

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**ISABELA DE SOUSA VAZ**

**EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO E FREQUÊNCIA DE ADMINISTRAÇÃO  
DO ESTRADIOL PREVIAMENTE À PROGESTERONA SOBRE A EXPRESSÃO  
ENDOMETRIAL DE UTEROCALINA EM ÉGUAS ACÍCLICAS**

**UBERLÂNDIA**

**2018**

**ISABELA DE SOUSA VAZ**

**EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO E FREQUÊNCIA DE ADMINISTRAÇÃO  
DO ESTRADIOL PREVIAMENTE À PROGESTERONA SOBRE A EXPRESSÃO  
ENDOMETRIAL DE UTEROCALINA EM ÉGUAS ACÍCLICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Faculdade de Medicina Veterinária – FAMEV  
da Universidade Federal de Uberlândia – UFU,  
como requisito parcial à aprovação na  
disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso  
II.

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio  
Beletti**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Elisa  
Sant’Anna Monteiro da Silva**

**UBERLÂNDIA**

**2018**

**ISABELA DE SOUSA VAZ**

**EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO E FREQUÊNCIA DE ADMINISTRAÇÃO  
DO ESTRADIOL PREVIAMENTE À PROGESTERONA SOBRE A EXPRESSÃO  
ENDOMETRIAL DE UTEROCALINA EM ÉGUAS ACÍCLICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, com banca examinadora formada por:

Uberlândia, 20 de dezembro de 2018.

---

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, UFU/MG

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ricarda Maria dos Santos, UFU/MG

---

Ms. Muller Carrara Martins, UFU/MG

**UBERLÂNDIA**

**2018**

## RESUMO

O tratamento hormonal com a aplicação de benzoato de estradiol (BE) por cinco dias consecutivos possui correlação positiva com a expressão endometrial de uterocalina em éguas receptoras acíclicas. O objetivo desse estudo foi avaliar se um protocolo que simule o estro longo, mas com menor número de aplicações de BE, também aumenta a expressão endometrial de uterocalina. Para tal, 15 éguas mestiças foram divididas em três grupos: estro longo 5 aplicações (EL5), com cinco aplicações de BE por cinco dias consecutivos; estro longo 2 aplicações (EL2), com duas aplicações de BE com intervalo de três dias entre elas; e estro curto (EC) com dose única de 2,5mg de BE. Os dois primeiros grupos receberam 8mg de BE no total e ficaram expostos ao BE durante 7 dias, e todos os grupos receberam uma dose de Progesterona de Longa Ação (P4LA) ao final do protocolo. Durante o experimento foram realizados exames ultrassonográficos diariamente para avaliar edema uterino e foram coletadas biópsias uterinas quatro dias após a administração de P4LA para avaliar a expressão endometrial de uterocalina. Foi demonstrado que os graus de edema uterino não apresentaram variação entre os grupos e que a expressão de uterocalina foi significativamente maior nos grupos de estro longo. Concluiu-se que o grupo EL2 apresentou maiores vantagens, uma vez que também aumentou a expressão de uterocalina e é um protocolo mais prático e aplicável a campo

**Palavras-chave:** Tratamento hormonal, Estradiol, Éguas Acíclicas, Uterocalina

## ABSTRACT

There is a positive correlation between a hormonal treatment using 5 doses of Estradiol Benzoate (EB) and the uterocalin endometrial expression in non-cyclic mares. The objective of this study was to evaluate if a new long estrus protocol, with less injections of EB, also increases the endometrial uterocalin expression. For the study, fifteen mixbreed mares were divided in 3 groups: long estrus 5 applications (EL5), with 5 injections of EB for 5 consecutive days; long estrus 2 applications (EL2), with 2 doses of EB (3 days gap); and short estrus (EC), with a single dose of 2,5mg of EB; the first two groups received 8mg of EB and kept exposed to estrogen for 7 days, all groups received long action progesterone (P4LA) at the end of the protocol. Ultrasonographic exams were daily realized to evaluate uterine edema and uterine biopsies were collected 4 days after the progesterone administration to evaluate the uterocalin endometrial expression. There weren't many variations of edema between the three groups, but the uterocalin expression was significantly higher on the long estrus groups, and after comparing the results, the group EL2 showed more advantages. Therefore, the hypothesis of simulating a long estrus with a more feasible protocol was confirmed, which allows the optimization of hormonal treatments in non-cyclic mares, with higher pregnancy rates and less management with the animals during the veterinarian's routine.

**Keywords:** Hormonal treatment, Estrogen, Non-cyclic mares, Uterocalina.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	6
<b>2. OBJETIVO</b> .....	7
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	7
<b>3.1 Sazonalidade Reprodutiva em Éguas</b> .....	7
<b>3.2 Ciclo Estral e a síntese de Estrógeno e Progesterona</b> .....	8
<b>3.3 Éguas receptoras acíclicas em programas de Transferência de Embrião (TE)</b> .....	9
<b>3.4 Protocolos hormonais utilizados no preparo de receptoras acíclicas</b> .....	9
<b>3.5 Duração do estro e as taxas de prenhez em éguas</b> .....	10
<b>3.6 Duração do estro e a expressão endometrial de uterocalina em receptoras acíclicas</b> .....	10
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	11
<b>4.1 Animais</b> .....	11
<b>4.2 Tratamentos hormonais</b> .....	11
<b>4.3 Palpações retais e avaliações ultrassonográficas</b> .....	12
<b>4.4 Coleta de biopsia endometrial</b> .....	12
<b>4.5 Análise da expressão gênica do <i>P19</i> por RT-qPCR</b> .....	13
<b>4.6 Análise estatística</b> .....	14
<b>5. RESULTADOS</b> .....	15
<b>5.1 Avaliação ultrassonográfica do edema uterino</b> .....	15
<b>5.2 Expressão gênica do <i>P19</i></b> .....	16
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	16
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	18
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	18

## 1. INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) em equinos é uma técnica amplamente desenvolvida e disseminada no Brasil. O Brasil está entre os três com o maior número de embriões transferidos por ano, junto com os Estados Unidos e Argentina. Essa biotecnologia tem sido utilizada principalmente para a obtenção de um maior número de potros ao longo do ano de éguas doadoras de alto valor genético, além de possibilitar a produção de potros a partir de éguas idosas, de animais que estejam em atividade esportiva ou que sejam subférteis por problemas adquiridos (ARRUDA et al., 2001)

A escolha da receptora é de fundamental importância para o sucesso da TE. No entanto, um grande fator limitante é o número de receptoras cíclicas disponíveis, devido ao manejo alimentar diferenciado oferecido a doadoras e receptoras (SILVA et al., 2014) e à variação na incidência de ovulações no decorrer do ano devido às influências do fotoperíodo (FARIA E GRADELA, 2010). Com o objetivo de aumentar a oferta de receptoras nos programas de TE, protocolos hormonais utilizando estrógenos seguidos de progestágenos são comumente aplicados para estabelecer a gestação em éguas acíclicas (LAGNEAUX; PALMER, 1993; ROCHA FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2014). Esses protocolos fornecem estradiol por dois a quatro dias no máximo antes da administração da progesterona (P4) (SILVA et al., 2014; 2015; GRECO et al., 2012; KAERCHER et al., 2013; BOTELHO et al., 2015; OLIVEIRA-NETO et al., 2018).

Um estudo recente demonstrou correlação positiva entre a duração do estro em éguas receptoras cíclicas e a taxa de prenhez subsequente (CUERVO-ARANGO et al., 2018). Em seguida, outro estudo foi desenvolvido para avaliar o efeito da duração do tratamento com estradiol seguido de progesterona sobre a expressão gênica e proteica endometrial de éguas em anestro (SILVA et al., dados não publicados). Como principal achado, observou-se maior expressão de uterocalina, proteína que fornece lipídeos ao embrião na fase inicial de desenvolvimento, no grupo de éguas que recebeu benzoato de estradiol (BE) por um maior período de tempo (7 dias) antes da aplicação da progesterona. No entanto, neste protocolo foram administradas cinco aplicações sucessivas de BE para simular o estro longo, tornando-se inviável na rotina de campo.

Considerando os resultados acima, acredita-se que uma exposição mais longa do endométrio ao estradiol poderia aumentar as taxas de prenhez em éguas acíclicas nos programas de TE devido à maior expressão endometrial de uterocalina. Entretanto, um protocolo mais

prático e viável deve ser desenvolvido para facilitar o manejo das receptoras e reduzir o número de administrações de BE.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar se um protocolo mimetizando o estro longo para o preparo de éguas receptoras de embrião em anestro, com redução do número de aplicações, resultará em aumento da expressão endometrial de uterocalina, de modo a melhorar a eficiência desses protocolos nos programas de TE sem dificultar o manejo com os animais.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 Sazonalidade Reprodutiva em Éguas**

Éguas são caracterizadas como poliéstricas estacionais e a ocorrência de ciclos ovulatórios está associada aos períodos de maior luminosidade diária (AURICH, 2011). Além do fotoperíodo, a sazonalidade reprodutiva também depende de fatores como idade, raça, temperatura ambiente e condição corporal (GINTHER, 1992; NAGY et al., 2000). Segundo Ginther (2004), a sazonalidade reprodutiva em éguas é dividida em quatro fases, baseada na dinâmica folicular: fase de anestro, de transição de primavera, ovulatória e de transição de outono.

A fase de anestro ocorre geralmente durante o outono e inverno, quando a diminuição da duração da luminosidade diária precede a baixa incidência de ovulações (GINTHER, 1992). Nesta fase as éguas permanecem com pouca ou nenhuma atividade folicular e com ovários pequenos (SHARP, 1980), os quais são consequência da queda estacional da produção do GnRH pelo hipotálamo, em função de períodos prolongados de secreção da melatonina (AURICH, 2011).

A fase de transição de primavera é caracterizada pelo aumento gradual da luminosidade diária e do crescimento folicular. Nesta fase há o desenvolvimento de algumas ondas foliculares anovulatórias antes da ocorrência da primeira ovulação da estação (DONADEU; WATSON, 2007). O fator mais importante para o início da atividade ovulatória no final da fase de transição

é o aumento na concentração do LH circulante, responsável pela maturação final do folículo (AURICH, 2011).

Durante a estação ovulatória, que corresponde aos meses de maior luminosidade diária (final da primavera e verão), as éguas ciclam em intervalos regulares e apresentam ondas de crescimento folicular que dão origem aos folículos ovulatórios (GINTHER, 2004). Já no período de transição de outono, ocorre redução na concentração do LH e consequente desenvolvimento de folículos anovulatórios, redução na taxa de crescimento folicular e posteriormente inatividade ovariana (IRVINE et al., 2000; AURICH, 2011).

### **3.2 Ciclo Estral e a síntese de Estrógeno e Progesterona**

O ciclo estral é definido como o intervalo entre duas ovulações consecutivas e sua duração é de aproximadamente 21 dias em éguas (BERGFELT, 2000). O ciclo estral é dividido em duas fases: estro ou fase folicular e diestro ou fase luteal (GINTHER, 1992).

O estro é caracterizado pela presença de folículos em diferentes estágios de crescimento e pelo aumento, principalmente, do estrógeno  $17\beta$ -estradiol (SATUÉ; GARDÓN, 2013). As altas concentrações de estrógenos secretadas pelo folículo pré-ovulatório induzem aos comportamentos típicos manifestados durante o estro (CROWELL-DAVIS, 2007). Além disso, os estrógenos são responsáveis pelas alterações reprodutivas que asseguram o recebimento e transporte do sêmen para o oviduto, assim como a fertilização do oócito (BERGFELT, 2000). No útero, estrógenos provocam aumento na vascularização e extravasamento de líquido dos vasos para a área intersticial, causando o edema endometrial observado ao exame ultrassonográfico (GINTHER, 1992). O estro tem duração média de 5 a 7 dias e se encerra com a ovulação, quando as concentrações dos estrógenos retornam aos níveis basais (GASTAL, 2009).

O diestro se inicia logo após a ovulação, por meio da formação do corpo lúteo primário (CLP), responsável pela síntese de progesterona (P4). Nesta fase ocorre a perda do edema uterino e a égua não é mais receptiva ao macho (SATUÉ; GARDÓN, 2013; CROWELL-DAVIS, 2007). A P4 é responsável pelo aumento do tônus uterino e estímulo à secreção histotrófica (VANDERWALL, 2011). A fase luteal tem duração aproximada de 14 a 15 dias e, na ausência de um concepto e do reconhecimento materno da gestação, o CLP é lisado pela  $PGF2\alpha$  de origem endometrial por volta dos 13 a 16 dias pós-ovulação. Desta forma, ocorre

queda na concentração de P4, o que permite o início de uma nova fase folicular (DAELS; HUGHES, 1993).

### **3.3 Éguas receptoras acíclicas em programas de Transferência de Embrião (TE)**

A seleção de éguas receptoras nos programas de TE tem efeito significativo no sucesso da técnica. Durante o inverno (dias curtos), a maioria das éguas entra em anestro estacional, período no qual são incapazes de se tornarem gestantes devido à ausência de atividade folicular e ovulações, além disso, o manejo alimentar diferenciado normalmente fornecido a doadoras e receptoras pode retardar o início da ciclicidade nas éguas receptoras (SILVA et al. 2017), dessa forma a disponibilidade de éguas receptoras é um fator limitante nesse período.

Como a reprodução fora da estação de monta é vantajosa para algumas associações de criadores de equinos (AURICH, 2011), algumas alternativas estão disponíveis para obter gestações viáveis durante o inverno, como o uso de protocolos hormonais em éguas receptoras acíclicas em programas de transferência de embrião (TE; ROCHA FILHO et al., 2004; GRECO et al., 2012; SILVA et al., 2017).

### **3.4 Protocolos hormonais utilizados no preparo de receptoras acíclicas**

Para aumentar a disponibilidade das éguas receptoras em programas de TE, são administrados tratamentos hormonais utilizando estrógeno e progesterona (P4) exógenos (ROCHA FILHO et al., 2004; GRECO et al., 2012; KAERCHER et al., 2013; SILVA et al., 2014; 2017; BOTELHO et al., 2015; OLIVEIRA-NETO et al., 2018). Embora os protocolos para aplicação de P4 já tenham sido bem descritos quanto às concentrações adequadas para a manutenção de gestação (BURNS et al., 2008), existem diferentes relatos sobre a dose e frequência de aplicação de estrógeno para o preparo de éguas receptoras acíclicas: dose única de 2,5 mg de Benzoato de Estradiol (BE; SILVA et al., 2014; 2015), doses decrescentes de 20 mg de Cipionato de Estradiol por três dias consecutivos (ECP; GRECO et al., 2012), doses decrescentes de 10 mg de BE por três dias consecutivos (KAERCHER et al., 2013; BOTELHO et al., 2015), bem como 50mg de 17 $\beta$ -estradiol por quatro dias consecutivos (OLIVEIRA-NETO et al., 2018). Os estudos supracitados mostram diferentes taxas de prenhez (60 a 90%) utilizando os diferentes protocolos. No entanto, as diferenças não podem ser atribuídas somente

ao uso dos diferentes protocolos, já que outros fatores, como a qualidade da receptora e a experiência do técnico, também podem interferir nos resultados.

### **3.5 Duração do estro e as taxas de prenhez em éguas**

Em éguas cíclicas, as diferenças na duração do estro, a qual é evidenciada pela visualização do edema endometrial pela ultrassonografia (característica que indica alta relação estrógeno/progesterona), parecem ser relevantes para a fertilidade. Alguns estudos mostram que há correlação positiva entre a duração do estro e as taxas de prenhez, tanto em éguas com luteólise induzida por aplicação de PGF $2\alpha$  (CUERVO-ARANGO E NEWCOMBE, 2010; CUERVO-ARANGO et al. 2015; MATEU-SÁNCHEZ et al. 2016) quanto em éguas com luteólise espontânea (MATEU-SÁNCHEZ et al. 2016).

Por outro lado, não está claro se a duração do estro também influencia a receptividade e suporte do endométrio ao desenvolvimento embrionário. Além disso, foi demonstrado que a alteração na produção dos esteroides ovarianos estrógeno e progesterona, durante a transição do estro para o diestro, afeta a expressão gênica endometrial de forma a fornecer um ambiente uterino adequado para o desenvolvimento do embrião (GEBHARDT et al. 2012).

### **3.6 Duração do estro e a expressão endometrial de uterocalina em receptoras acíclicas**

Considerando os resultados encontrados por Cuervo-Arango et al. (2018), em que foi observada correlação positiva entre a duração do estro em éguas receptoras cíclicas e a taxa de prenhez subsequente, foi avaliado recentemente o efeito da duração do tratamento com estradiol seguido de progesterona sobre a expressão genica e proteica endometrial de éguas em anestro (SILVA et al., artigo submetido). Três grupos experimentais foram avaliados: grupo estro longo, o qual recebeu um total de 8 mg de BE em doses crescentes por cinco dias consecutivos e, após 72h da última dose, foi administrada 1500 mg de P4LA; grupo estro curto, o qual recebeu dose única de 2,5 mg de BE e após 48h foi administrado 1500 mg de P4LA; e grupo P4, que recebeu apenas 1500 mg de P4LA, sem tratamento prévio com BE. Biópsias endometriais foram colhidas quatro dias após a administração da P4LA em todos os grupos. Foram avaliados um total de 17 genes por RT-qPCR, relacionados a produção e transporte de lipídeos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de glicose, genes influenciados pelo estrógeno e fatores de crescimento. O principal achado foi a expressão da uterocalina, uma

proteína que possui atividade de ligação para fornecer lipídeos ao embrião na fase pré-implantativa (SUIRE et al., 2001). Foi observado aumento significativo na expressão da uterocalina no grupo estro longo quando comparado aos grupos 2,5mg de BE e grupo P4. Os resultados demonstraram a influência da duração da mimetização do estro na expressão gênica tardia de uterocalina no endométrio de éguas receptoras acíclicas (Resultados preliminares, artigo submetido).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

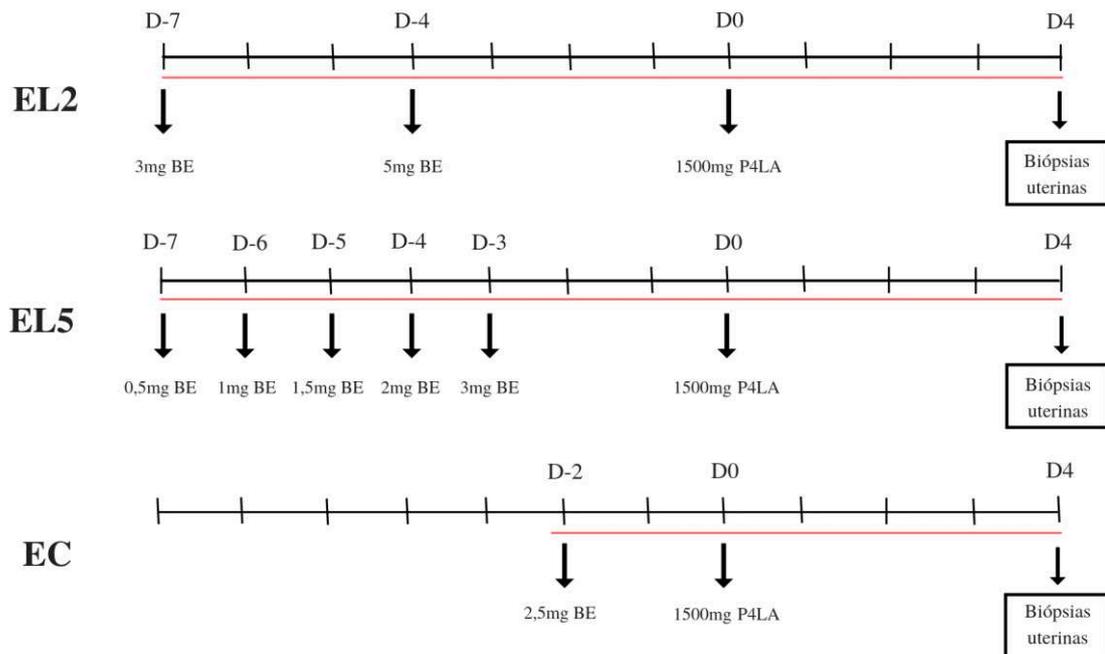
### **4.1 Animais**

Foram utilizadas quinze éguas mestiças, com idade entre 5 e 15 anos e peso entre 350 a 450kg. Os animais foram mantidos em pastagem Tifton (*Cynodon dactylon*) com acesso livre à água e sal mineralizado. O experimento foi conduzido no mês de agosto em um haras situado em Uberlândia – Minas Gerais – Brasil. Todos os procedimentos relacionados aos animais foram realizados de acordo com a aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, n. 84/18.

Foram utilizadas somente éguas em anestro de acordo com a atividade ovariana avaliada por exames ultrassonográficos, ou seja, aquelas que apresentaram folículos ovarianos com diâmetro abaixo de 20mm e ausência de corpo lúteo em três avaliações ultrassonográficas consecutivas com intervalo de sete dias foram caracterizadas em anestro.

### **4.2 Tratamentos hormonais**

Após seleção, as éguas foram divididas aleatoriamente em três grupos: grupo Estro Longo 2 aplicações (EL2), no qual cada animal recebeu 3 mg de benzoato de estradiol (BE) no dia -7 e 5 mg de BE no dia -4, considerando-se o dia 0 (D0) como o dia da aplicação de progesterona de longa ação (P4LA; 1500mg IM); grupo Estro Longo 5 aplicações (EL5), que recebeu 5 aplicações de BE em 5 dias consecutivos a partir do dia -7 (0,5 mg; 1 mg; 1,5 mg; 2 mg e 3mg) e 1500mg de P4LA no D0; e o grupo Estro Curto (EC), que recebeu dose única de 2,5 mg de BE no dia -2 e, 48h depois, 1500 mg de P4LA (D0; Figura 1).



**Figura 1** - Esquema das aplicações hormonais, avaliações ultrassonográficas e coleta de biópsias uterinas (dias relativos à aplicação de P4LA no D0) nos grupos: Estro Longo 5 aplicações de BE (EL5), Estro Longo 2 aplicações de BE (EL2) e Estro Curto (EC). BE = Benzoato de Estradiol. A faixa vermelha indica o período durante o qual foram realizadas as avaliações ultrassonográficas em cada grupo.

### 4.3 Palpações retais e avaliações ultrassonográficas

Foram realizadas palpações retais acompanhadas de avaliações ultrassonográficas do útero e ovários, que tiveram início imediatamente antes do primeiro tratamento hormonal com BE e foram realizados a cada 24 h até o quarto dia após a administração de P4LA (Figura 1). Por meio das avaliações ultrassonográficas foi avaliado o edema uterino, que foi classificado de 0 a 3 (0=ausência de edema uterino; 1=edema uterino mínimo; 2=edema uterino intermediário; 3=edema uterino máximo; MCCUE et al., 2011).

### 4.4 Coleta de biopsia endometrial

Biópsias uterinas foram colhidas no quarto dia após a administração de P4LA (Figura 1), da base de um dos cornos uterinos, pelo método transcervical utilizando pinça de biopsia para equinos (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para a técnica de RT-qPCR, a qual foi realizada no Laboratório de Genética do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

#### 4.5 Análise da expressão gênica do *P19* por RT-qPCR

A extração de RNA total das amostras de endométrio foi feita pelo método do TRIZOL (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento de RNA total, *Ambion – Life Technologies*) seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, o RNA foi tratado com 1U de DNase I RNase free (Promega) (1U para cada 1 µg de RNA) de acordo com as recomendações do fabricante. Após tratamento, o RNA foi quantificado em *Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer)* à 260 nm.

Para a síntese de cDNA (RT) foi utilizada a enzima *M-MLV transcriptase reverse (Invitrogen)* e Oligo dT (15) (*Invitrogen*), seguindo instruções dos fabricantes. Na reação de transcrição reversa foi utilizado 1 µg de RNA total tratado, 1 uL de Oligo dT (15) a 500 µg/ml e 10 mM de dNTP. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos para desnaturar a estrutura secundária do molde e, em seguida, colocada em gelo. Foram acrescentados 2 µL de tampão M-MLV 10X, 2 µL de DTT 0,1 M, 200 unidades de M-MLV transcriptase reverse, completando-se o volume para 20 µL com água ultrapura livre de nucleases. A reação foi incubada à 37°C por 50 minutos, seguido de aquecimento a 70°C por 15 minutos para inativação da enzima. Os *primers* dos genes avaliados neste estudo estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Sequência dos *primers* dos genes avaliados neste estudo.

Gene / Enzima	ID	<i>Primers</i>	Tamanho (pb)	TA (°C)
Fosfoglicerato quinase 1	<i>PGK1</i>	F: CTGTGGGTGTATTTGAATGG R: GACTTTATCCTCCGTGTTC	151 pb	54°C
Partícula de reconhecimento de sinal 14	<i>SRP14</i>	F: CTGAAGAAGTATGACGGTTCG R: CCATCAGTAGCTCTCAACAG	101 pb	55°C
Uterocalina	<i>P19</i>	F: TGAGCCGAAATTCATAGCGA R: CCTCTTACCTTTCTGTGGAAGTG	104 pb	64°C

**ID:** Abreviação arbitrária dos nomes dos genes. **pb:** Tamanho dos fragmentos produzidos pelos *primers*, em pares de base. **TA (°C):** temperatura de anelamento, em graus Celsius.

As reações de qPCR foram realizadas simultaneamente para o gene alvo (*P19*) e os genes normalizadores (*PGK1* e *SRP14*) em placas de leitura óptica de 96-well, em cinco repetições amostrais e triplicata técnica. Nas reações para os genes *P19*, *PGK1* e *SRP14*, foram utilizados 1X *SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystem*), 10  $\mu$ mol de cada primer, 1  $\mu$ l de cDNA, completando-se com água ultrapura (*DirectQ Millipore*) autoclavada para um volume final de 10  $\mu$ l. Todas as reações foram normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes de variações de volume e evaporação ao longo da reação.

As reações de PCR foram processadas em *7300 Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*), nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 54, 55, 58 ou 64°C, conforme temperatura de anelamento dos primers (ver Tabela 1), por 30 segundos.

O CT (*Cycle threshold*) foi definido de acordo com o primeiro ciclo no qual ocorre um aumento significativo na magnitude do sinal gerado, detectado na reação de PCR. Os valores de CT foram calculados pelo *7300 System Software* (*Applied Biosystems*) e foram usados para calcular a expressão do mRNA do gene de interesse (*P19*) relativo ao mRNA dos genes normalizadores (*PGK1* e *SRP14*). A expressão gênica relativa em cada grupo foi calculada por meio da obtenção da média do CT do gene alvo (*P19*) subtraído da média geométrica dos genes endógenos *PGK1* e *SRP14* (VANDESOMPELE et al., 2002), resultando nos valores de delta CT ( $\Delta$ CT).

#### **4.6 Análise estatística**

Estatísticas descritivas foram utilizadas para caracterizar os animais e para apresentar resultados parciais. Valores de edema uterino estão apresentados na forma de mediana. Uma vez que os dados de expressão gênica do RT-qPCR foram considerados não-paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparar os valores de  $\Delta$ CT entre grupos (EL5, EL2 e EC), por meio do programa SYSTAT Versão 13. Diferença estatística foi considerada quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação ultrassonográfica do edema uterino

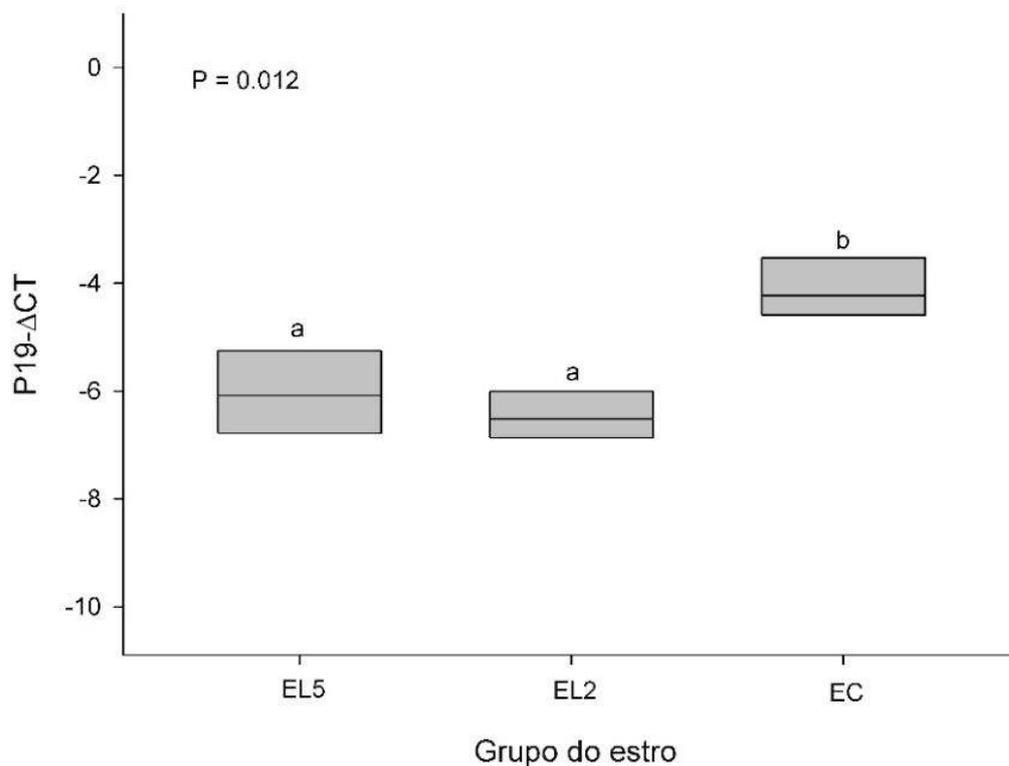
A mediana dos escores de edema uterino encontra-se na tabela 2. No grupo EL5, o edema uterino apresentou um discreto aumento no D-6, 24 h após a aplicação da primeira dose de 0,5 mg de BE. A partir do D-5, o edema atingiu grau 3, mantendo-se no nível máximo até o D-2, quando então diminuiu gradativamente até o grau 1, 24 hs após a aplicação de P4 LA, mantendo-se neste mesmo grau até o D4. No grupo EL2, o edema já atingiu nível máximo 24 após a aplicação da primeira dose de 3mg de BE (D-6), mantendo-se no nível máximo até o D-3. A partir do D-2, foi observado diminuição gradual do edema até atingir o grau 1 no D1, 24 hs após aplicação da P4 LA, mantendo-se baixo até o D4. No grupo EC, o edema atingiu nível máximo 24 hs após a aplicação única de 2,5mg de BE (D-1) e atingiu níveis mínimos no D1, 24 hs após a aplicação de P4 LA.

**Tabela 2** - Mediana dos escores de edema uterino (0 a 3) durante os dias de tratamento hormonal nos grupos: Estro Longo 5 aplicações (EL5), que recebeu 5 aplicações de Benzoato de Estradiol (BE) em dias consecutivos a partir do D -7 (0,5 mg; 1 mg; 1,5 mg; 2 mg e 3mg); Estro Longo 2 aplicações (EL2), que recebeu 3 mg de BE no D-7 e 5 mg de BE no D-4; e Estro Curto (EC), que recebeu 2,5 mg de BE no D-2. Os três grupos receberam 1500 mg de progesterona de longa ação (P4 LA) no D0.

Edema uterino												
Dias relativos à administração de P4 LA (D0)												
Grupos	D-7	D-6	D-5	D-4	D-3	D-2	D-1	D0	D1	D2	D3	D4
EL5	0	0,5	3	3	3	3	2,5	2	1	1	1	1
EL2	0	3	3	3	3	2,5	2,5	2	1	1	1,5	1,5
EC	-	-	-	-	-	0	3	3	0,5	0,5	0,5	0,5

## 5.2 Expressão gênica do *P19*

A expressão gênica do *P19* foi significativamente maior nos grupos de estro longo, ou seja, EL5 e EL2, quando comparada à expressão do grupo EC ( $p < 0,05$ ; Fig. 2). A expressão do *P19* foi similar entre os grupos EL5 e EL2 ( $p > 0,05$ ; Fig. 2).



**Figura 2** - Expressão gênica relativa do *P19* no dia 4 pós administração da progesterona de longa ação (P4 LA) nos grupos Estro Longo 5 aplicações de BE (EL5), Estro Longo 2 aplicações de BE (EL2) e Estro Curto. Menor delta CT ( $\Delta$ CT) indica maior expressão do *P19*. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Os embriões dos mamíferos requerem altos níveis lipídicos como fonte de energia para o seu metabolismo. A uterocalina (*P19*) é uma proteína produzida pelo endométrio das éguas em fases específicas do ciclo estral, cuja função é fornecer suprimento lipídico ao embrião, auxiliando no seu desenvolvimento. Essa proteína é detectável até aproximadamente o 20º dia de gestação e o fim da sua secreção coincide com o fim do período pré-implantativo. Dessa

forma, a uterocalina é responsável pela nutrição lipídica do embrião na fase em que ele ainda não possui ligação direta com o organismo da mãe, ou seja, na fase pré-implantativa, e quanto maior a sua produção, maior a suplementação do embrião (SUIRE et al., 2001).

Considerando que, de acordo com os resultados obtidos, a expressão de uterocalina foi menor no grupo EC do que nos grupos de estro longo e que a expressão do gene não variou nos grupos EL2 e EL5, observa-se que o protocolo com 2 aplicações não foi prejudicado em relação ao de 5 aplicações no quesito de expressão da uterocalina, e, por outro lado, o grupo EC apresentou uma desvantagem significativa nesse quesito.

De acordo com os resultados da avaliação ultrassonográfica do edema uterino, é evidente que não houveram desvantagens relevantes entre os dois grupos de estro longo, ou seja, o protocolo de 2 aplicações de BE proporcionou condições de edema uterino similares às do protocolo de 5 aplicações. Os resultados do grupo EC demonstraram que o protocolo de estro curto provoca um edema ainda maior do que os protocolos de estro longo, entretanto, em estudos previamente citados, foi demonstrada uma correlação positiva entre os protocolos de estro longo e a expressão gênica do *P19* no útero das éguas, o que aponta uma desvantagem ao protocolo do grupo EC.

De acordo com Cuervo-Arango et al. (2018) a duração do estro mimetizado em éguas receptoras acíclicas é diretamente proporcional às taxas de prenhez subsequentes, e, de acordo com Silva et al. (artigo submetido), quando simula-se um estro mais longo, ou seja, quando o tempo de exposição ao estrógeno é maior, há maior expressão endometrial de uterocalina. Como o protocolo utilizado no estudo anterior incluiu alto manejo com as éguas, o presente estudo teve como objetivo principal aumentar a viabilidade do protocolo de estro longo a campo.

Embora os resultados apresentados demonstrem vantagens à ambos os grupos de estro longo, a associação desses dados à rotina no campo evidencia maior vantagem ao grupo EL2, pois, além dos animais desse grupo apresentarem edema semelhante aos do EL5 e alta expressão gênica de *P19* no útero, o protocolo realizado envolveu apenas 2 aplicações de BE, o que torna este protocolo o mais viável em todos os quesitos avaliados.

Dessa forma, é evidente a vantagem da simulação do estro longo em protocolos hormonais de receptoras acíclicas e, principalmente, confirmamos a hipótese de que se pode resumir esse protocolo, que até então incluía 5 aplicações de BE, em apenas 2 aplicações, tornando-o mais praticável à campo.

## 7. CONCLUSÃO

Conclui-se que a duração do tratamento hormonal pela administração de estradiol previamente à progesterona influencia diretamente na expressão endometrial de uterocalina e, conseqüentemente, na nutrição do embrião nos primeiros dias de gestação.

## 8. REFERÊNCIAS

- ARRUDA, R. P. et al. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião equinos? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.5, p. 233-239, 2001.
- AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 220-228, 2011.
- BERGFELT, D.R. Estrous synchronization. In: Samper, J.C. **Equine breeding management and artificial insemination**, Saunders Company, Philadelphia: p. 165-177, 2000.
- BOTELHO, J.H.V. et al. Hormone supplementation protocol using estradiol benzoate and long-action progesterone is efficient in maintaining pregnancy of anovulatory recipient mares during autumn transitional phase. **Animal Reproduction Science**, v.152, p.39-43, 2015.
- BURNS, P.J. et al. Evaluation of BioRelease P4 LA 300 in the Mare. **Proceedings 7th International Symposium on Equine Embryo Transfer**, Cambridge, UK: p. 82-83, 2008.
- CUERVO-ARANGO, J. et al. Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. **Equine Vet J**. v.50(3), p.386-90, 2018.
- CUERVO-ARANGO, J., NEWCOMBE, J. R. Cloprostenol in equine reproductive practice: Something more than a luteolytic drug. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45(5), p.8–11, 2010.
- CUERVO-ARANGO, J. et al. The effect of the interval from PGF treatment to ovulation on embryo recovery and pregnancy rate in the mare. **Theriogenology**, v.83(8), p.1272–1278, 2015.
- CROWELL-DAVIS, S.L, Sexual behavior of mares. **Hormones and Behavior**, v. 52, p. 12-17, 2007.
- DAELS, P.F.; HUGHES, J.P. The normal estrous cycle. In: McKinnon, A.O.; Voss, J.L. **Equine Reproduction**. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993, p. 121-132.
- DONADEU, F.X.; WATSON, E.D. Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horse. **Animal Reproduction Science**. 100, 225–242, 2007.

FARIA, D.R.; GRADELA, A. Hormonotherapy applied to equine gynecology. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.114-122, 2010.

GASTAL, E.L. Recent advances and new concepts on follicle and endocrine dynamics during the equine periovulatory period. **Animal Reproduction**, v 6, p. 144-158, 2009.

GEBHARDT, S. et al. Exploration of global gene expression changes during the estrous cycle in equine endometrium. **Biology Reproduction**, v.87, p.1-13, 2012.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects**. 2<sup>nd</sup> ed. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1992, 642p.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Seasonal influence on equine follicle dynamics. **Animal Reproduction**, v.1, n.1, p. 31-44, 2004.

GRECO, G.M. et al. Use of long-acting progesterone to acyclic embryo recipient mares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.3, p.607-611, 2012.

HAYES K.E.N.; GINTHER O.J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology**, v.25, p.581-90, 1986.

IRVINE, C.H.G., ALEXANDER, S.L., MCKINNON, A.O. Reproductive hormone profiles in mares during the autumn transition as determined by collection of jugular blood at 6 h intervals throughout ovulatory and anovulatory cycles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, p. 101–109, 2000.

KAERCHER, F. et al. Embryo transfer in anovulatory recipient mares treated with estradiol benzoate and long-acting progesterone. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 3, p. 205-209, 2013.

LAGNEAUX, D.; PALMER, E. Embryo transfer in anoestrous recipient mares: attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. **Equine Veterinary Journal**, p. 107-110, 1993. Suplemento 15.

MATEU-SÁNCHEZ et al. The period of the follicular phase during which the uterus of mares shows estrus-like echotexture influences the subsequent pregnancy rate. **Theriogenology**, v.86, p.1506-15, 2016.

MCCUE P.M. et al. **Equine Reproduction**. 2<sup>nd</sup> ed. Ames, IA: Blackwell Publishing, p. 1716-27, 2011.

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, 60-61, p.245-62, 2000.

OLIVEIRA-NETO I.V. et al. Synchronization of cyclic and acyclic embryo recipient mares with donor mares. **Animal Reproduction Science**, v.190, p.1-9, 2018.

ROCHA FILHO, A.N. et al. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. **Animal Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 91-95, 2004.

SANTOS, V.G. et al. Long-term characteristics of idiopathic persistent corpus luteum in the mare. **Theriogenology**, v.84, p.242-251, 2015

SATUÉ, K.; GARDÓN, J.C. A review of the estrous cycle and the neuroendocrine mechanisms in the mare. **Journal of Steroids and Hormonal Science**, v.4, n.2, 2013.

SHARP, D. C. Environmental influences on reproduction in horses. **Veterinary Clinical of North America**, v. 2, p. 207-23, 1980.

SILVA, E.S.M. et al. Administration of 2.5 mg of estradiol followed by 1,500 mg of progesterone to anovulatory mares promote similar uterine morphology, hormone concentrations and molecular dynamics to those observed in cyclic mares. **Theriogenology**, v.97, p.159-69, 2017.

SILVA, E.S.M. et al. Supplementary corpora lutea monitoring allows progestin treatment interruption on day 70 of pregnancy in non-cyclic recipient mares. **Animal Reproduction Science**, v.144, p.122-128, 2014.

SILVA, E.S.M. et al. Ultrasonography of the conceptus development from days 15 to 60 of pregnancy in non-cyclic recipient mares. **Ciência Rural**, v.45, p.512-518, 2015.

SUIRE, S. et al. Uterocalin, a lipocalin provisioning the preattachment equine conceptus: fatty acid and retinol binding properties, and structural characterization. **Biochemical J.**, v.356, p.369-76, 2001.

VANDERWALL, D.K. Progesterone. In: MC KINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2° Ed. Blackwell Publishing, 2011, vol.2, cap.170, pg. 1637-1641.

VANDESOMPELE J et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 2002.