Desta forma, a chance de gerarem um menino é de 85%. Estes autores acreditam que o espermatozóide Y é mais rápido, atravessando, assim, o muco cervical e alcançando o oócito primeiro. Já para Zarutskie et al. (1989), quando o coito ocorre perto da ovulação, mais meninas são geradas. Estes autores tinham interesse de confirmar os resultados obtidos por Shettles e Rorvik (1984) e encontraram dados contrários, mas não conseguiram explicar o porquê deste acontecimento.

Em um estudo realizado por Allen et al. (1995), num total de 625 ciclos menstruais, amostras de urina de 221 mulheres foram avaliadas diariamente para a mensuração de progesterona e estrógeno para detecção da ovulação, a frequência de relações sexuais realizadas era comunicada, não houve diferença em relação ao sexo dos bebês e o momento da ovulação.

Por outro lado, na natureza, em um estudo feito com cervídeos da cauda branca por Verme e Ozoga (1981) foi detectado que as fêmeas que foram cobertas durante as primeiras 36h do aparecimento do estro produziram um número maior de fêmeas (72,9%) e as cobertas com mais de 36h produziram mais machos (69,7%). A explicação seria que quanto mais cedo ocorresse o acasalamento um número maior de machos ocupava o território e por uma questão de preservação da espécie mais fêmeas são geradas.

Uma observação de Samper et al. (2012) demonstra que não existem estudos controlados demonstrando se o momento da ovulação teria influência no sexo da prole de equinos.

2.7.2 Condição Corporal da Progenitora

Em uma pesquisa realizada por Cameron et al. (2007), 400 cavalos selvagens que habitavam o norte da Nova Zelândia foram monitorados por cerca de 5 anos. Os animais eram catalogados e tinham seus dados registrados, principalmente o estado corporal das éguas no momento da concepção. O resultado encontrado foi que 80% das éguas que ganharam condição corporal geraram um macho enquanto 3% das éguas que perderam condição geraram um macho, o que segundo os autores seria consequência do aumento da glicose circulante.

Em estudo realizado por Machado et al. (2001) em ratos, as fêmeas foram induzidas a diabetes através da aplicação intravenosa da substância *aloxana* (100mg/kg) que tem uma ação tóxica nas células beta do pâncreas, após a aplicação desta droga o nível de glicose circulante foi avaliado e se mostrou elevado nas cobaias, sendo que houve um incremento significativo na geração de ninhadas do sexo masculino.

2.7.3 Assincronia do Desenvolvimento

Para uma gestação saudável é importante que o crescimento embrionário e as condições uterinas estejam se desenvolvendo de forma sincronizada, para que o útero tenha condições de receber e nutrir o embrião no momento da implantação.

Estudos em bovinos (GRISART et al. 1995) e em suínos (CASSAR et al. 1994) demonstram que há uma diferença na velocidade de crescimento dos embriões masculinos quando comparados aos femininos, geralmente na fase de blastocisto. Essa diferença pode levar a insucessos na fase de implantação ocorrendo morte embrionária precoce.

Segundo Krackow (1997), diversos fatores ambientais, psicológicos e fisiológicos podem influenciar no sexo da prole. O mecanismo utilizado seria a capacidade de a fêmea sincronizar o desenvolvimento uterino com o desenvolvimento embrionário, favorecendo ou não o embrião na fase de implantação.

2.7.4 Ovários

Em um experimento onde ovários esquerdos e direitos provenientes de diversas raças de vacas abatidas em frigorífico foram aspirados e tiveram seus oócitos maturados, fertilizados, cultivados *in vitro* e posteriormente o sexo do embrião foi determinado por PCR,

de um total de 447 embriões, 239 foram produzidos a partir de oócitos do ovário esquerdo, enquanto 208 foram produzidos a partir de oócitos do ovário direito. Mais fêmeas foram geradas a partir de oócitos produzidos pelo ovário esquerdo 55,2% para 44,8% de machos gerados, mesmo assim, os resultados não apresentaram diferença significativa (HYLAN et al., 2009).

2.7.5 Corno Gestante

O útero da égua é formado por um corpo, que tem início no colo, e apresenta dois cornos relativamente curtos, que terminam nos ovidutos. O útero é onde a maior parte do desenvolvimento embrionário ocorre e é o local onde os espermatozoides são depositados durante a cobertura (SENDEL, 2010).

Embora não seja determinante para a determinação do sexo, o corno uterino pode estar relacionado ao nascimento de produtos de determinado sexo.

Em um estudo realizado por Giraldo et al. (2010) em bovinos, utilizando 113 novilhas de raças puras, inseminadas e com o diagnóstico de gestação realizado entre 95 e 100 dias após a inseminação foi constatado que 60 novilhas (53,1%) gestaram seu embrião no corno direito e destes, 38 (63,3%) eram machos, em um segundo experimento, 64 vacas mestiças e abatidas tiveram seus úteros dissecados no frigorífico, onde o sexo dos fetos foi catalogado. Destes, 35 (54,7%) foram gestados no corno direito e 23 (65,7%) eram machos, mostrando diferença no sexo dos bezerros de acordo com o corno uterino gestante.

Hylan et al. (2009) acompanharam por cinco estações reprodutivas, 2904 vacas de diversas raças. Com 45 dias, através do diagnóstico de gestação por palpação retal, o corno gestante foi anotado e conforme os bezerros iam nascendo estes dados também eram armazenados. Das 2094 gestações, 1544 (53,2%) ocorreram no corno direito, destas 1040 (67,4%) geraram um bezerro macho.

Ambos os pesquisadores não conseguiram achar uma explicação fisiológica para tal acontecimento, mas acreditam que devido ao fato de os embriões bovinos terem uma baixa migração transuterina, os ovários teriam forte influência para estes resultados, o que poderia ocorrer de forma diferente na égua, onde a mobilidade do embrião no útero é intensa até que ocorra a fixação.

Já o trabalho de Borges (2016), onde 1028 vacas estavam prenhes quando abatidas em um frigorífico, revelou que 39,5% delas, o concepto se encontrava no corno uterino esquerdo, e nos demais 60,5% no corno direito. Em todos os casos (100%) havia a presença de um

único corpo lúteo no ovário ipsilateral ao corno uterino gestante, mostrando a inexistência, ou mesmo a raridade da migração transuterina do concepto. Quanto ao sexo dos conceptos em relação ao corno gestante, o autor não encontrou diferença.

2.7.6 Idade dos Progenitores

O estresse materno gerado por acontecimentos do dia a dia, idade ou doenças no momento da concepção estão associados com uma maior porcentagem de mortalidade embrionária precoce de embriões masculinos, sugerindo que o embrião masculino seria mais vulnerável que o feminino em humanos (KRAEMER, 2010).

Os nascimentos (815.891) ocorridos na Dinamarca entre 1980-1993 foram analisados por Jacobsen et al. (1999), que não encontraram diferenças na proporção menino:menina em razão da idade das mães e pais, o mesmo sendo observado em um estudo retrospectivo realizado por Rueness et al. (2011), onde todas as gestações de mulheres ocorridas na Noruega entre 1967-2006 (2 337 775) foram avaliadas na tentativa de responder se a idade da mãe influenciava no sexo de seus filhos, os autores concluíram que não houve diferença na proporção menino:menina (51,4%:48,6% respectivamente) entre as faixas etárias das mães, porém houve diferença quando mulheres acima dos 45 anos apresentavam pré-eclampsia.

Foote (1977), estudando cinco diferentes raças de gado leiteiro onde 35.102 nascimentos foram catalogados em diferentes estações reprodutivas, concluiu que não houve diferença significativa na proporção macho:fêmea em relação a idade das vacas.

Em um estudo com cavalos da raça Mangalarga Marchador pertencentes a Polícia Militar de Minas Gerais, a influência da idade dos progenitores na proporção macho:fêmea foi avaliada em 253 nascimentos. Das 60 éguas com mais de 15 anos, 42 produziram potrancas. Já entre os garanhões o fator idade não teve interferência na proporção macho:fêmea (SANTOS et al., 2015).

3. Artigo

FATORES RELACIONADOS A DETERMINAÇÃO DO SEXO DE POTROS DA RAÇA PSC

Jonas Gomes Flores¹, Sandra Fiala Rechsteiner^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Animal: equinos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS – Brasil

²HISTOREP – Departamento de Morfologia – Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas – Pelotas, RS - Brasil

RESUMO

As biotécnicas da reprodução na espécie equina avançaram na última década e os criadores de equinos começaram a questionar as possibilidades de interferência na determinação do sexo dos potros. A determinação do sexo é importante, pois o sexo do potro possui grande influência no valor comercial do mesmo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do momento da cobertura em relação ao momento da ovulação no sexo dos potros e outros fatores como: idade da égua e garanhão; indutor da ovulação; ovário em que ocorreu a ovulação e o diâmetro do folículo pré-ovulatório também foram avaliados. O estudo foi realizado em Haras na região de Bagé e Aceguá (RS) – Brasil (31°24'06.1"S 54°07'47.5"W) e (31°30'16.0"S 54°07'45.5"W) nas estações de monta de 2011 a 2015. Utilizou-se 259 ciclos reprodutivos de 160 éguas e 22 garanhões da raça Puro Sangue de Corrida. Informações como agente indutor de ovulação utilizado (Deslorelina; n = 187 ou hCG; n = 72); data da cobertura (n = 259); momento da ovulação em relação a cobertura (+ 24 horas; n = 69 e - 24 horas; n = 190); idade da égua (G1: até 8 anos; n = 123, G2: 9 até 14 anos n = 110 e G3: >14 anos; n = 26); idade do garanhão (Até 14 anos; n = 11 e >15 anos; n = 11) ; ovário em que a ovulação ocorreu (Direito; n = 122 e Esquerdo; n = 137); foram registrados e avaliados. No total de

potros nascidos, 136 foram machos (52,51%) e 123 foram fêmeas (47,49%). O tempo decorrido após a cobertura não influenciou o sexo dos produtos, nas éguas que ovularam com - 24h após a indução da ovulação: 104 potros (54,74%) eram machos e 86 (45,26%) eram fêmeas, enquanto que nas éguas que ovularam com + 24h, 32 potros (46,38%) eram machos e 37 (53,62%) eram fêmeas. A porcentagem de fêmeas nascidas em relação a idade da égua foi de 46,34% (n=57), 47,27% (n=52) e 46,15% (n=12) nos grupos G1, G2 e G3 respectivamente. Garanhões com idade até 15 anos tiveram 44,14% (n=49) de fêmeas e com mais de 15 anos 49,66% (n=73) eram fêmeas. Não houve diferença no sexo dos produtos quanto ao agente indutor da ovulação (Deslorelina x hCG) e ovário em que ocorreu a ovulação. O presente estudo concluiu que nenhum dos fatores estudados alterou a proporção macho:fêmea dos potros nascidos.

Palavras-chave: Macho:Fêmea; Ovulação; Espermatozóide; Égua; Garanhão.

ABSTRACT**TIME OF BREEDING AND OTHER FACTORS RELATED TO THE SEX OF FOALS
IN THOROUGHBRED HORSES**

Author: Jonas Gomes Flores

Advisor: Sandra Fiala Rechsteiner

The biotechnologies of reproduction in equine species have been improved in the last decade and the horse breeders started to inquire about the possibility of intervention regarding to the sex determination in foals. Sex determination is important because the sex of the foal has a great influence on the commercial value of the foal. The aim of the present study is was to evaluate the influence of the time of the breeding in relation to time of ovulation in the sex of the foals, besides analyzing other factors such as: the age of the mare and the stallion; ovulation inductor, ovary and the diameter of the preovulatory follicle. The study was accomplished in studs located Bagé/RS and Aceguá/RS – Brazil ($31^{\circ}24'06.1''S$ $54^{\circ}07'47.5''W$) and ($31^{\circ}30'16.0''S$ $54^{\circ}07'45.5''W$) during the breeding seasons from 2011 to 2015, using 259 reproductive cycles of 160 mares and 22 stallions of Thoroughbred breed. Information like the induction of ovulation agent that was used (Deslorelin; $n = 187$ or hCG; $n = 72$); date of breeding ($n = 259$); time of ovulation in relation to the breeding (+24 hours; $n = 69$ and -24 hours; $n = 190$); age of the mare (G1: up to the age of 8; $n = 123$ G2: from the age of 9 to the age of 14; $n = 110$ and G3: >14 years old; $n = 26$); age of the stallion (up to the age of 14; $n = 11$ and >15 years old; $n = 11$); ovary in which the ovulation occurred (Right; $n = 122$ and Left; $n = 137$) were catalogued and evaluated. As result, 136 (52,51%) were born colts and 123 (47,49%) were born fillies. The elapsed time from breeding to ovulation did not influence on the sex of the product, on mares that ovulated in less than 24 hours after the ovulation induction: 104 foals (54,74%) were male and 86 (45,26%) were female, whereas in the mares that ovulated in more than 24 hours, 32 foals (46,38%) were male and 37 (53,62%) were female. The percentage of born females regarding to the age of the mare was 46,34% ($n = 57$), 47,27% ($n = 52$) and 46,15% ($n = 12$) in the groups G1, G2 and G3, respectively. From

stallions up to the age of 15 years, 44,14% (n = 49) were females and from those which were older than 15 years old, 49,66% (n = 73) were females. There was no difference regarding the sex of the product in relation to the ovulation inducer agent (Deslorelin x hCG) and ovary in which the ovulation occurred. None of the factors studied modified the male:female proportion of the born foals.

Keywords: Male:Female; Ovulation; Sperm cells; Mare; Stallion.

INTRODUÇÃO

Há muito tempo o homem vem tentando manipular o sexo da prole em diferentes espécies, inclusive na espécie humana. Algumas técnicas e intervenções em determinados momentos no processo reprodutivo tem se mostrado eficientes para alterar a proporção 1:1 de macho e fêmeas.

Sabe-se que a metade dos espermatozoides contém o cromossomo Y, que gera machos; a outra metade, o X, que origina as fêmeas. O sexo do descendente é determinado pelo tipo de espermatozoide que fertiliza o óvulo, logo, é o gameta paterno que determina o sexo da prole (PARISOTTO et al., 2003).

O espermatozóide que carrega o cromossomo Y tem cabeça menor, é mais rápido e menos resistente em comparação àquele que carrega o X. Dessa maneira, se a cobertura ocorrer perto do período da ovulação, há mais chances do espermatozóide Y encontrar o óvulo e, conseqüentemente, a prole nascer com o sexo masculino. Já se a cobertura ocorrer muito tempo antes da ovulação, o espermatozóide X, mais resistente e mais lento, terá maiores chances de sobreviver até o período da ovulação, resultando em prole do sexo feminino (MARTINEZ et al., 2004).

Existem dois caminhos a serem percorridos para se selecionar o sexo nos mamíferos, técnicas capazes de separar os espermatozoides que contém o cromossomo Y daqueles que contém o cromossomo X (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003) ou a identificação do sexo de embriões através da técnica de PCR (MOREIRA FILHO et al., 2000).

No Puro Sangue de Corrida, que é objeto deste estudo, as biotecnologias reprodutivas, tais como a inseminação artificial e a transferência de embriões, são proibidas pela associação que controla a raça (BLOODSTOCK e THE GENERAL STUD BOOK).

O sexo do potro possui grande influência no valor comercial do animal, eis que certas linhagens de cavalos apresentam melhores resultados (morfológicos, performáticos etc.), a depender dos descendentes serem machos ou fêmeas.

Segundo CHEZUM e WIMMER (1997), na raça Puro Sangue de Corrida, potros machos apresentaram melhores preços em leilões realizados nos Estados Unidos.

Para criadores de cavalos, o interesse em gerar um potro com o sexo pré-determinado é subjetivo, algumas das possíveis razões: substituir uma égua; gerar um garanhão em potencial de certa linhagem nobre; alguns garanhões aparentemente produzem melhores

potros do que potras ou vice-versa; ou, ainda, por interesses econômicos (SAMPER et al., 2012).

Ainda hoje, é muito comum proprietários de cavalos e Médicos Veterinários discutirem se o momento da cobertura e o momento da ovulação da égua teriam influência no sexo do potro. Muitos acreditam na hipótese que coberturas realizadas próximo à ovulação geram potros machos, considerando que o espermatozóide Y é mais rápido e chegaria primeiro em condições de fertilizar o oócito.

Estudos que verificam essa influência são escassos, baseado neste fato este estudo objetivou verificar se o momento da cobertura em relação ao momento da ovulação pode alterar a proporção macho:fêmea e a influência de alguns outros fatores nesta proporção.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram avaliados 259 ciclos de 160 éguas cobertas por 22 garanhões da raça Puro Sangue de Corrida, alocados em diferentes Haras na região de Bagé/RS e Aceguá/RS – Brasil (31°24'06.1"S 54°07'47.5"W) e (31°30'16.0"S 54°07'45.5"W) nas estações reprodutivas de 2011 a 2015. As éguas pesavam entre 450 kg a 600 kg, com média de 525 kg e os garanhões pesavam entre 500 kg a 650 kg, com média de 575 kg. As éguas foram cobertas por garanhões escolhidos pelos proprietários.

As éguas foram divididas em três grupos de acordo com a idade: até 8 anos, consideradas novas, (n=123), 9 a 14 anos (n=110) e mais de 14 anos, consideradas velhas (n=26). Os garanhões dois grupos: até 14 anos (n=11) e 15 anos ou mais (n=11)

Manejo Geral

As éguas eram mantidas a campo em pequenos lotes de aproximadamente 15 animais, em áreas que variavam entre 10 e 15 ha e suplementadas com concentrado: recebendo cerca de 9kg de aveia por dia em duas porções e água *ad libitum*.

Os garanhões passavam o dia em pequenos piquetes individuais de aproximadamente 100 m² e a noite ficavam estabulados em cocheiras de 5x5m. A alimentação era baseada em 8kg de aveia e 1kg de ração peletizada por dia dividido em duas vezes; 6kg de volumoso por dia fracionado em duas vezes e água *ad libitum*.

Manejo Reprodutivo

O manejo reprodutivo dos animais era realizado pelos médicos veterinários responsáveis pela propriedade. O controle folicular era realizado através de palpação retal e exame ultrassonográfico com o equipamento da marca Aloka, modelo SSD-500 com transdutor linear 5,0 MHz. Os exames eram feitos a cada 24h ou 48h dependendo da condição que a égua se apresentava. As éguas que apresentavam um folículo a partir de 35 mm, edema uterino e receptividade ao garanhão foram induzidas a ovulação com Gonadotrofina Coriônica Humana(*Chorulon*®, Intervet), 2.500 UI via endovenosa (n= 72) ou Deslorelina(*Sincrorrelin*®, OuroFino) na dose de 3 ml/IM (n= 187), sendo que 69 éguas foram induzidas no momento da cobertura e 190 éguas foram induzidas 24h antes da cobertura.

Para a realização da cobertura as éguas tinham a cauda enfaixada, a vulva higienizada e eram contidas através de maneias e cachimbo.

As éguas foram examinadas a cada 24 horas a partir da cobertura para verificação da ovulação e só fizeram parte do estudo as que foram cobertas uma única vez por ciclo.

Coleta dos Dados

Durante os exames foram registradas as variáveis estudadas: ovário que apresentava o folículo pré-ovulatório, diâmetro do folículo pré-ovulatório, agente indutor da ovulação (hCG ou Deslorelina), idade da égua e do garanhão, o momento em que ocorreram as ovulações a partir do momento da cobertura, (em até 24h ou mais de 24h após a cobertura). O diagnóstico da gestação era realizado com 14 dias.

Análise Estatística

O programa estatístico utilizado para a análise dos dados foi o R, versão 3.4.1. Para a análise descritiva univariada dos dados, foram calculadas média, desvio-padrão e valores mínimos, medianos e máximos para as variáveis contínuas e as frequências de cada categoria para as variáveis categóricas.

Para a análise dos fatores de influência foram utilizados o teste de Qui-quadrado de Pearson, sendo que as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$, para

verificar a associação de cada fator com o sexo dos potros, a Regressão Logística, para o cálculo de Razão de Chances e testar a influência dos fatores no sexo dos potros.

A distribuição utilizada para o estudo das variáveis da pesquisa foi Binominal.

O modelo de regressão logística foi ajustado segundo a metodologia de Hosmer e Lemeshow (2013), utilizando o critério de manter no modelo apenas variáveis com p-valor maior que 0,25 e escolhendo o melhor modelo através do critério de Akaique (AIC).

Foram estudadas variáveis contínuas: idade da égua e idade do garanhão, apesar das variáveis idade da égua e idade do garanhão serem de natureza contínua, elas foram categorizadas para as análises, sendo divididas nas categorias até 8 anos, de 9 a 14 anos e mais de 14 anos de idade para éguas e até 15 anos de idade e mais de 15 anos de idade para garanhões e variáveis categóricas: ovário; indutor da ovulação; tempo de ovulação; e sexo dos potros.

Idade das Éguas

$$P(\text{sexo do potro} = \text{Masculino}) = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 X)}}$$

Onde, na equação, X é uma variável binária indicadora que assume valor 1, no caso em que a idade da égua é até 8 anos; de 9 a 14 anos ou maior que 14 anos e 0 caso contrário.

Idade dos garanhões

$$P(\text{sexo do potro} = \text{Masculino}) = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 X)}}$$

Onde, na equação, X é uma variável binária indicadora que assume valor 1, no caso em que a idade do garanhão é menor ou igual a 15 anos e 0 caso contrário.

Ovário

$$P(\text{sexo do potro} = \text{Masculino}) = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 X)}}$$

Onde, na equação, X é uma variável binária indicadora que assume valor 1, no caso em que o ovário foi o Direito e 0 caso contrário.

Indutor da ovulação

$$P(\text{sexo do potro} = \text{Masculino}) = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 X)}}$$

Onde, na equação, X é uma variável binária indicadora que assume valor 1, no caso em que o indutor utilizado foi Deslo e 0 caso contrário.

Tempo de ovulação

$$P(\text{sexo do potro} = \text{Masculino}) = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 X)}}$$

Onde, na equação, X é uma variável binária indicadora que assume valor 1, no caso em que o tempo de ovulação é menor ou igual a 24 horas e 0 caso contrário.

RESULTADOS

Análise Descritiva Univariada

Na tabela 1, observa-se que a idade média das éguas na data da cobertura foi de 9,2 anos, com idade mínima de 2 e máxima de 20 anos e nos garanhões 13,7 anos, 4 anos (mínimo) e 23 anos (máximo), respectivamente. O tamanho médio do folículo pré-ovulatório foi de 44,2mm, com mínimo de 35mm e máximo de 56mm.

Tabela 1- Valores médio, mínimo e máximo; desvio padrão das variáveis contínuas (idade das éguas, dos garanhões e diâmetro do folículo)

	n (ciclos)	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Idade - Égua	259	9,2	3,75	2	9	20
Idade - Garanhão	259	13,7	5,99	4	16	23
Diâmetro do Folículo	259	44,2	4,14	35	44	56

Na amostra coletada, em 123 dos nascimentos de potros, o equivalente à 47,4% do total, a idade da égua no momento da cobertura era menor que oito anos (Tabela 2).

Tabela 2 – Frequência de distribuição da idade das éguas utilizadas no experimento

Idade Éguas	Frequência (%)
Até 8 anos	123 (47,4%)
9-14 anos	110 (42,4%)
Mais de 14 anos	26 (10%)

Entre os garanhões, 148 dos potros nascidos eram de cavalos que apresentavam mais de quinze anos no momento da cobertura (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência de distribuição da idade dos garanhões utilizados no experimento

Idade Garanhões	Frequência (%)
Até 15 anos	111 (42,86%)
>15 anos	148 (57,14%)

Em 137 gestações, 52,9% das ovulações ocorreram no ovário esquerdo, enquanto 54,3% (n=82) das gestações ocorreram no corno direito. Em 72,2% (n=187) das gestações, o agente indutor utilizado foi a Deslorelina e em 27,8% (n=72) o hCG.

Dos potros nascidos, 52,51% (n=126) eram do sexo masculino, enquanto 47,49% (n=123) eram do sexo feminino.

Fatores de influência no Sexo dos Potros

Pelo teste Qui-Quadrado de Pearson, não houveram evidências amostrais da associação entre o tempo de ovulação em relação ao momento da cobertura com o sexo dos potros (p-valor = 0,2936), não houve associação entre a idade categorizada da égua no momento da cobertura e o sexo dos potros (p-valor = 0,7833), não houve associação entre a idade categorizada do garanhão no momento da cobertura e o sexo dos potros (p-valor= 0,4516). Não houve associação entre o tipo de indutor e o sexo dos potros (p = 0,2316), entre o ovário em que a ovulação ocorreu e o sexo dos potros (p = 0,913) como observado na Tabela 4.

Tabela 4 – Avaliação dos fatores de influência no sexo dos potros

	Fêmea	Macho
Tempo de ovulação - 24h	86 (45,26%)	104 (54,74%)
Tempo de ovulação + 24h	37 (53,62%)	32 (46,38%)
Até 8 anos (éguas)	57 (46,34%)	66 (53,66%)
9 até 14 anos (éguas)	52 (47,27%)	58 (52,73%)
Mais de 14 anos (éguas)	14 (53,85%)	12 (46,15%)
Até 15 anos (garanhões)	49 (44,14%)	62 (55,86%)
>15 anos (garanhões)	73 (49,66%)	74 (50,34%)
Deslorelina	84 (44,92%)	103 (54,08%)
hCG	39 (54,17%)	33 (45,83%)
Ovário direito	57 (46,72%)	65 (53,28%)
Ovário esquerdo	66 (48,18%)	71 (51,82%)

Regressão Logística Simples

Segundo o modelo de regressão logística simples, a chance das éguas com idade menor que 15 anos na época de cobertura é 41,59% maior de ter potros machos do que aquelas com idade superior a 15 anos. Observou-se um comportamento semelhante entre os garanhões, entretanto a chance estimada de ter potros machos foi 24,82% maior entre aqueles com idade inferior a 15 anos com relação aqueles com idade superior a este valor. Estima-se que éguas com tempo de ovulação menor que 24 horas tenham uma chance 39,83% maior de ter potros machos. Quando o indutor utilizado foi a Deslorelina, estimou-se uma chance 44,91% maior de ter potros machos do que quando o indutor foi o hCG. No ovário direito, a chance do potro ser macho é 6,00% maior do que no esquerdo. Nenhuma razão de chances apresentou significância estatística. A maior consequência disso é não poder estender estes resultados com precisão para toda população alvo, entretanto eles são válidos para a amostra (Os p-valores estão na tabela 5 juntamente com os Intervalos de Confiança das Razões de Chances).

Tabela 5 - Modelos de regressão logística simples

Variável	Razão de Chances	IC-5%	IC-95%	p-valor
Éguas – Até 15 anos	1,4159	0,5403	3,8266	0,4793
Garanhões – Até 15 anos	1,2482	0,7616	2,0519	0,3799
Tempo de Ovulação – Menos de 24h	1,3983	0,8053	2,4394	0,2345
Indutor – Deslo	1,4491	0,8406	2,5111	0,1828
Tempo de Gestação – Maior que 335d	2,1600	0,9727	5,0543	0,0641
Ovário – Direito	1,0600	0,6501	1,7298	0,8151

DISCUSSÃO

Diversos trabalhos em humanos, eqüinos, bovinos, ovinos concluíram que certos fatores como: momento da cobertura, condição corporal da progenitora, corno gestante e idade dos progenitores teriam influência no sexo do produto (Martinez et al., 2004; Gutierrez et al., 1998; Cameron et al., 2007; Giraldo et al., 2010; Hylan et al., 2009; Santos et al., 2015).

Pesquisadores (Martinez et al., 2004; Gutierrez et al., 1998; Shettles e Rorvik, 1984; Zarutskie et al., 1989) estudando a interferência do tempo de inseminação ou cobertura em relação ao momento da ovulação encontraram diferenças no percentual do sexo de terneiros, cordeiros e bebes nascidos respectivamente, os quais demonstram que quando a inseminação ou cobertura é realizada próximo do momento da ovulação um maior número de machos é gerado. Estes dados vão de encontro com a teoria de Wilcox et al. (1995) que propõe que espermatozoides portadores do cromossomo Y são menores e mais rápidos do que os portadores do cromossomo X, portando chagariam primeiro ao óvulo e o fertilizariam. Entretanto, Allen et al. (1995) avaliando 625 ciclos menstruais de mulheres, também chegou à conclusão que o momento da cobertura em relação a ovulação não tem a capacidade de interferir na proporção macho:fêmea da prole.

Embora estudos em outras espécies (bovinos, ovinos, cervídeos e humanos) demonstrem que o momento da ovulação em relação à cópula teria influência no sexo do produto gerado, nosso estudo não confirmou essa hipótese, em equinos, pois não houve diferença na proporção macho:fêmea em relação ao momento da cobertura x ovulação. Do total de 259 nascimentos, 52,51% foram machos e 47,49% foram fêmeas e nas éguas que ovularam com menos de 24 horas 54,74% para machos e 45,26% para fêmeas. Pelo menos com intervalo de no máximo 24h cobertura/ovulação monitorado, a proporção se manteve em

aproximadamente 1:1 para machos e fêmeas. Isso pode ser devido ao fato de que as éguas foram cobertas no momento da aplicação do indutor ou 24h após, o que foi decidido pelo veterinário residente dos haras em que os dados foram coletados. Se as éguas tivessem sido cobertas com um maior tempo entre cobertura e ovulação, o resultado poderia ter sido diferente.

Em um estudo realizado por Hylan et al., (2009) em bovinos, foi observado que o ovário em que ocorreu a ovulação (direito ou esquerdo) não teve influência na determinação do sexo da prole e esses resultados vão de encontro com os achados nesta pesquisa.

Pesquisas realizadas por Rueness et al. (2011), Jacobsen et al. (1999) em mulheres e Foote (1977) em vacas concluíram que a idade da progenitora não teve influência no sexo da prole, este resultado corrobora com os nossos achados onde se verificou que a idade das éguas não teve influência no sexo da prole. Santos et al (2015) encontraram diferença na proporção macho:fêmea conforme a idade de éguas da raça Mangalarga Marchador, onde éguas com mais de 15 anos geraram mais fêmeas, enquanto que a idade dos garanhões não teve influência e o mesmo achado corrobora com nossa pesquisa em relação a idade dos garanhões. A hipótese de que éguas mais velhas, com um ambiente uterino já mais debilitado em função da própria idade ou de vários partos, que ainda tem capacidade de desenvolver uma gestação, mas apresentam alterações, levaria a produção de embriões considerados mais resistentes não foi comprovada.

Provavelmente a proporção de espermatozoides, X ou Y, produzidos pelo progenitor e o ambiente uterino gerado pela a progenitora sejam os únicos fatores capazes de alterar a proporção macho:fêmea realizado em condições naturais.

CONCLUSÃO

A proximidade da cobertura em relação a ovulação (- ou + de 24 h) não influencia o sexo do potro, assim como os demais fatores abordados neste estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mercado do cavalo esta cada vez mais exigente, fazendo com que os proprietários de cavalos pressionem cada vez mais os médicos veterinários a atingirem melhores índices de prenhez. Para atingir maiores taxas de prenhes com a utilização de tecnologias, a inseminação ou cobertura é realizada o mais próximo possível da ovulação, assim sendo,

alguns criadores acreditam que um número maior de potros machos estão nascendo. Estes criadores acreditam na hipótese que coberturas realizadas próxima a ovulação geram mais machos. Apesar de nosso estudo apontar que este fator não alterou a proporção macho:fêmea, talvez estudos futuros que controlem ovulações com mais tempo após a cobertura, possam alterar esta proporção.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN J., WEINBERG, C., BAIRD, D. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation: Effects on the probability of conception, survival on the pregnancy and sex of the baby. **Journal of Medicine**, v.333, p. 1517-1521, 1995.

ALMEIDA, G.P.; ALVAREZ R.H. Métodos de separação de espermatozóides para escolha do sexo dos animais domésticos. **Boletim da Indústria Animal**, v.60, p.107-115, 2003.

BLOODSTOCK e THE GENERAL STUD BOOK, **Weatherbys services for thoroughbred horses**. Disponível em: <https://www.weatherbys.co.uk/horses-racing/bloodstock-studbook> acesso: 01/02/2018.

BORGES, G. Estudo sobre a migração transuterina e a razão sexual em conceptos de bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). 2016. 63 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2016.

CAMERON, E., WAYNE, L. Extreme sex ratio variation in relation to change in condition around conception. **Biology Letters**, South Africa, v. 3, p. 395–397, 2007.

CHEZUM, B., WIMMER, B. Roses or lemons: adverse selection in the market for Thoroughbred yearlings. **Review of Economics and Statistics**. v.79, 521–526, 1997.

FOOTE, R.H., Sex ratio in dairy cattle under various conditions. **Theriogenology**, v.8, p.349-356, 1977.

GIRALDO, A.M.; HYLAN, D.; BONDIOLI, K. R.; et al. Distribution of sexes within the left and right uterine horns of cattle. USA. **Theriogenology**, v.73: p. 496-500, 2010.

GUTIÉRREZ, A.; PÉREZ, C.; GRANADOS, J.; et al. Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturational state of oocyte. **Cambridge University Press**, Espanha, 1998.

HOSMER, David W.; LEMESHOW, Stanley. Applied Logistic Regression. **Wiley**, New York, 2013.

HYLAN, D.; GIRALDO, M.; CARTER, J. et al. Sex Ratio of Bovine Embryos and Calves Originating from the Left and Right Ovaries. **Biology of Reproduction** v.81, p. 933-938, 2009.

JACOBSEN, R., MOLLER, H., MOURITSEN, A., Natural variation in human sex ratio. **Oxford Journals**. v. 14, p. 3120-3125, 1999.

MARTINEZ, F.; KAABI, M.; ALVAREZ, M. et al. Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: a field study. **Theriogenology**, Espanha, 2004.

MOREIRA FILHO, C.A.; RAMALHO, M.D.T.; KIRNZENBAUM, M.; et al. Sex selection of Brazilian Zebu embryos by indirect immunofluorescence using high titer rat H-Y antisera. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 483, 2000.

PARISOTTO, L., GUARAGNA, K., VASCONCELOS, M.; Diferenças de gênero no desenvolvimento sexual. Porto Alegre, **Revista PSCquiátrica**, p. 75-87, 2003.

PESSOA, G. Separação Espermiática Pré Refrigeração do Sêmen Equino. 2016. 100 f. Tese de Doutorado - Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2016.

RUENESS, J., VATTEN, L., ESKILD, A., The human sex ratio: effects of maternal age. **Human Reproduction**, v. 27, N 1, p. 283-287, 2012.

SAMPER, J. C.; MORRIS, L., The Use of Sex-Sorted Stallion Semen in Embryo Transfer Programs. **Journal of Equine Veterinary Science**, New Zealand, p. 387-389, 2012.

SHETTLES LB, RORVIK DM. How to choose the sex of your baby. New York: **Doubleday**, 1984.

SANTOS, M., MAIA, L., NOBRE, D. Sex ratio of equine offspring is affected by the ages of the mare and stallion. **Theriogenology**, v. 84, p. 1238-1245, 2015.

WILCOX, A. J.; WEINBERG, C. R.; BAIRD, D. D. Timing of Sexual Intercourse in Relation to Ovulation. **Journal of Medicine**, England, v. 333, 1995.

ZARUTSKIE PW.; MULLER CH.; MAGONE M.; et al. The clinical relevance of sex selection techniques. **Fertility Sterility**; v. 52, p. 891-905, 1989.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN J., WEINBERG, C., BAIRD, D. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation: Effects on the probability of conception, survival on the pregnancy and sex of the baby. **Journal of Medicine**, v.333, p. 1517-1521, 1995.

ALMEIDA, G.P.; ALVAREZ R.H. Métodos de separação de espermatozóides para escolha do sexo dos animais domésticos. **Boletim da Indústria Animal**, v.60, p.107-115, 2003.

ALMEIDA, F.Q.D.; SILVA, V.P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, 2010.

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

BADER, H. A. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. **Journal Reproduction and Fertility**, v.32, p.59-64, 1982.

BARUSELLI, P.S.; REIS E. L.; MARQUES, M. O. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82/83, p.479-486, 2004.

BERGER, T. Fertilization in ungulates. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 351-360, 1996.

BERGEFELT, D.R. Estrous synchronization mare. In: Equine Breeding Management and Artificial Insemination. **Saunders**, Philadelphia. p.195-228, 2000.

BLOODSTOCK e THE GENERAL STUD BOOK, **Weatherbys services for thoroughbred horses**. Disponível em: <https://www.weatherbys.co.uk/horses-racing/bloodstock-studbook> acesso: 01/02/2018.

BLOTTNER, S., SCHWERIN, M., BOTTCHEER, M. Selective enrichment of bovine X- and Y- spermatozoa by Percoll density gradient. **Archives Animal Breeding**, v. 36, n. 2, p. 153-62, 1993.

BORGES, G. Estudo sobre a migração transuterina e a razão sexual em conceptos de bovinos da raça Nelore (*bos tauros indicos*). 2016. 63 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2016.

CBRA,. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA**, Belo Horizonte. 3ª ed, p. 49, 2013.

CAMERON, E., WAYNE, L. Extreme sex ratio variation in relation to change in condition around conception. **Biology Letters**, South Africa, v. 3, p. 395–397, 2007.

CARVALHO, J.; SARTORI, R.; LEMES, AP.; et al. Cinética de espermatozóides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1346-1351, 2009.

CASSAR, G.; KING, W.A.; KING, G.J., Influence of sex on early growth of pig conceptus. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 317-320, 1994.

CHEZUM, B., WIMMER, B. Roses or lemons: adverse selection in the market for Thoroughbred yearlings. **Review of Economics and Statistics**. V.79, p.521–526, 1997.

DELL'AQUA C., DELL'AQUA, J., CRESPILO, A. Variações metodológicas na criopreservação de sêmen sexado de bovinos. **Veterinária e Zootecnia**. v.18, n.1, p.147-155, 2011.

FERNANDES, C. B. Maturação in vitro de ovócitos eqüinos: comparação entre os meios TCM 199, SOFaa e HTF:BME, e avaliação da adição de FSH bovino, FSH eqüino e do hormônio de crescimento eqüino por meio da transferência de ovócitos. São Paulo, p.129, 2004.

FERRAZ, L. E. S., VICENTE, W. R. Influência do momento da cobrição, em relação à ovulação, na fertilidade e na ocorrência de morte embrionária precoce em eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 4, p. 537-543, 2006.

FIALA, S. M.; PIMENTEL, C. C.; MATTOS, A R.; et al. Effect of sperm number and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology**, v.67, p.556-562, 2007.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1469, p. 197-235, 2000.

FLEURY J.; FLEURY P.; DE SOUZA FA.; et al. Preliminary evaluation of a BioRelease delivery system for the controlled release of Deslorelin for advancing ovulation in the mare: effects of dose. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. 2003.

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

FOOTE, R.H., Sex ratio in dairy cattle under various conditions. **Theriogenology**, v.8, p.349-356, 1977.

GARNER, D. L.; GLEDHILL, B. L.; PINKEL, D.; et al. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. **Biology and Reproduction**, v. 28, p. 312-21, 1983.

GARNER D. L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v.65, p. 943-957, 2006.

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

GIRALDO, A.M., HYLAN, D., BONDIOLI, K. R., et al. Distribution of sexes within the left and right uterine horns of cattle. USA. **Theriogenology**, v.73, p. 496-500, 2010.

GRISART, B., MASSIP, A., COLLETTE, L., et al. The sex ratio of bovine embryos produced in vitro in serum free oviduct cell conditioned medium is not altered.

Theriogenology, v.43, p. 1097- 1106, 1995.

GUTIÉRREZ, A.; PÉREZ, C.; GRANADOS, J.; et al. Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturational state of oocyte.

Cambridge University Press, Espanha, 1998.

HAFEZ, E.S.E. HAZEZ, B. Reproduction in farm animals, 7. ed, Philadelphia: **Lea e Febiger**, 2000.

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

HAMMOND, J. The fertilization of rabbit ova in relation to ovulation. **Journal of Experimental Biology**, v.11, p. 140–61, 1934.

HENINGER, N.L.; STAUB, C.; BLANCHARD, T.L.; et al. Germ cell apoptosis in the testis of normal stallions. **Theriogenology**, v.62, p.283-297, 2004.

HERSHMAN, JM., Physiological and pathological aspects of the effect of human chorionic gonadotropin on the thyroid. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology e Metabolism**, v. 18, p. 249-265, 2004.

HOHENBOKEN, W.D. Applications of sexed semen in cattle production. **Theriogenology**, v.52, p.1421-33, 1999.

HORNIG, L.E. e McCLINTOCK, M.K. Male sexual rest affects litter sex ratio of newborn Norway rats. **Animal Behavior**. v. 51, p. 991–1005, 1996.

HOSMER, David W.; LEMESHOW, Stanley. Applied Logistic Regression. **Wiley**, New York, 2013.

HOSSAIN, A., BARIK, S., KULKARNI, P. Lack of Significant Morphological Differences Between Human X and Y Spermatozoa and Their Precursor Cells (Spermatids) Exposed to Different Prehybridization Treatments. *American Society of Andrology*. Alabama, v. 22, n. 1, 2001.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Controle de qualidade na seleção de espermatozoides de bovinos por centrifugação em gradientes descontínuos de densidade de sílica coloidal modificada (Percoll®) e iodixanol (Optiprep™). 214f., Jaboticabal, 2005.

HYLAN, D., GIRALDO, M., CARTER, J. et al. Sex Ratio of Bovine Embryos and Calves Originating from the Left and Right Ovaries. *Biology of Reproduction*. v. 81, p. 933-938, 2009.

HUNTER, R.H.F. Sex determination, differentiation and intersexuality in placental mammals. **Cambridge U. Press**. Cambridge, p. 310, 1995.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. 2015. Disponível em: www.ibge.gov.br/home/ acesso: 14/03/2017.

JACOBSEN, R., MOLLER, H., MOURITSEN, A., Natural variation in human sex ratio. *Oxford Journals*. v. 14, p. 3120-3125, 1999.

JOHNSON, L.A. Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, v.16, p.303-326, 1994.

JOHNSON, L.A.; WELCH, G. R. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology*, v. 52, n. 8, p. 1323-1341, 1999.

KING, W.A., Yadar, B.R., Xu, K.P., Picard, L., et al. The sex ratio of bovine embryos produced *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology*, v 36, 779–88, 1991.

KRACKOW, S., Further evaluation of the developmental asynchrony hypothesis of sex ratio variation. *Applied Animal Behaviour Science* v. 5 1, p. 243-250, 1997.

KRAEMER, S., The fragile Male. **BMJ/PSYCHIATRIST**. p. 321:1609, 2000.

LIMA, V. F.; Methodological advances on spermatozoa sexing for using in genetic improvement and animal production, **Revista Brasileira de Zootecnia**. São Paulo, v. 36, 2007.

LOVE, C. Stallion semen evaluation and interpretation. **Proceedings Society for Theriogenology**, p.93-102, 2002.

MACHADO, A. F., ZIMMERMAN, E. F., HOVLAND, D. N., et al. Diabetic embryopathy in C57BL/6J mice: altered fetal sex ratio and impact of the splotch gene. **Diabetes Review** v.50, p.1193–1200, 2001.

MARTINEZ, F.; KAABI, M.; ALVAREZ, M. et al. Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: a field study. **Theriogenology**, Espanha, 2004.

McCUE, P. Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. **Proceedings**, Denver, p.1492-1495, 2004.

MCKINNON, A.O. e VOSS, J.L. The estrous cycles. In: Mckinnon, **Equine Reproduction**., Malvern: Lea e Febizer, p. 114 – 189, 1993.

MOREIRA FILHO, C.A.; RAMALHO, M.D.T.; KIRNZENBAUM, M.; et al. Sex selection of Brazilian Zebu embryos by indirect immunofluorescence using high titer rat H-Y antisera. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 483, 2000.

MOREL M. D. Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management. 2nd Ed, **Cabi Publishing**, p.295-309, 2003.

MUMFORD, E. L., SQUIRES, E. L., JÖCHLE, W., et al. Use of deslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares during three consecutive estrous cycles. **Animal Reproduction Science** v.39, p.129-140, 1995.

NEWCOMBE, J. R., WILSON, M. C., The effect of repeated treatment with human chorionic gonadotrophin to induce ovulation in mares. In: **British Equine Veterinary Association Proceedings**, Scotland, p. 291, 2007.

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

PAUL, A. e KUESTER, J. Sex ratio adjustment in a seasonally breeding primate species: evidence from a Barbary macaque population at Affenberg Salem. **Ethology**, v.74, p. 117–132, 1987.

PARISOTTO, L., GUARAGNA, K., VASCONCELOS, M.; Diferenças de gênero no desenvolvimento sexual. Porto Alegre, **Revista PSCquiátrica**, p. 75-87, 2003.

RESENDE, M., LÚCIO, A., PERINI, A. Desvio da proporção de sexo e integridade do DNA dos espermatozoides bovinos centrifugados em gradientes de densidade contínuos. São Paulo, **Revista Brasileira Saúde Prod**, v.11, n.1, p 260-269, 2010.

RUENESS, J., VATTEN, L., ESKILD, A., The human sex ratio: effects of maternal age. **Human Reproduction**, v. 27, N 1, p. 283-287, 2012.

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

SAMPER, J.C. JENSEN, S., SERGENAT, J., Timing of induction of ovulation in mares treated with ovuplant or chorulon. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.22, n7, p.320-323, 2002.

SAMPER, J. C.; MORRIS, L., The Use of Sex-Sorted Stallion Semen in Embryo Transfer Programs. **Journal of Equine Veterinary Science**, Canadá, p. 387-389, 2012.

SANTOS, M., MAIA, L., NOBRE, D. Sex ratio of equine offspring is affected by the ages of the mare and stallion. **Theriogenology**, v. 84, p. 1238-1245, 2015.

SEIDEL, JR. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v.68, p. 443-446, 2007.

SENDEL, T. Anatomy, Physiology and Reproduction in the Mare, **Factsheet**, Oder no. 10-099,2010.

SILVA, A.R. Efeito da idade do touro e do período de colheita de sêmen sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de bovinos de raças européias e zebuínas; **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.7, p.1218-1222, 2009.

SHETTLES, L.B. Human spermatozoa shape in relation to sex ratios. **Fertility Sterility**, Birmingham, v.12, p.502-508, 1961.

SHETTLES LB, RORVIK DM. How to choose the sex of your baby. New York: **Doubleday**, 1984.

SQUIRES E. L. Hormonal Manipulation of the Mare: A review. **Journal Equine Vet Science**, v. 28, p. 627-634. 2008.

THOMAS, P. G. A.; BALL, B. A.; BRINSKO, S. P. Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant. **Biology and Reproduction**, v.51, p.222-228, 1994.

TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M.; CRABO, B. G. Sperm transport and survival in the mare. **Theriogenology**, v.49, p.905-915, 1998.

VERME LJ, OZOGA JJ. Sex ratio of white-tailed deer and the estrus cycle. **Journal Wild Manage**; v. 45, p. 710-715, 1981.

WATSON, E.D., NIKOLAKOPOULOS, E. Sperm longevity in the mare's uterus. **Journal Equine Veterinary Science** v. 16, p. 390-392, 1996.

WEHNER, G.R., WOOD, C., TAGUE, A., et al. Efficiency of the ovatec unit for estrus detection and calf sex control in beef cows. **Animal Reproduction Sci.** v. 46, p. 27-34, 1997.

WILCOX, A. J.; WEINBERG, C. R.; BAIRD, D. D. Timing of Sexual Intercourse in Relation to Ovulation. **Journal of Medicine**, England, v. 333, 1995.

ZARUTSKIE PW, MULLER CH, MAGONE M, SOULES MR. The clinical relevance of sex selection techniques. **Fertility Sterility**; v.52, p. 891-905, 1989.