

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**PEDRO SANCHES OQUENDO JUNIOR**

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ESTRÓGENO PREVIAMENTE A  
PROGESTERONA SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO EM ÉGUAS RECEPTORAS ACÍCLICAS**

**UBERLÂNDIA**

**2021**

**PEDRO SANCHES OQUENDO JUNIOR**

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ESTRÓGENO PREVIAMENTE A  
PROGESTERONA SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO EM ÉGUAS RECEPTORAS ACÍCLICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária-FAMEV/UFU, como requisito obrigatório para obtenção de título de mestre em ciências veterinárias.

Área de concentração:

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti  
Co-orientadora: Profa. Dra. Elisa Sant'Anna  
Monteiro da Silva

**UBERLÂNDIA**

**2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

O62i  
2021

Oquendo Junior, Pedro Sanches, 1979-

Influência do tratamento com estrógeno previamente a progesterona sobre a sobrevivência e desenvolvimento embrionário em éguas receptoras acíclicas [recurso eletrônico] / Pedro Sanches Oquendo Junior. - 2021.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.

Coorientadora: Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.6038>

Inclui bibliografia.

1. Veterinária. I. Beletti, Marcelo Emílio, 1964-, (Orient.). II. Silva, Elisa Sant'Anna Monteiro da, 1985-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias  
 BR 050, Km 78, Campus Gloria, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



### ATA DE DEFESA - POS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIENCIAS VETERINARIAS		
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADEMICO Nº PPGCVET/03/2021		
Data:	17 de março de 2021	Hora de início:	14:00 Hora de encerramento: 16:40
Matrícula do Discente:	11912MEV011		
Nome do Discente:	<b>PEDRO SANCHES OQUENDO JUNIOR</b>		
Título do Trabalho:	Influência do tratamento com estrégeno previamente à progesterona sobre a sobrevivência e desenvolvimento embrionários em éguas receptoras acíclicas		
Área de concentração:	Produção animal		
Linha de pesquisa:	Biotécnicas e eficiência reprodutiva		
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Fatores ambientais e nutricionais que afetam a eficiência produtiva e reprodutiva de animais de interesse zootécnico		

Reuniu-se por Videoconferência (meio eletrônico) a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Ricarda Maria dos Santos - UFU; Fernanda da Cruz Landim - UNESP; Marcelo Emílio Beletti** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, **Dr. Marcelo Emílio Beletti**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

**Aprovado.**

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que apds lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/03/2021, as 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/03/2021, as 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda da Cruz Landim, Usuário Externo**, em 18/03/2021, as 15:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 2598100 e o código CRC 28C06F31.

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ESTRÓGENO PREVIAMENTE A  
PROGESTERONA SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO EM ÉGUAS RECEPTORAS ACÍCLICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária-FAMEV/UFU, como requisito obrigatório para obtenção de título de mestre em ciências veterinárias.

Uberlândia, 17 de março de 2021.

---

Prof. Dr Marcelo Emílio Beletti (Orientador) – FAMEV - UFU

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Ricarda Maria dos Santos – FAMEV - UFU

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Fernanda da Cruz Landim – FMVZ - UNESP

## **DEDICATÓRIA**

À Deus por permitir que tudo acontecesse da maneira como deveria no momento propício. À minha esposa pelo amor, paciência e constante apoio em momentos tão difíceis pelos quais tive que passar. Graças a você em nenhum momento me senti desamparado e certamente não teria conseguido alcançar este objetivo sem sua ajuda. Aos meus pais pelo total e irrestrito amor e incentivo ao longo de toda minha vida, fazendo por um filho muito mais daquilo que eu sequer poderia sonhar, vocês sempre estarão presentes na minha vida. À Loba, sua ausência fará muita falta.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor e orientador Marcelo Emílio Beletti por aceitar a orientação de um aluno com uma proposta de pesquisa totalmente fora do seu escopo de trabalho e pela constante atenção mesmo em tempos difíceis como os que estamos vivendo.

A Professora e co-orientadora Elisa Sant'Anna da Silva, por oferecer tamanha oportunidade permitindo com que eu realizasse um sonho antigo, pela extrema paciência e pelo total apoio que se tornou mais evidente ao corrigir, mais uma vez, essa dissertação nas vésperas de dar à luz ao Henrique.

Aos professores Juan Cuervo-Arango e Tom Stout pela incrível oportunidade de fazer parte de um projeto de pesquisa tão importante e desafiador.

Ao professor Ednaldo Carvalho Guimarães pelo inestimável auxílio com as estatísticas e aos veterinários Otávio Augusto Garcia e Pedro Henrique Vilela pela ajuda no manejo das éguas durante o experimento.

À faculdade de medicina veterinária de Uberlândia, pelo apoio da instituição para o desenvolvimento da dissertação.



## RESUMO

A disseminação da transferência de embriões (TE) em equinos nos últimos anos fez aumentar a procura por receptoras, tanto de éguas cíclicas, quanto acíclicas em anestro ou transição. Os primeiros protocolos utilizados em éguas acíclicas, para mimetizar as condições uterinas de éguas cíclicas em diestro, baseavam-se apenas no uso de progesterona (P4); porém estudos posteriores apontaram que a aplicação prévia de estrógeno poderia promover melhoras nas taxas de crescimento e sobrevivência embrionários. No entanto, ainda é incerta a influência de uma maior exposição ao estradiol, previamente a P4, na recuperação e desenvolvimento embrionários em receptoras. Sendo assim, o principal objetivo deste estudo foi determinar o efeito de três protocolos hormonais em éguas acíclicas sobre as taxas de sobrevivência e desenvolvimento embrionários após a TE. Para tal, o grupo estro longo (EL) recebeu 8 mg totais de benzoato de estradiol (BE), em doses crescentes, permanecendo 7 dias exposto ao estrógeno antes da aplicação da P4 de longa ação (P4 LA); o grupo estro curto (EC) recebeu dose única de 2,5 mg de BE dois dias antes da administração de P4 LA; e o grupo sem estro (SE) recebeu apenas 1500 mg de P4 LA. Foi realizada coleta de embriões das doadoras oito dias após a ovulação, os quais foram avaliados e transferidos para as receptoras dos grupos EL, EC e SE no dia 4 após aplicação da P4 LA. Dois dias após a TE, lavados uterinos foram realizados nas receptoras e avaliaram-se as taxas de recuperação, qualidade e taxa de crescimento embrionários. Foi observado que o grupo EL apresentou melhores taxas de recuperação e crescimento embrionário em comparação ao SE. Desta forma, sugere-se que o ambiente uterino é favoravelmente influenciado por uma longa exposição ao estrógeno previamente a P4, embora ainda não tenha sido demonstrada diferença entre a exposição prévia longa ou curta.

**Palavras-chave:** Embrião Equino. Estrógeno. Receptoras Acíclicas.

## ABSTRACT

The spread of embryo transfer in horses (ET) over the years resulted in an increasing of the demand for recipients, both for cyclic and acyclic mares in anestrus or transition. The first protocol used in acyclic mares had the purpose of mimic the uterine conditions of a cyclic mare in diestrus and was based only on the use of progesterone (P4), although later studies indicate that the previous application of estrogen can promote improvements in growth rates and embryonic survival. However, the influence of this greater exposure to estrogen, previously to P4, on embryo recovery and development in recipients is still uncertain. Therefore, the main objective of this study is to determine the effect of three hormonal protocols in acyclic mares on survival and embryonic development rates after ET. For this, the long estrus (LE) group has received 8 mg total of estradiol benzoate (EB) in increasing doses, remaining 7 days exposed to estrogen before the application of long-acting P4 (LA P4); the short estrous (SE) group received a single dose of 2.5 mg of EB two days before the administration of P4 LA; and the group without estrus (NE) started only 1500 mg of P4 LA. Donor embryos were collected eight days after ovulation, which were evaluated and transferred to recipients in the LE, SE and NE groups on day 4 after P4 LA application. Two days after ET, uterine lavages were performed in the recipients and were evaluated as embryo recovery rates, quality, and growth rate. It was observed that the LE group presented better rates of recovery and embryonic growth compared to the SE group. Consequently, it seems that the uterine environment is favorably influenced by along exposure to estrogen previously to P4, although no difference has been demonstrated between long or short previous exposure.

**Keywords:** Acyclic Recipients. Equine Embryo. Estrogen.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

<b>TABELA 1</b> Taxas de recuperação embrionária nas receptoras do grupo estro longo (EL), estro curto (EC) e sem estro (SE), no dia 6 (D6) após a administração de P4 LA, considerando embriões transferidos no D4.....	29
<b>TABELA 2</b> Diâmetro médio embrionário ( $\mu\text{M}$ ) em D8 e D10 e taxa média de crescimento em 48 h nos grupos estro longo (EL, n=6), estro curto (EC, n=4) e sem estro (SE, n=6).....	30
<b>TABELA 3</b> Valores das medianas do tônus uterino encontrados nas receptoras nos grupos estro longo (EL), estro curto (EC) e sem estro (SE), desde o dia da aplicação da P4 LA (D0) até o dia da recuperação do embrião (D6).....	31
<b>TABELA 4</b> Valores das medianas do edema uterino encontrados nas receptoras nos grupos estro longo (EL), estro curto (EC) e sem estro (SE), desde o dia da aplicação da P4 LA (D0) até o dia da recuperação do embrião (D6).....	31

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

<b>FIGURA 1</b> Embrião sob lupa graduada para aferição de diâmetro. ....	25
<b>FIGURA 2</b> Embriões dentro dos padrões estabelecidos utilizados no experimento. a) Embrião grau I D8 com 733µm, b) Embrião grau II D10 com discreto descolamento entre a cápsula e o trofoblasto medindo 2700 µm, c) Embrião grau II com discreta alteração de formato medindo 2533 x 3033 µm.....	26
<b>FIGURA 3</b> Embriões fora dos padrões excluídos do trabalho. a) Oócito não fertilizado, coletado no D8, b) Embrião D10 grau III, c) Embrião D10 grau IV .....	26
<b>FIGURA 4</b> Representação esquemática das aplicações hormonais realizadas em éguas acíclicas nos três grupos de receptoras.....	27
<b>FIGURA 5</b> Recuperação embrionária – Teste de correlação.....	29
<b>FIGURA 6</b> Taxa de crescimento embrionário médio – Teste de correlação.....	30

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>8</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 OBJETIVO .....</b>	<b>9</b>
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>10</b>
3.1 Sazonalidade reprodutiva em éguas.....	10
3.2 Endocrinologia do ciclo estral.....	11
3.3 Transferência de embriões.....	12
3.4 Seleção de receptoras.....	14
3.5 Preparo de receptoras acíclicas.....	15
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO 2 – INFLUÊNCIA DO ESTRÓGENO PREVIAMENTE A PROGESTERONA SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM ÉGUASRECEPTORAS ACÍCLICAS.....</b>	<b>21</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
2.1 Animais .....	24
2.2 Manejo de doadoras.....	25
2.3 Identificação e classificação dos embriões.....	25
2.4 Tratamentos hormonais, transferência e coleta de embriões nas receptoras .....	26
2.5 Palpações retais e avaliações ultrassonográficas.....	28
2.6 Análise estatística.....	28
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 Recoleta embrionária.....	28
3.2 Taxa de crescimento embrionário.....	29
3.3 Tônus uterino.....	30
3.4 Edema uterino.....	31
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>34</b>

## SUMÁRIO

REFERÊNCIAS .....	36
-------------------	----

ANEXO I – Certificado da comissão de ética no uso de animais .....	39
--	----

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1 INTRODUÇÃO

Éguas são poliéstricas estacionais, apresentando crescimento folicular e ovulação nos períodos do ano com maior luminosidade diária (AURICH, 2011). Durante a fase reprodutiva, o ciclo estral divide-se em diestro, onde há domínio do hormônio P4 e o estro, que se caracteriza por apresentar valores basais de progesterona e altas concentrações de estrógeno (GINTHER, 1992). O ciclo estral dura em média 21 dias, com variação entre 16 e 28 dias (SANTOS et al., 2015). Enquanto o diestro apresenta duração relativamente mais constante em relação ao estro (duração média estimada de 14,9 dias, variando entre 12 e 16 dias), o estro, que é o período entre a luteólise e a ovulação, pode apresentar grande variação em éguas, se estendendo de três a 13 dias (GINTHER, 1992).

A duração do estro, acompanhada pelo edema endometrial, aparenta ter relevância na fertilidade em éguas. Diversos estudos têm demonstrado correlação positiva entre a duração do estro após indução com prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ) (CUERVO-ARANGO; GINTHER, 2010; CUERVO-ARANGO et al., 2015; MATEU-SANCHEZ et al., 2016) ou luteólise espontânea (MATEU-SANCHEZ et al., 2016) e as taxas de prenhez. Além disso, as taxas de recuperação embrionária em doadoras e as taxas de gestação em éguas Puro Sangue Inglês foram maiores quando o estro anterior apresentou maior duração. O aumento na duração do estro parece ser benéfico para o processo de fertilização, possivelmente por favorecer a qualidade do oócito e o ambiente do oviduto (CUERVO-ARANGO et al., 2015).

Contudo, ainda não está claro se o aumento na duração do estro também influencia a receptividade uterina e suporte endometrial para o crescimento embrionário em receptoras. A alternância dos esteroides ovarianos (estradiol para progesterona) durante a transição do estro para o diestro interfere de maneira significativa na expressão gênica do endométrio, de tal maneira a favorecer a sobrevivência embrionária (GEBHARDT et al., 2012). Além disso, em um estudo recente foi demonstrada correlação positiva entre a duração do estro na receptora, anteriormente a transferência de embrião, e as taxas de prenhez subsequentes (CUERVO-ARANGO et al., 2018a). Tais achados apontam para um efeito positivo em relação à maior exposição ao estrógeno e a qualidade do ambiente endometrial necessário para o estabelecimento de uma gestação.

Ao investigar diferentes genes relacionados com possível receptividade uterina ao embrião, um estudo preliminar demonstrou maior expressão da uterocalina no endométrio de éguas em anestro tratadas por um longo período com BE (sete dias consecutivos), previamente a P4 LA, quando comparada às éguas tratadas por um período curto com BE (dois dias) ou sem BE antes do tratamento com P4 LA (SILVA et al., 2019). O crescimento e desenvolvimento do concepto antes da implantação é promovido pela secreção histotrófica do endométrio, sendo a uterocalina o componente mais abundante desta secreção, a qual por ser um membro da família das lipocalinas, possui a capacidade de atravessar a membrana embrionária transportando lipídeos para o interior do embrião (SUIRE et al., 2001). Entretanto, o exato impacto de diferentes períodos de exposição ao estrógeno sobre o preparo do endométrio e sobre a sobrevivência e desenvolvimento embrionários ainda é desconhecido.

De acordo com o exposto, hipotetizou-se que embriões equinos se desenvolvem mais rápido e/ou são mais viáveis após a transferência em receptoras que foram expostas a um período maior de estrógeno antes do tratamento com progesterona, quando comparadas com receptoras que receberam um tratamento mais curto ou ausência do estrógeno anteriormente a progesterona.

Sendo assim, objetivou-se com este trabalho determinar o efeito de três protocolos de preparação endometrial (longa exposição ao estrógeno, curta exposição ao estrógeno e ausência de exposição ao estrógeno antes do tratamento com P4 LA) em éguas receptoras em anestro sobre a sobrevivência, taxa de crescimento e morfologia embrionárias.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência de diferentes períodos de tratamento com estrógeno, ou a ausência deste, anteriormente a administração de progesterona, sobre a sobrevivência e desenvolvimento embrionários.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar as taxas de recuperação embrionária positiva e negativa nas receptoras, dois dias após a transferência
- Mensurar os embriões antes da transferência e após a recuperação positiva, nas receptoras, de forma a determinar e comparar a taxa de crescimento entre grupos



- Comparar tônus e edema uterinos entre diferentes grupos

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Sazonalidade reprodutiva em éguas**

Os animais desenvolveram diversas estratégias reprodutivas para assegurar que seus descendentes nasçam em uma época do ano mais favorável (NAGY et al. 2000). Equinos pertencem a uma espécie caracterizada como poliéstrica sazonal com atividade ovulatória relacionada a dias longos; porém além do fotoperíodo outros fatores exógenos interferem com a atividade reprodutiva da égua como idade, nutrição, condição corporal e temperatura ambiental. Ao longo do inverno a maioria das éguas não apresenta crescimento folicular devido a maior liberação de melatonina pela glândula pineal que contribui para a redução da função hipotalâmica e, conseqüentemente, inibe a produção e liberação de GnRH, enquanto a produção média de FSH no hipotálamo se mantém constante ao longo do ano já o pulso de LH é quase imperceptível durante o anestro. Durante a estação de monta, que ocorre entre a primavera e o verão, as éguas apresentam, predominantemente, uma única ovulação por ciclo estral (AURICH, 2011).

Já a fase denominada transicional compreende as fases entre o anestro de inverno até a primeira ovulação e a partir do período ovulatório até o anestro de outono (AURICH, 2011). Esse período apresenta grande variabilidade em relação à duração podendo se estender por 30 até 90 dias em que o nível de crescimento folicular se mostra variável quando se comparam diferentes éguas. Na transição de primavera, onde o eixo hipotálamo-hipofisário começa a apresentar sinais de aumento de atividade, em média, observa-se o desenvolvimento de 3 folículos com diâmetro máximo aproximado de 38 mm, sem que ocorra a ovulação, até que finalmente a égua inicie sua fase ovulatória. Na transição de outono, que corresponde ao período de queda da atividade do eixo hipotálamo-hipofisário, folículos com diâmetro maior que 28 mm continuam a se desenvolver mesmo após a última ovulação (DONADEU; WATSON, 2007).

O período correspondente ao intervalo entre dois estros é chamado de ciclo estral e em equinos dura em média 21 dias, com aproximadamente 15 dias sob predominância da progesterona (diestro) e outros 7 sob influência do estrógeno (estro) (BINELLI et al., 2006).

Em outras espécies o período de estro é usado como ponto de partida para a atividade reprodutiva, mas esse critério não pode ser aplicado em éguas devido ao longo tempo em que são expostas ao estrógeno sendo necessário o uso de outros métodos como palpação retal e ultrassonografia para controle do ciclo (PALMER, 1978), sendo característico desta fase a presença de folículos pré-ovulatórios com diâmetro aproximado de 35 mm (VALLEJO et al., 2017). As éguas apresentam um longo período estral, o que na natureza auxilia na manutenção do grupo coeso com os potros e um ou mais garanhões vivendo em coletividade. Quando em diestro, as éguas evitam ou ignoram o garanhão e quando o contato com o garanhão persiste podem se tornar agressivas. À medida que a concentração de estrógeno aumenta a fêmea passa a permanecer no local com a aproximação do garanhão, levantando a cauda, urinando com maior frequência e por fim, aceitando a monta (CROWELL-DAVIS, 2007).

### **3.2 Endocrinologia do ciclo estral**

O ciclo estral é definido como o período entre duas ovulações e é dividido em duas fases, luteal e folicular. A fase luteal começa após a ovulação, em que ocorre um aumento sistêmico na concentração de progesterona, maior que 1ng/ml, atingindo valores máximos em torno de 7 ng/ml, aproximadamente, 6 dias após a ovulação, até que o corpo lúteo passe por um processo de lise (luteólise), perdendo sua estrutura e fazendo com que a concentração deste hormônio diminua para níveis inferiores a 1 ng/ml. Esta fase é conhecida como diestro e tem um período de duração médio relativamente constante, em torno de 14,9 dias, que se contrapõe a fase conhecida como folicular ou estral, que compreende o período entre a luteólise e a ovulação subsequente, com duração média de 7,2 dias, podendo variar entre 4 e 14 dias (MATEU-SÁNCHEZ et al., 2016). Na fase folicular há a produção de estrógeno, que atinge seu pico na fase final de dominância folicular (33-35 mm de diâmetro), com concentrações médias de 3180 ng/ml e que começa a diminuir dois a três dias antes da ovulação declinando a valores próximos de 229 ng/ml, quando o folículo se encontra na fase subordinada ( $\geq 20$  mm de diâmetro) (GERÁRD et al., 1999).

Durante o estro, o estrógeno determina uma consistência mais relaxada ao útero, enquanto no diestro a progesterona é responsável pelo aumento do tônus uterino, promovendo contração uterina moderada (HAYES; GINTHER, 1986). O útero é capaz de sequestrar grandes quantidades de hormônios esteroides provenientes dos ovários através de receptores proteicos altamente específicos. Tanto o estrógeno quanto a progesterona têm a capacidade de regular a

atividade uterina durante os diferentes estágios estrais e durante a gestação através de receptores endometriais controlados pela ação destes hormônios na circulação (WATSON et al., 1992).

O trato reprodutivo da égua passa por mudanças significativas no estro. Altas concentrações de estrógeno, proveniente dos folículos, contribuem para aumentar o edema endometrial, promover o relaxamento do útero, assim como a abertura da cérvix (AURICH, 2011).

### **3.3 Transferência de embriões**

A técnica de transferência de embriões (TE) não cirúrgica foi desenvolvida no final da década de 70, nos Estados Unidos, a fim de obter produtos de éguas mais velhas que apresentavam problemas reprodutivos para concepção ou gestação. Mais tarde, com a liberação concedida pelas associações de criadores para o registro de mais de um produto por doadora na mesma estação de monta, a técnica foi direcionada para a produção de potros de éguas em competição com alto valor genético (SQUIRES, 2020). A coleta de embriões também pode ser realizada em éguas jovens, entre um e dois anos de idade, diminuindo assim o intervalo de gerações, explorando o potencial genético de uma linhagem (SIEME et al., 2018).

Existem diversos fatores a serem observados em um programa de TE para se evitar perdas embrionárias e diminuição das taxas de prenhez. Alguns pontos importantes envolvem a receptora, o embrião e o processo de transferência. As taxas de prenhez após a TE apresentam muitas variações, que podem estar relacionadas ao técnico, método de transferência, tamanho e idade do embrião, morfologia embrionária, desenvolvimento embrionário, estação do ano, sincronia entre doadora e receptora e histórico reprodutivo da égua (ALLEN, 2005; CARNEVALE et al., 2000; JACOB et al., 2012; MCKINNON; SQUIRES, 1988).

A experiência do técnico responsável pela deposição do embrião na receptora interfere diretamente na taxa de prenhez. Profissionais mais experientes obtiveram sucesso de 78,8 a 79,7% de prenhez utilizando aplicadores para a técnica tradicional não cirúrgica em comparação a 50,9% de profissionais com menor experiência. Já com a adoção da técnica de transferência não cirúrgica, utilizando o fórceps de Wilsher e espéculo vaginal (WILSHER; ALLEN, 2004), foram obtidas taxas de prenhez em torno de 91%, mesmo quando esta foi realizada em época com menor oferta de receptoras, sendo executada por técnicos com pouca ou nenhuma experiência prévia com o método e, até mesmo, com menor experiência em

transferência de embriões (CUERVO-ARANGO et al., 2018b). Neste método de transferência a receptora é sedada no tronco de contenção, onde a remoção de fezes do reto e antisepsia do períneo é realizada. Então procede-se a abertura manual dos lábios vulvares e a inserção do espéculo de Polansky, previamente lubrificado no aspecto ventral, no vestíbulo vaginal, permitindo assim a visualização da cérvix com auxílio de uma lanterna. Após a identificação da cérvix e com uso do fórceps de Wilsher a porção ventral da cérvix é fixada e tracionada caudalmente, o que permite que a cérvix assuma uma posição plana, além de elevar o corpo do útero. Nesse momento, com o auxílio de um aplicador, a cérvix é transpassada e o embrião depositado no corpo do útero (WILSHER; ALLEN, 2004).

Alguns autores apontam nunca terem obtido resultado maior que 60% através do método não cirúrgico tradicional com uso de aplicadores, porém com emprego da técnica de transferência com fórceps e espéculo alcançaram 85% de sucesso nas taxas de prenhez (WILSHER; ALLEN, 2004). Outra publicação aponta maior taxa de prenhez em receptoras cuja transferência do embrião foi realizada pela cérvix com auxílio de espéculo de Polansky e fórceps de Wilsher ao invés da técnica convencional não cirúrgica com aplicadores (CUERVO-ARANGO et al., 2018b).

Em um programa de TE a avaliação morfológica dos embriões se torna importante principalmente por dois motivos: ocupação desnecessária de uma receptora devido a transferência de um oócito não fecundado ou mesmo de um embrião degenerado, além das menores taxas de prenhez relativas aos embriões com baixa qualidade (MCKINNON; SQUIRES, 1988). Os parâmetros utilizados para avaliação embrionária em equinos são: formato, coloração, número de células compactadas, tamanho do espaço perivitelino, número de células extrusadas ou degeneradas e a comparação entre o tamanho do embrião e seu estágio de desenvolvimento (MCCUE et al., 2009).

A taxa de desenvolvimento embrionário pode ser usada como um bom indicador de perda embrionária precoce. As vesículas embrionárias observadas por meio de exames ultrassonográficos 5 dias após a transferência (aproximadamente com 12 dias de gestação) resultaram em menores taxas de perda em relação a vesículas visualizadas a partir do 7º dias (aproximadamente com 14 dias de gestação), sugerindo que as vesículas tardias eram subdesenvolvidas (CARNEVALE et al., 2000).

Outros fatores que podem interferir nos resultados de um programa de TE são a refrigeração e transporte do embrião; porém, desde que realizados da maneira correta, tem

pouca ou nenhuma influência na taxa de prenhez. Observou-se maior perda embrionária no dia 50 quando o tamanho do embrião recuperado apresentava entre 100 e 299 micrometros. O tamanho médio para embriões D7 e D8 é de 406 e 1132  $\mu\text{m}$  respectivamente, embriões coletados nesses mesmos dias com tamanho inferior indicam um retardo no crescimento que pode ser causado por um defeito intrínseco do embrião, permanência em um ambiente inadequado antes da coleta (oviduto e/ou útero) ou decorrentes de uma inseminação realizada após a ovulação. A morfologia também interfere nos resultados já que este tipo de avaliação é um método objetivo para classificar a viabilidade embrionária e probabilidade desses embriões se desenvolverem nas receptoras. Os embriões grau 2 apresentam maiores perdas que grau 1 aos 50 dias de gestação, enquanto graus 3 e 4 apresentam taxas mais baixas em comparação aqueles graus 1 e 2 já no 12º dia (CARNEVALE et al., 2000).

O dia do lavado para recuperação embrionária também apresenta grande influência. entre os dias 7 e 10 pós ovulação o número de embriões recuperados é maior. Embora apesar da taxa de recuperação para embriões D9 e D10 serem similares aos D7 e D8, destaca-se maior fragilidade dos mais velhos por possuírem maior volume e diâmetro que os torna mais frágeis a manipulação (JACOB et al., 2012).

Observa-se, também, diminuição na taxa de prenhez à medida que a estação de monta se aproxima do final e creditou-se tal achado ao uso de receptoras com qualidade inferior visto que as melhores já haviam sido utilizadas no começo da estação (CARNEVALE et al., 2000).

### **3.4 Seleção de receptoras**

A receptora é um dos fatores que mais afetam a TE e a falha na sincronização entre receptoras e doadoras é uma das principais causas de insucesso no programa de transferência de embriões; por isso é fundamental saber com precisão a data de ovulação caso a receptora escolhida esteja ciclando (LOSINNO; ALVARENGA, 2006; SIEME et al., 2018; SQUIRES et al., 1999). A janela de ovulação das receptoras para receber embriões mantendo taxas de prenhez em torno de 70% se estende desde um dia antes da ovulação da doadora até cinco dias após (CUERVO-ARANGO et al., 2019; JACOB et al., 2012).

Receptoras com idade superior a 10 anos, mesmo sem nunca terem sido cobertas, apresentam maiores taxas de perda embrionária, devido a degeneração endometrial. Não se observou diferença estatística nas taxas de prenhez aos 12 ou 50 dias de gestação para

receptoras com idade entre 2 e 9 anos (CARNEVALE et al., 2000; RICKETTS; ALONSO, 1991).

O tamanho do ambiente uterino influi no peso ao nascimento. Quando o potro é gerado em um útero com pequenas dimensões ele apresentará peso e tamanho inferior àquele gerado em um útero maior; porém ao longo de 3 anos quase todas as diferenças mensuradas se compensam, com exceção do comprimento entre o joelho e o boleto. Essa característica se deve a uma menor área de contato do alantocóion combinado com uma diminuição da densidade superficial dos microcotilédones (ALLEN et al., 2004). Todavia quando se avalia o tamanho de potros nascidos de receptoras com altura inferior em até 18,3 cm em relação às doadoras ao longo de 3 anos, não existe diferença significativa em nenhum dos potros avaliados (VAZQUEZ et al., 2018).

Receptoras que apresentam um maior intervalo entre duas ovulações consecutivas sendo expostas a um período maior de estrógeno e, consequentemente, maior edema uterino apresentam maiores taxas de prenhez. Aparentemente a troca na dominância dos hormônios esteroides nos ovários (estrógeno para P4) durante a transição do estro para o diestro afeta a expressão gênica de tal maneira a ponto de favorecer a sobrevivência do embrião (CUERVO-ARANGO et al., 2018a).

A redução do tônus uterino nas receptoras está associada com maiores taxas de perdas embrionárias. Essa alteração de tônus pode sugerir que o ambiente uterino não está compatível com o estágio de crescimento e desenvolvimento embrionário. Este achado já foi correlacionado com éguas que apresentavam baixa concentração de progesterona circulante ( $6,5 \pm 4,3$  ng/ml). Esta particularidade sugere que a presença de tônus à palpação é um bom indicativo na seleção de receptoras (CARNEVALE et al., 2000).

### **3.5 Preparo de receptoras acíclicas**

Diversas publicações trataram sobre a viabilidade do uso de receptoras acíclicas em programas de TE, demonstrando que esta já é uma prática bem estabelecida na reprodução equina (GRECO et al., 2012; HINRICHS et al., 1985). As taxas de prenhez são similares àqueles alcançadas com receptoras cíclicas, porém com a vantagem de estarem aptas para transferência de embriões já no início da estação de monta, enquanto as cíclicas dependem de

fatores como fotoperíodo, nutrição e manejo até que se tornem opções para receberem embriões (GRECO et al., 2012).

Buscando contornar obstáculos na sincronização estral de receptoras cíclicas, diversos pesquisadores desenvolveram diferentes protocolos hormonais com o intuito de aumentar a oferta de receptoras disponíveis aptas a receberem embriões e passaram a estudar o uso de éguas acíclicas (HINRICHS et al., 1985).

Existem trabalhos apresentando taxas de prenhez similares ou até maiores em éguas acíclicas quando comparado às cíclicas, confirmando a possibilidade no uso desta categoria em um programa de TE (GRECO et al., 2012). Contudo, diversos autores apresentam diferentes protocolos no preparo destas éguas, sem que haja estudos apontando a influência destes tratamentos no desenvolvimento dos embriões.

O estrógeno administrado em éguas acíclicas ou ovariectomizadas não promoveu aumento do tônus uterino, enquanto a administração de progesterona resultou em aumento do tônus a nível intermediário, semelhante ao identificado em éguas no diestro. O uso prolongado de progesterona não provocou aumento na contração uterina indicando que a circulação de progesterona por si só não eleva o tônus a patamares semelhantes aos observados em éguas em início de gestação. A administração de progesterona em associação com estrógeno elevou o tônus uterino de maneira muito semelhante a aquele encontrado em éguas no início da gestação demonstrando que a associação desses hormônios resulta no desenvolvimento de um ambiente uterino mais favorável a prenhez (HAYES; GINTHER, 1986).

O uso de 5 aplicações consecutivas de progesterona (300mg) em receptoras ovariectomizadas a partir do D2 da doadora já foi empregado com sucesso para TE, das quais 3 das 4 receptoras utilizadas no trabalho emprenharam. Os autores ressaltam que foram recuperados 7 embriões e que a receptora com resultado negativo para prenhez recebeu 3 destes embriões e que se esta fosse excluída dos resultados seria alcançado uma taxa de prenhez de 75% (HINRICHS et al., 1985).

A associação de estrógeno (cipionato, benzoato e 17 $\beta$ -estradiol) com progestágeno (altrenogest ou P4LA) passou a fazer parte de diversos protocolos, nos quais a presença de edema uterino provocado pela aplicação prévia de estrógeno provocava um edema uterino similar aquele observado no estro de éguas cíclicas. Foram descritos tratamentos nos quais 3 doses decrescentes de estrógeno (10, 6 e 4 mg) eram aplicadas em dias consecutivos e, passadas

24 horas após a última aplicação, caso houvesse presença de edema seria realizada a aplicação de 1500 mg de P4 com 57,68% de prenhez (GRECO et al., 2012). Uso de estrógeno (5, 3 e 2mg de BE) simultâneo ao D0, D1 e D2 da doadora, seguido pela aplicação de 400 mg P4 LA por 3 dias consecutivos (D0, D1 e D2) alcançando 60% de prenhez (KAERCHER et al., 2013). Há trabalhos onde houve uma única aplicação com 2,5 mg de BE entre um e três dias após a ovulação da doadora e passadas 24 horas com a formação do edema uterino as éguas eram mantidas em altrenogest durante os primeiros 70 a 120 dias de gestação com bons resultados de prenhez (SILVA, 2014). Outro tratamento com duas administrações consecutivas com 5 mg de BE, seguidas por 300 mg de P4, apresentou taxa de prenhez de 76% (GRECO et al., 2016). esses autores relataram que quando as éguas não desenvolviam edema após a aplicação de BE eram retiradas do experimento.



## REFERÊNCIAS

- ALLEN, W.R. *et al.* The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III postnatal growth. **Reproduction**, Cambridge, v.127, p.67-77, 2004.
- ALLEN, W. R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.40, p.310:329, 2005.
- AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.124, p.220-228, 2011.
- BINELLI, M. *et al.* Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.34, p.1-7, 2006.
- CARNEVALE, E. M. *et al.* Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v.54, p.965-979, 2000.
- CROWELL-DAVIS, S. L. Sexual behavior of mares. **Hormones and Behavior**, New York, v.52, p. 12-17, 2007.
- CUERVO-ARANGO, J. E. *et al.* Cloprostenol in equine reproductive practice: Something more than a luteolytic drug. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.45, p.8-11, 2010.
- CUERVO-ARANGO, J. E. *et al.* The effect of the interval from PGF treatment to ovulation on embryo recovery and pregnancy rate in the mare. **Theriogenology**, Stoneham, v.83, p.1272-1278, 2015.
- CUERVO-ARANGO, J. E. *et al.* Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. **Equine Veterinary Journal**, London, v.50, p.386-390, 2018a.
- CUERVO-ARANGO, J. E. *et al.* Effect of embryo transfer technique on the likelihood of pregnancy in the mare: a comparison of conventional and Wilsher's forceps-assisted transfer. **Veterinary Record**, London, v.183(10), p.1-7, 2018b.
- CUERVO-ARANGO, J. E. *et al.* In vitro-produced horse embryos exhibit a very narrow window of acceptable recipient mare uterine synchrony compared with in vivo-derived embryos. **Reproduction Fertility and Development**, East Melbourne, v.31, p.1904-1911, 2019.
- DONADEU, F. X. *et al.* Seasonal changes in ovarian activity: Lessons learnt from the horse. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.100, p.225-242, 2007.
- GEBHARDT, S. *et al.* Exploration of global gene expression changes during the estrous cycle in equine endometrium. **Biology Reproduction**, New York, v.87, p.1-13, 2012.
- GÉRARD, N. *et al.* Relationships between follicular fluid composition and follicular/oocyte quality in the mare. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v.60, p.243-253, 1999.

GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare**: basic and applied aspects. 2.ed. Cross Plains WI: Equiservices, 1992. p.642.

GINTHER, O. J. *et al.* Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. **Reproduction**, Cambridge, v.130, p.379-388, 2005.

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

GRECO, G. M. *et al.* Novel long-acting progesterone protocols used to successfully synchronize donor and recipient mares with satisfactory pregnancy and pregnancy loss rates. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v.39, p.58-61, 2016.

HAYES, K. *et al.* Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology**, Stoneham, v.25, p.581-590, 1986.

HINRICHS, K. *et al.* Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer: A preliminary study. **Equine Veterinary Journal Supplements**, Newmarket Suffolk, v.3, p.74-75, 1985.

JACOB, J. C. F. *et al.* Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, Stoneham, v.77, p.1159-1166, 2012.

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

LOSINNO, L. *et al.* Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.34, p.39-49, 2006.

MATEU-SÁNCHEZ, S. *et al.* The period of the follicular phase during which the uterus of mares shows estrus-like echotexture influences the subsequent pregnancy rate. **Theriogenology**, Stoneham, v.86, p.1506-1515, 2016.

MCCUE, P. M. *et al.* How to evaluate equine embryos. **AAEP proceedings**, Lexington, v.55, p.252-256, 2009.

MCKINNON, A. O. *et al.*, Morphologic assessment of the equine embryo. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.192, p.401-406, 1988.

NAGY, P. *et al.* Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60, p.245-262, 2000.

PALMER, E. Control of the oestrous cycle of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.54, p.495-505, 1978.

- RICKETTS, S. W. *et al.* The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. **Equine Veterinary Journal**, London, v.23, p.189-192, 1991.
- SANTOS, V. G. *et al.* Long-term characteristics of idiopathic persistent corpus luteum in the mare. **Theriogenology**, Stoneham, v.84, p.242-251, 2015.
- SIEME, H. *et al.* Equine embryo transfer *In*: Niemann H, Wrenzycki. **Animal Biotechnology**, New York, v.1, p.179-192, 2018.
- 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**, Amsterdam, 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. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v.45, p.512-518, 2015.
- SILVA, E. S. M. *et al.* Effect of the duration of estradiol priming prior to progesterone administration on endometrial gene expression in anestrous mares. **Theriogenology**, Stoneham, v.131, p.96-105, 2019.
- SQUIRES, E. L. *et al.* The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v.51, p. 91-104, 1999.
- SQUIRES, E. L. Current reproductive technologies impacting equine embryo production. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v.89, p.1-4, 2020.
- SUIRE, S. *et al.* Uterocalin, a lipocalin provisioning the preattachment equine conceptus: fatty acid and retinol binding properties, and structural characterization. **Biochemical Journal**, London, v. 356, p.369-376, 2001.
- VALLEJO, V. H. A. *et al.* Transferência de embriões em éguas receptoras anovulatórias. **Revista de Medicina Veterinária**, Bogotá, v.33, p.137-147, 2017.
- VAZQUEZ, J. J. *et al.* Retrospective study on the influence of recipient mare's height on foal height of twin embryos, from birth to three years of age. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v.66, p.214, 2018.
- WATSON, E. D. *et al.* Progesterone and estrogen distribution in the endometrium of the mare. **Theriogenology**, Stoneham, v.38, p.575-580, 1992.
- WILSHER, S. *et al.* An improved method for nonsurgical embryo transfer in the mare. **Equine Veterinary Education**, Oxford, v.16, p.39-44, 2004.

## **CAPÍTULO 2**

### **INFLUÊNCIA DO ESTRÓGENO PREVIAMENTE A PROGESTERONA SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM ÉGUAS RECEPTORAS ACÍCLICAS**

#### **RESUMO**

Diversos protocolos têm sido utilizados para o preparo de éguas receptoras acíclicas em programas de transferência de embriões (TE), nos quais são aplicados estrógeno e/ou progesterona (P4), a fim de simular as alterações hormonais que ocorrem durante o ciclo estral em éguas cíclicas. Os protocolos diferem em vários aspectos, principalmente na duração do tratamento com estrógeno, porém, é incerto se tal aumento no período de exposição ao hormônio também exerce influência na taxa de gestação da receptora acíclica. O principal objetivo deste estudo foi determinar o efeito de três protocolos hormonais em receptoras acíclicas sobre a sobrevivência e desenvolvimento embrionários após a TE. O grupo estro longo (EL) recebeu total de 8 mg de benzoato de estradiol (BE), do sétimo ao terceiro dia antes da administração de 1500 mg de P4 de longa ação (P4 LA); o grupo estro curto (EC) dose única de 2,5 mg de BE dois dias antes da P4 LA; e o grupo sem estro (SE) apenas aplicação da P4 LA. Embriões com oito dias de idade foram transferidos para as receptoras no dia 4 após administração da P4 LA. Dois dias após a TE, lavados uterinos foram realizados nas receptoras e a taxa de recuperação, qualidade e taxa de crescimento embrionários foram avaliados. Observou-se maior taxa de recuperação embrionária no grupo EL em relação ao SE (85% x 46% respectivamente com  $p < 0,05$ ), enquanto ao avaliar as taxas médias de crescimento embrionário notou-se uma correlação alta de que a maior exposição ao estrógeno pode favorecer tanto a sobrevivência quanto o desenvolvimento embrionário.

**Palavras-chave:** Éguas Acíclicas. Progesterona. Viabilidade Embrionária.

## ABSTRACT

Several protocols have been used to prepare acyclic recipient mares in embryo transfer programs (ET), in which estrogen and/or progesterone (P4) are administrated in order to simulate hormonal changes, that occur during the estrous cycle in cyclic mares. These protocols are different in several aspects, mainly in the duration of treatment with estrogen, however, it is uncertain whether such an increase in the period of exposure to the hormone estrogen also influences the pregnancy rate in acyclic recipient. Therefore, the main objective of the authors of this study was to determine the effect of three hormonal protocols on acyclic mares on embryonic survival and development after ET. The long estrous (LE) group received a total of 8 mg of estradiol benzoate (EB) from the seventh to the third day before the administration of 1500 mg of long-acting progesterone (P4 LA); the short estrous (SE) group received a single dose of 2.5 mg of BE two days before P4 LA; and the group without estrus (NE) only has received P4 LA. Embryos at 8 days of age were transferred to the recipients on day 4 after administration of P4 LA. Two days after ET, uterine lavages were performed in the recipients, where the embryo recovery rate, quality and growth rate are evaluated. A higher rate of embryonic recovery was observed in the EL group compared to the SE (85% x 46% respectively with  $p < 0,05$ ) while assessing the average rates of embryonic growth, there was a high correlation that greater exposure to estrogen can favor both survival and embryonic development.

**Keywords:** Progesterone. Acyclic Mares. Embryonic Viability.

## 1. INTRODUÇÃO

A técnica de transferência de embriões (TE) em equinos é uma prática comum em programas de reprodução assistida, sendo o Brasil um dos países onde o procedimento é mais utilizado (SILVA et al., 2016). Entretanto a técnica apresenta como importante fator limitante a qualidade das receptoras disponíveis, fato que se torna mais importante durante o período de transição da primavera, uma vez que algumas associações impõe o uso de um calendário de referência para o nascimento dos potros. Essa determinação se baseia no nascimento de potros já no início da estação de parição, o que favorece o desempenho atlético dos animais, gerando grande pressão para a produção de animais já no início da estação de monta (SILVA et al., 2016). Todavia as éguas são animais poliétricos sazonais, com atividade folicular relacionada a dias mais longos. Desta forma, não possuem desenvolvimento folicular seguido de ovulação ao longo de todo ano, tornando o aprimoramento das técnicas de TE para éguas acíclicas estacionais uma importante ferramenta para incrementar as taxas de prenhez (AURICH, 2011; CROWELL-DAVIS, 2007).

Há muitos anos, os protocolos para éguas acíclicas incluem estrógeno, anteriormente a progesterona (P4), para preparar o endométrio para o recebimento de um embrião (GRECO et al., 2012, 2016; KAERCHER et al., 2013; SILVA et al., 2014), uma vez demonstrado que o estrógeno aumenta a expressão de receptores para P4 em éguas cíclicas (AUPPERLE et al., 2000). Além disso, recentemente foram observadas maiores taxas de prenhez em receptoras cíclicas que apresentaram maior duração do edema uterino no estro anterior a TE (CUERVO-ARANGO et al., 2018a). No entanto, existem trabalhos conflitantes em relação ao uso e duração da aplicação do estrógeno utilizado (por exemplo cipionato, benzoato ou 17 $\beta$ -estradiol) antes da aplicação de P4 (Altrenogest ou P4 LA) para o preparo de receptoras acíclicas, assim como não existe um consenso em relação à melhor dose a ser ministrada (GRECO et al., 2012; KAERCHER et al., 2013; ROCHA FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2014, 2017; SQUIRES et al., 1999).

Um estudo prévio demonstrou que a maior expressão do gene P19 (uterocalina) em resposta ao maior tempo de exposição do endométrio ao estrógeno, anteriormente a ação da progesterona, pode favorecer o ambiente uterino, tornando-o mais receptivo ao embrião. No entanto, ainda não está claro se maiores concentrações de estrógeno resultariam em um ambiente endometrial mais favorável pela síntese de uterocalina (SILVA et al., 2019). A uterocalina é secretada em grandes quantidades no endométrio na presença de P4 (fase luteal

ou início da gestação), sendo muito importante principalmente no início do desenvolvimento embrionário, uma vez que após a eclosão da zona pelúcida (por volta do dia 6) até o dia 22 o embrião apresenta uma cápsula glicoproteica por onde deverá receber a nutrição, que será responsável pela sua sobrevivência e desenvolvimento. É nesse momento que a uterocalina se faz fundamental, uma vez que irá mediar a passagem de substâncias (lipídeos e aminoácidos) através da cápsula garantindo assim a nutrição do embrião nessa fase (CROSSETT et al., 1998).

De acordo com o exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes períodos de tratamento com estrógeno, ou a ausência deste, anteriormente a administração de P4, sobre a sobrevivência e desenvolvimento embrionários, a fim de testar a hipótese de que úteros expostos a maior concentração de estrógeno desenvolveriam um ambiente mais favorável aos embriões. Além disso, o tônus e edema uterinos também foram avaliados nos diferentes tratamentos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Foram utilizadas quarenta e três éguas mestiças sendo, 22 doadoras e 21 receptoras, com idade entre cinco e 15 anos e peso entre 350 e 450kg. As éguas foram mantidas em pastagem de Tifton (*Cynodon dactylon*) com acesso à água e sal mineralizado *ad libitum*. O experimento foi conduzido em dois anos consecutivos, nos meses de julho a outubro dos 2019 e 2020, em uma central de reprodução equina situada em Uberlândia – Minas Gerais – Brasil. As doadoras e receptoras utilizadas se encontravam na mesma central durante todo o experimento. 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, protocolo número 028/19.

As éguas doadoras foram selecionadas com base na atividade ovariana, ou seja, foram utilizadas aquelas que apresentaram ondas de crescimento folicular regular seguida de ovulação. Somente receptoras em anestro estacional foram selecionadas, com base na ausência de atividade ovariana, ou seja, apresentando folículos com diâmetro  $\leq 20$  mm e ausência de corpo lúteo em três avaliações ultrassonográficas, com intervalos de sete dias.

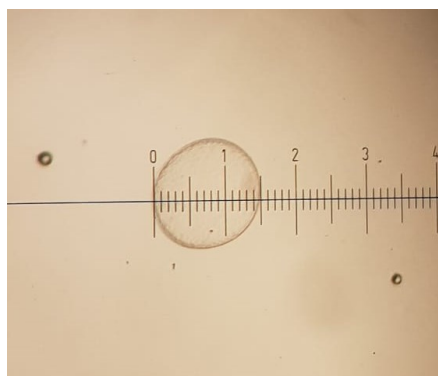
## 2.2 Manejo doadoras

Éguas doadoras apresentando edema endometrial evidente e folículo com diâmetro, aproximado, de 35 mm foram induzidas com 1250 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG - Vetecor®), aproximadamente, às 8:00 h no dia -2 (dois dias antes da ovulação prevista). No dia -1 as doadoras foram inseminadas com sêmen fresco diluído, na concentração de 500 milhões de espermatozoides. No dia 0 (D0) as éguas foram avaliadas por US para confirmação da ovulação, aproximadamente, às 8:00 h. No dia 8 (D8) pós-ovulação (aproximadamente entre 10 e 12:00 h) foi realizado o lavado uterino para recuperação embrionária, com sonda de silicone para coleta transcervical, utilizando de 1 a 4 L de solução de Ringer Lactato.

## 2.3 Identificação e classificação dos embriões

Uma vez identificados, os embriões foram medidos sob lupa graduada (Jenco®), utilizando o aumento de 3 vezes. O valor do diâmetro embrionário foi obtido utilizando escala graduada, ao se dividir o valor aferido na escala por 30 (10 da objetiva multiplicado por 3 do aumento) e multiplicando o valor por mil, obtendo assim o valor final em micrômetros ( $\mu\text{M}$ ) (Fig.1). Então foi realizada a classificação de acordo com a morfologia, dos quais apenas embriões classificados como grau I (esféricos, com células de tamanho, cor e textura uniformes) ou grau II (boa qualidade apresentando apenas pequenas imperfeições, como alguns blastômeros extrusados, formato irregular e pequena separação entre o trofoblasto e a cápsula) (MCKINNON; SQUIRES, 1988) foram utilizados neste trabalho. Apenas embriões no estágio de blastocisto expandido e com diâmetro  $> 300\mu\text{M}$  foram incluídos (Fig. 2) e embriões que não se encaixavam nestes critérios foram descartados (Fig. 3). Os embriões foram lavados e mantidos em meios de manutenção (Equihold® - Minitub®) até o momento da transferência.

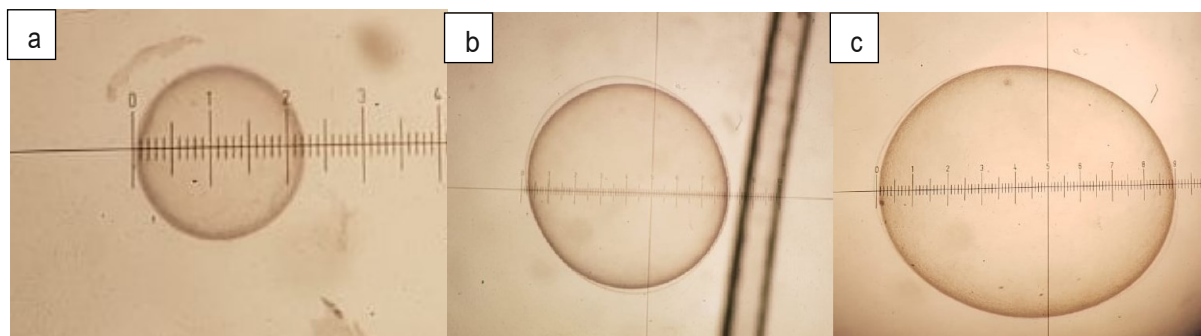
**FIGURA 1.** Embrião sob lupa graduada para aferição de diâmetro



Fonte: O autor.

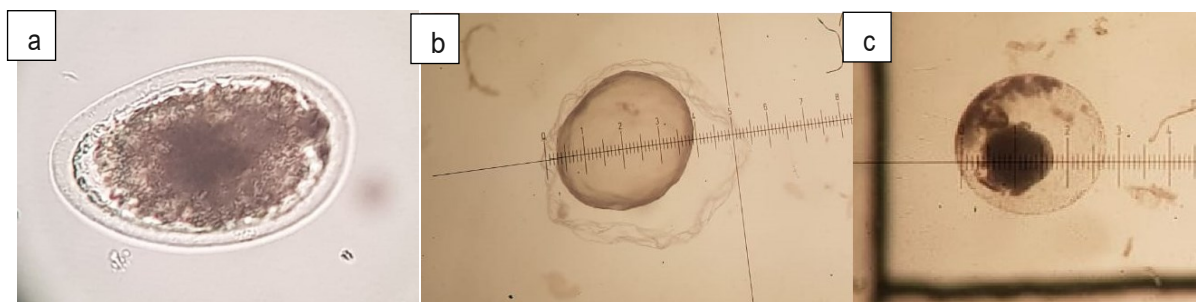


**FIGURA 2.** Embriões dentro dos padrões estabelecidos utilizados no experimento. a) Embrião grau I D8 com 733 $\mu$ m, b) Embrião grau I D10 com discreto descolamento entre a cápsula e o trofoblasto medindo 2700  $\mu$ m, c) Embrião grau I com discreta alteração de formato medindo 2533 x 3033  $\mu$ m.



Fonte: O autor.

**FIGURA 3.** Embriões fora dos padrões excluídos do trabalho. a) Oócito não fertilizado coletado no D8, b) Embrião D10 grau III, c) Embrião D10 grau IV



Fonte: O autor.

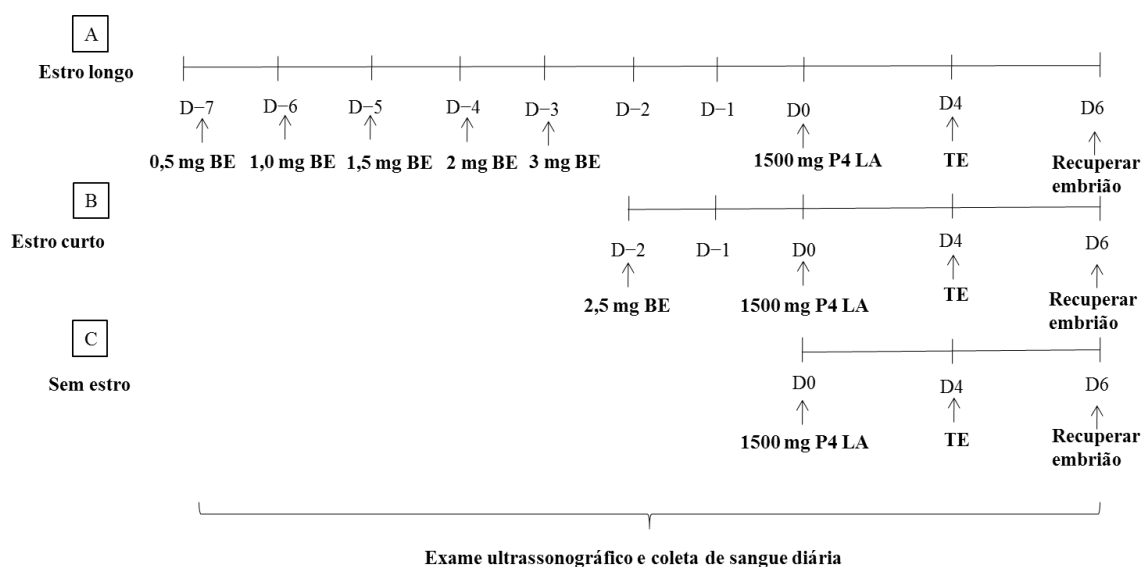
## 2.4 Tratamentos hormonais, transferência e recuperação de embriões nas receptoras

As receptoras de embriões foram divididas em três grupos, de acordo com o protocolo hormonal recebido: I) Estro longo (EL), em que as éguas foram tratadas com total de 8 mg de BE em doses crescentes por cinco dias consecutivos e 72h após receberam 1500 mg de P4 LA (Fig.1A); II) Estro curto (EC), em que os animais receberam uma única dose de 2,5 mg de BE e 48 horas após foram administrados 1500 mg de P4 LA (Fig. 1B); e III) Sem estro (SE), que recebeu única aplicação de 1500 mg de P4 LA, sem aplicação prévia de BE (Fig. 1C). O tratamento hormonal com BE se iniciou um dia antes da indução da ovulação nas doadoras no grupo EL, dois dias após a ovulação da doadora no grupo EC e quatro dias após a ovulação da

doadora no grupo SE, de forma que todos os grupos de receptoras recebessem um embrião D8 (oito dias após a ovulação da doadora) no quarto dia após a aplicação da P4 LA (D4) (Fig. 4).

Para a realização da transferência do embrião, as receptoras foram colocadas no tronco de contenção e sedadas com 3 mg de detomidina (Dormiun® 1% Agner União saúde animal). Durante o início da sedação, foi realizada antisepsia perineal com detergente neutro e água corrente. Os lábios vulvares, bem como a porção ventral do espéculo de Polansky foram lubrificados e o espéculo introduzido através da vagina, dilatando o vestibulo vaginal e expondo a cérvix. Após a visualização da cérvix, a mesma foi fixada na porção ventral e tracionada caudalmente com auxílio da pinça de Wilsher, permitindo a passagem da pipeta e a deposição do embrião no corpo uterino. Toda manipulação embrionária e transferências foram realizadas pelo mesmo profissional.

**FIGURA 4.** Representação esquemática das aplicações hormonais realizadas em éguas acíclicas nos três grupos de receptoras: A) Estro longo; B) Estro Curto e C) Sem estro.



Fonte: O autor.

Dois dias após a TE, lavados uterinos foram realizados nas éguas receptoras na tentativa de recuperar novamente os embriões transferidos. Foram avaliadas a presença ou ausência do embrião no lavado e, quando a recuperação foi positiva, os embriões foram avaliados quanto à qualidade morfológica e diâmetro (descritos no item 2.3).

## **2.5 Palpações retais e avaliações ultrassonográficas**

Foram realizadas palpações retais e avaliações ultrassonográficas imediatamente antes do primeiro tratamento hormonal nas receptoras, continuando-se a cada 24 h até o sexto dia após a administração de P4 LA. O tônus uterino foi avaliado pela palpação retal e classificado em escore de 0 a 3 (0 = ausência de tônus uterino; 1 = tônus uterino mínimo; 2 = tônus uterino intermediário; 3 = tônus uterino máximo (HAYES & GINTHER, 1986). As avaliações ultrassonográficas foram realizadas para avaliar edema uterino, que também 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).

## **2.6 Análise estatística**

Os dados analisados foram provenientes das 41 inseminações, com a recuperação de 26 embriões das doadoras e 16 embriões das receptoras. As taxas de recuperação foram analisadas por testes de comparação pareada e correlação. Ao que se refere a taxa de crescimento, inicialmente foi testada a distribuição das amostras e tendo sido observada a distribuição normal, foi realizado a análise de variância com pós-teste de média - Tukey para verificar diferenças entre os grupos. Para os dados de tônus e edema uterino foi empregado o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Wilcoxon (Action Stat 4.0). Foi considerada diferença estatística quando  $p < 0,05$ .

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Recuperação embrionária**

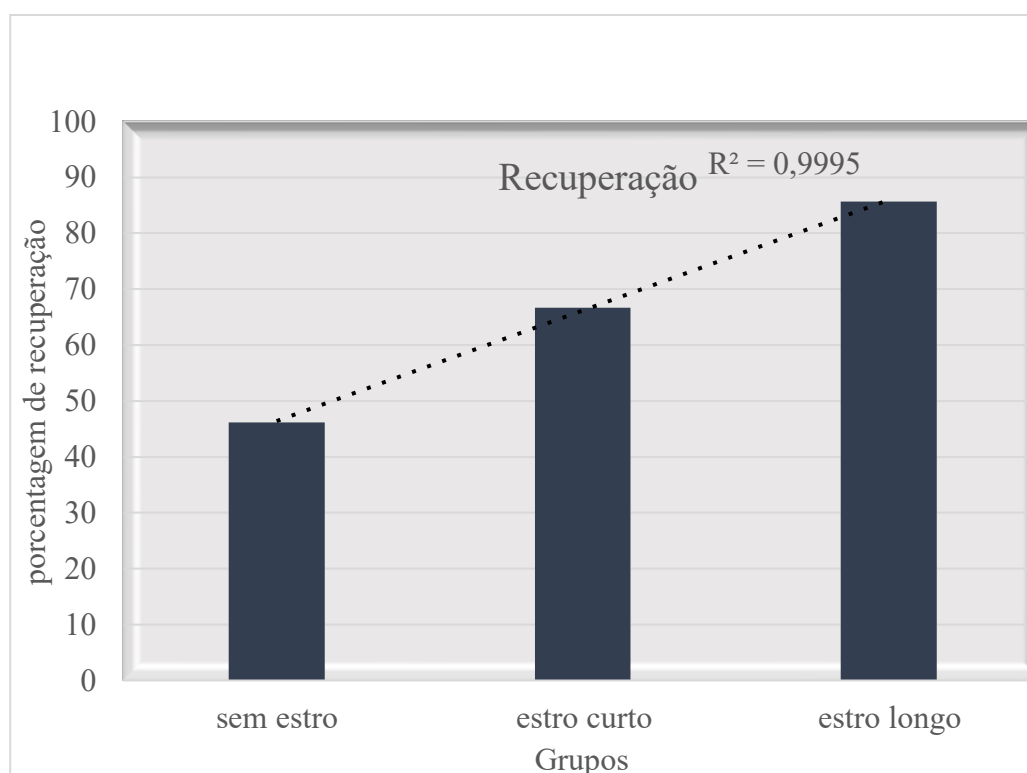
O total de embriões coletados das doadoras e transferidos para as receptoras 4 dias após a aplicação da P4 LA (D4), assim como as taxas de recuperação positivas e negativas no D6 das mesmas receptoras encontram-se na Tabela 1. Foi observada maior recuperação ( $p < 0,05$ ) no grupo EL quando comparado ao grupo SE, apresentado na Figura 5.

**Tabela 1**

Taxas de recuperação embrionária nas receptoras do grupo estro longo (EL), estro curto (EC) e sem estro (SE) no dia 6 (D6) após a administração de P4 LA, considerando embriões transferidos no D4.

Grupo	Total embriões transferidos	Recuperação positiva	Recuperação negativa
SE	13	6 (46%) <sup>a</sup>	7 (54%) <sup>a</sup>
EC	6	4 (66%) <sup>ab</sup>	2(44%) <sup>ab</sup>
EL	7	6 (85%) <sup>b</sup>	1(15%) <sup>b</sup>

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística entre grupos pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).  
Fonte: O autor.

**FIGURA 5.** Recuperação embrionária – Teste de correlação ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor.

### 3.2 Taxa de crescimento embrionário

Não foram observadas diferenças entre os grupos ( $P > 0.05$ ) no que se refere a taxa de crescimento (Tab. 2), porém nota-se alta correlação em favorecimento ao desenvolvimento embrionário quando maiores doses de estrógeno foram aplicadas nos animais (Fig. 6).

**Tabela 2:**

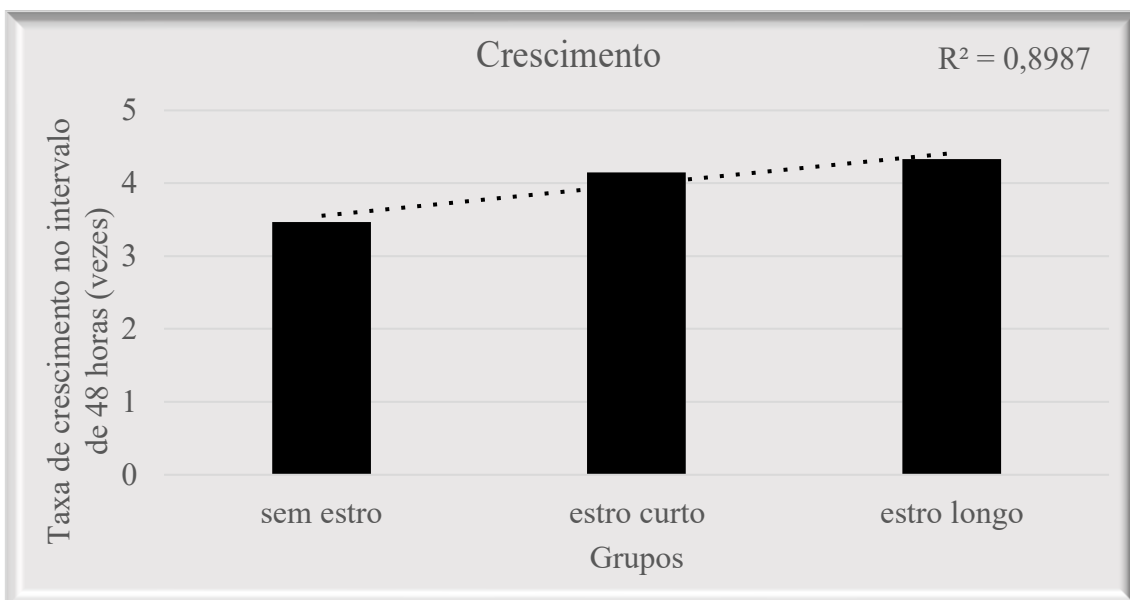
Diâmetro médio embrionário ( $\mu\text{M}$ ) em D8 e D10 e taxa média de crescimento em 48 h nos grupos estro longo (EL,  $n=6$ ), estro curto (EC,  $n=4$ ) e sem estro (SE,  $n=6$ ).

Grupo	D8 ( $\mu\text{M}$ )	D10 ( $\mu\text{M}$ )	Taxa de crescimento em 48 horas
SE	753	2509	3,4 <sup>a</sup>
EC	684	2770	4,1 <sup>a</sup>
EL	601	2587	4,4 <sup>a</sup>

Letras diferentes na coluna da taxa de crescimento indicam que houve diferença estatística entre grupos pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

Fonte: O autor.

**FIGURA 6.** Taxa de crescimento embrionário médio – Teste de correlação ( $p > 0,05$ ).



Fonte: O autor

### 3.3 Tônus uterino

Os resultados da mediana do tônus uterino encontram-se na Tabela 3. Foram observadas diferenças entre os grupos EL e SE no D5 e entre os grupos EC e SE no D0 ( $p \leq 0,05$ ; tab.3). Também foi encontrada tendência de diferença entre o grupo EL com SE no D0 e D6 ( $p \leq 0,1$ ; tab.3). Não foram observadas diferenças em relação ao tônus quando os grupos EL e EC foram comparados; entretanto existe distinção entre os grupos nos quais se fez uso de BE em relação àquele que recebeu apenas P4 LA.

**Tabela 3**

Valores das medianas do tônus uterino encontrados nas receptoras nos grupos estro longo (EL), estro curto (EC) e sem estro (SE), desde o dia da aplicação da P4 LA (D0) até o dia da recuperação do embrião (D6).

	<b>D0</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>D4</b>	<b>D5</b>	<b>D6</b>
SE	0 <sup>bd</sup>	1	1,5	1,5	1,5	1,5 <sup>b</sup>	1,5 <sup>d</sup>
EC	0,5 <sup>acd</sup>	1	1,5	2	2	2 <sup>ab</sup>	1,75 <sup>cd</sup>
EL	1 <sup>abc</sup>	1	1,5	1,5	2	2 <sup>a</sup>	2 <sup>c</sup>

As letras a e b nas colunas indicam diferença estatística entre grupos ( $p < 0,05$ )

As letras c e d nas colunas indicam tendência estatística entre grupos ( $p < 0,1$ )

A letra e nas colunas indica que não houve diferença estatística entre grupos ( $p < 0,05$ )

Fonte: O autor.

### 3.4 Edema uterino

Os resultados do edema uterino encontram-se na Tabela 4. Em nenhum momento foi observado edema uterino no grupo SE. Houve diferença estatística quando os grupos EL e SE foram comparados, bem como os grupos EC com SE nos dias D0, D2 e D3 ( $p \leq 0,05$ ; tab.4). Observou-se alta correlação entre os grupos EL com SE, além dos grupos EC e NE no D1 e D4. Foi observado também tendência estatística ( $p < 0,1$ ) entre os grupos EL e EC no D2.

**Tabela 4**

Valores das medianas do edema uterino encontrados nas receptoras nos grupos estro longo (EL), estro curto (EC) e sem estro (SE), desde o dia da aplicação da P4 LA (D0) até o dia da recuperação do embrião (D6).

	<b>D0</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>D4</b>	<b>D5</b>	<b>D6</b>
SE	0 <sup>b</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>bc</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
EC	2 <sup>a</sup>	1 <sup>c</sup>	0,75 <sup>acd</sup>	0,75 <sup>a</sup>	0,5 <sup>c</sup>	0,25 <sup>e</sup>	0,25 <sup>e</sup>
EL	1,75 <sup>a</sup>	1 <sup>c</sup>	0,5 <sup>abc</sup>	0,5 <sup>a</sup>	0,5 <sup>c</sup>	0,5 <sup>e</sup>	0,5 <sup>e</sup>

As letras a e b nas colunas indicam diferença estatística entre grupos ( $p < 0,05$ )

As letras c e d nas colunas indicam tendência estatística entre grupos ( $p < 0,1$ )

A letra e nas colunas indica que não houve diferença estatística entre grupos ( $p < 0,05$ )

Fonte: O autor.

#### 4. DISCUSSÃO

Uma vez que as receptoras são parte fundamental na busca por melhores resultados em um programa de TE, e que no início da estação de monta o número de éguas cíclicas é um fator limitante, a importância da utilização das éguas acíclicas torna-se ainda mais relevante (SILVA et al., 2014).

Considerando que já foi demonstrada maior taxa de prenhez em receptoras cíclicas que apresentam estro longo, em relação àquelas que apresentam um estro curto (CARNEVALE et al., 2000), o presente trabalho teve como objetivo avaliar se havia diferença na recuperação e desenvolvimento embrionários quando receptoras acíclicas foram expostas ao estrógeno por longo ou curto período anteriormente a administração de P4 com receptoras que receberam apenas a progesterona. Embora não tenha sido possível encontrar diferença entre os grupos EL e EC e os grupos EC e SE, foi possível observar melhor taxa de recuperação e qualidade embrionários nos grupos que receberam estrógeno, principalmente no grupo EL.

No grupo EL, dos 7 embriões transferidos para as receptoras, 6 foram recuperados, enquanto no SE foram necessárias 13 transferências para obter o mesmo número de embriões para avaliação, dado que aponta maior dificuldade em recuperar embriões provenientes do grupo SE. O grupo EC não apresentou diferença quando confrontado aos outros grupos, possivelmente pelo menor número de embriões avaliados (4 embriões). Ainda, quando foi aplicado o teste de correlação nos valores de recuperação embrionária dos diferentes grupos, um alto coeficiente de correlação foi observado, o que reforça ainda mais a diferença entre os grupos estro longo e sem estro e a tendência de que com um número maior de embriões seria possível observar diferença estatística inclusive entre os grupos que receberam estrógeno, o que afirma a hipótese do trabalho.

No tocante ao crescimento médio dos embriões, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos, porém quando analisamos a correlação entre eles existe uma forte correlação apontando para uma vantagem do grupo EL em relação ao SE, dado o alto coeficiente de correlação. Os embriões do grupo EL apresentaram taxas de crescimento numericamente maior, mesmo que inicialmente tivessem um tamanho médio menor que os embriões utilizados em outros grupos. Baseado nisto, a exposição ao estrógeno parece favorecer o crescimento dos embriões. Foi demonstrado por Silva et al. (2019) maior expressão gênica e proteica da uterocalina no dia 4 após a administração de P4 LA em receptoras acíclicas expostas a um longo tratamento com estrógeno (7 dias) previamente à P4. A uterocalina é uma proteína de transporte que carrega lipídeos e pequenas moléculas lipoproteicas para dentro do embrião,

transpondo a capsula glicoproteica embrionária, sob estímulo da P4 CROSSETT et al., 1998). Sendo assim, uma das possíveis explicações para a maior recuperação de embriões em éguas preparadas com estradiol, principalmente por um maior período, seria a maior secreção da uterocalina pelo endométrio. No entanto, ainda é incerto como um maior tempo de estímulo do estradiol sobre o endométrio é capaz de aumentar a secreção de uterocalina após a administração da P4. Além disso, é muito provável que existam outros fatores que também interfiram na qualidade do ambiente uterino e, conseqüentemente, no desenvolvimento do embrião.

Em relação ao tônus uterino, foi observado discreto incremento no grupo que recebeu apenas P4. Nos grupos onde o BE foi previamente administrado, observamos que já no D0 o útero apresentava algum tônus antes da aplicação de P4, ainda que o aumento mais significativo ocorresse após a exposição do útero a ação da P4 (HAYES; GINTHER, 1986). O aumento do tônus se deve a presença de progesterona, uma vez que apenas na presença deste hormônio a tonicidade uterina se desenvolverá de maneira evidente, porém foi observado que a maior tonicidade encontrada no útero se desenvolve quando o mesmo é exposto de maneira simultânea ao estrógeno e a progesterona (HAYES; GINTHER, 1986). Esse fato foi observado nesse trabalho, embora a diferença estatística só tenha sido observada no D0 e D5, o que pode ser explicado pelo baixo número de animais permitindo que variações individuais nas éguas interferissem nos resultados. Este hormônio também é essencial tanto no período inicial da gestação quanto para sua manutenção (HAYES; GINTHER, 1986). Alguns trabalhos já correlacionaram aumento nas taxas de perda embrionária com a baixa tonicidade do útero das receptoras no momento da transferência (CARNEVALE et al., 2000). A P4 responsável pelo tônus uterino também promove a secreção de uterocalina que favorece a nutrição embrionária através do transporte de lipídeos pela cápsula embrionária (CROSSETT et al., 1998).

Já está bem estabelecido que o estrógeno é responsável por induzir o edema uterino, particularmente devido a sua capacidade de promover vasodilatação endometrial (VALLEJO et al., 2017). Neste trabalho o grupo que foi mais exposto a ação deste hormônio não demonstrou diferença quanto ao grupo que recebeu apenas uma dose de BE, porém ambos os grupos apresentaram superioridade em relação ao grupo que recebeu apenas P4. A presença de edema uterino significa que o estrógeno se ligou ao seu receptor e, por consequência, promoveu proliferação celular bem como produção e liberação de proteínas as quais contribuem para o incremento da imunidade e melhora do ambiente uterino (SILVA et al., 2017).



Para a comprovação da hipótese deste trabalho ainda é necessário um número maior de animais, uma vez que observamos tendências de favorecimento à sobrevivência e crescimento embrionário em receptoras que receberam aplicação de estrógeno. Pela experiência prática, a administração de protocolos hormonais com estrógeno, principalmente que mimetizam um estro longo, trazem benefícios já que aumentam as chances de recuperação embrionária e de obter embriões de melhor qualidade. Além disso, a exposição prévia ao estrógeno promove vasodilatação e melhora no número de células de defesa local (AURICH, 2011), diminuindo assim o aparecimento de possíveis inflamações/infecções uterinas após a TE. Por fim, a não observação de um resultado estatístico significativo na taxa de crescimento médio, tônus e edema uterino deve-se ao baixo número de amostras utilizadas neste trabalho, tendo como consequência a impossibilidade de demonstrar um melhor desempenho dos embriões recuperados de receptoras do grupo estro longo. Entretanto foi encontrada diferença significativa na taxa de recuperação entre o grupo estro longo e sem estro sendo que para comprovar nossa hipótese, de que a maior exposição ao estrógeno apresenta vantagem inclusive sobre o grupo que recebeu menor dose estrogênica, seja em éguas cíclicas quanto acíclicas, um maior número de embriões recuperados se faz necessário, já que no final de uma estação de monta a escolha do protocolo estrogênico pode promover uma diferença significativa.

## **5. CONCLUSÃO**

Podemos concluir que a exposição mais prolongada ao estrógeno é importante para a sobrevivência embrionária, já que a taxa de recuperação embrionária do grupo LE foi superior ao grupo SE, fato que não se repetiu quando os grupos EC e SE foram comparados. Em relação ao desenvolvimento embrionário, com o número de embriões utilizados neste estudo, não é possível apontar crescimento significativo nos grupos que receberam estrógeno previamente a progesterona.

### CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho propusemos simular uma crescente exposição estrogênica de fonte exógena avaliando assim a resposta embrionária a este ambiente em comparação a um útero com pouca ou nenhuma influência deste hormônio. Os dados apontam benefícios do estrógeno anteriormente a P4, uma vez que embora não haja diferença estatística, existe diferença numérica principalmente quando comparamos os grupos que receberam BE e o que recebeu apenas P4 LA. A aplicação do teste de correlação apontou forte associação entre o estrógeno e as melhores taxas de crescimento e recuperação.

Devido aos vários desafios encontrados ao longo da realização deste experimento como, por exemplo, a baixa resposta a múltiplas ovulações da espécie, a necessidade do uso de éguas cíclicas e acíclicas no mesmo período de apenas três meses somado ao fato de que uma vez aplicado a P4LA, as receptoras acíclicas ficariam indisponíveis para utilização por um período superior a trinta dias (até a eliminação do hormônio seguida pela perda da tonicidade uterina). Estas dificuldades inerentes a própria técnica de transferência de embrião, acabaram comprometendo a obtenção de um maior número de embriões em cada grupo.

Em relação ao número de embriões recuperados, todos os cuidados foram tomados para garantir a menor interferência humana possível nos resultados. Todas as transferências foram realizadas pelo mesmo profissional, com experiência prévia, utilizando a técnica de Wilsher (CUERVO-ARANGO et al., 2018b), segundo a qual a influência do operador é minimizada ao máximo. Aqueles embriões que não se enquadravam nas classificações como grau I e II (MCKINNON; SQUIRES, 1988), foram descartados para que não comprometessem os resultados. A manipulação embrionária também foi efetuada pelo mesmo operador e, meios de cultivo celular e os horários das coletas e transferências foram, aproximadamente, os mesmos.

Um maior número de coletas embrionárias deve ser realizado a fim de verificar se essa tendência realmente retrata uma diferença significativa, além de tentar determinar quais são as melhores concentrações e doses de estrógeno a serem utilizadas, já que os autores reconhecem a dificuldade na aplicação de múltiplas doses de medicamentos, tanto em relação ao custo quanto a mão de obra despendida em tal processo.

## REFERÊNCIAS

AUPPERLE, H. et al. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v.32, p.228-232, 2000.

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

CARNEVALE, E. M. *et al.* Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v.54, p.965-979, 2000.

CROSSETT, B. *et al.* Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus. **Biology of Reproduction**, New York, v.59, p.483-490, 1998.

CROWELL-DAVIS, S. L. Sexual behavior of mares. **Hormones and Behavior**, New York, v.52, p.12-17, 2007.

CUERVO-ARANGO, J. E. *et al.* Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. **Equine Veterinary Journal**, London, v.50, p.386-390, 2018a.

CUERVO-ARANGO, J. E. *et al.* Effect of embryo transfer technique on the likelihood of pregnancy in the mare: a comparison of conventional and Wilsher's forceps-assisted transfer. **Veterinary Record**, v.183(10), p.1-7, 2018b.

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

GRECO, G. M. *et al.* Novel long-acting progesterone protocols used to successfully synchronize donor and recipient mares with satisfactory pregnancy and pregnancy loss rates. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v. 39, p.58-61, 2016.

HAYES, K. *et al.* Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology**, Stoneham, v.25, p.581-590, 1986.

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

MCCUE, P. M. *et al.* Estrus. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**, 2nd ed. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2011 p. 1716-1727.

MCKINNON, A. O. *et al.* Morphologic assessment of the equine embryo. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.192, p.401-406, 1988.

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

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**, Amsterdam, v.144, p.122-128, 2014.

SILVA, E. S. M. *et al.* Comparison of different regimens of estradiol benzoate treatments followed by long-acting progesterone to prepare noncycling mares as embryo recipients. **Theriogenology**, Stoneham, v.86, p.1749-1756, 2016.

SILVA, E. S. M. *et al.* Administration of 2.5 mg of estradiol followed by 1500 mg of progesterone to anovulatory mares promote similar uterine morphology, hormone concentrations and molecular dynamics to those observed in cyclic mares. **Theriogenology**, Stoneham, v.97, p.159-169, 2017.

SILVA, E. S. M. *et al.* Effect of the duration of estradiol priming prior to progesterone administration on endometrial gene expression in anestrus mares. **Theriogenology**, Stoneham, v.131, p. 96-105, 2019.

SQUIRES, E. L. *et al.* The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v.51, p. 91-104, 1999.

VALLEJO, V. H. A. *et al.* Transferência de embriões em éguas receptoras anovulatórias. **Revista de Medicina Veterinária**, Bogotá, v.33, p.137-147, 2017.



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “O papel do estrógeno no preparo endometrial para sobrevivência e desenvolvimento embrionário na égua”, protocolo nº 028/19, sob a responsabilidade de **Marcelo Emílio Beletti** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **12 de Julho de 2019**.

(We certify that the project entitled “Ensaio de imunização para avaliação de resposta imune na prevenção de infestação por carrapatos *Rhipicephalus microplus*”, protocol 028/19, under the responsibility of **Marcelo Emílio Beletti** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of July 12th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 15/08/2019 Término: 31/10/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Equídeo SRD
Número de animais	40
Peso / Idade	05 a 15 ANOS/ Aproximadamente 350 KG
Sexo	Fêmea
Origem / Local	Central de reprodução equina (Gallop Medicina Veterinária Equina – Uberlândia/MG)
Local onde serão mantidos os animais:	Central de reprodução equina (Gallop Medicina Veterinária Equina – Uberlândia/MG)

Uberlândia, 18 de Julho de 2019.

  
**Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU

Coordenador da CEUA

Portaria Nº 542 DE 10 DE MAIO DE 2019