

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

LEONARDO DE MENDONÇA SIQUEIRA

**EFEITO DE DIFERENTES TIPOS DE ESTRÓGENO E REGIMES DE TRATAMENTO
SOBRE O EDEMA ENDOMETRIAL EM ÉGUAS EM ANESTRO**

UBERLÂNDIA

2022

LEONARDO DE MENDONÇA SIQUEIRA

**EFEITO DE DIFERENTES TIPOS DE ESTRÓGENO E REGIMES DE TRATAMENTO
SOBRE O EDEMA ENDOMETRIAL EM ÉGUAS EM ANESTRO**

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.

**Orientadora: Profa. Dra. Elisa Sant’Anna
Monteiro da Silva**

UBERLÂNDIA

2022

RESUMO

A utilização de éguas acíclicas como receptoras é uma alternativa que otimiza programas de transferência de embriões (TE), possibilitando a geração de um número maior de potros por ano. Tal ferramenta só é possível com a aplicação de protocolos hormonais que utilizam estrógenos e progestágenos, simulando um ambiente uterino que se assemelhe ao das receptoras cíclicas. Diversos estudos mostram a eficácia da utilização desses hormônios exógenos em éguas em anestro a fim de usá-las como receptoras, alguns inclusive relatam taxas de prenhez superiores em éguas acíclicas quando comparadas às cíclicas. Com isso, esses protocolos vêm sendo amplamente utilizados, apresentando diversas variações quanto ao regime empregado, tempo de exposição ao hormônio, tipo de hormônio utilizado, doses, vias de administrações, entre outros. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes regimes de tratamento com estrógenos, utilizando benzoato de estradiol, cipionato de estradiol e 17 β estradiol sobre a intensidade e duração do edema endometrial em éguas acíclicas. Foram utilizadas 16 éguas acíclicas, divididas em 4 grupos e tratadas com diferentes regimes de estrógeno durante 3 dias. Os grupos CE, BE e 17 β E-20mg receberam doses de 10mg, 6mg e 4 mg de cipionato de estradiol, benzoato de estradiol e 17 β estradiol respectivamente, já o grupo 17 β E-40mg foi tratado com doses de 10mg, 20mg e 10mg de 17 β estradiol. Foram realizadas palpações retais e avaliações ultrassonográficas do edema endometrial em todas as éguas diariamente, começando no dia da primeira aplicação hormonal (D0) e se estendendo em até 10 dias ou até o desaparecimento do edema. Foi demonstrado que não houve diferença na intensidade e duração do edema endometrial entre os grupos BE, CE e 17 β E-40mg. O grupo 17 β E-20mg apresentou edema menos duradouro, embora tenha sido apontada diferença estatística na intensidade do edema de D4 a D7 apenas quando comparado ao grupo 17 β E-40mg. Conclui-se que os grupos BE, CE e 17 β E-40mg apresentaram edemas de intensidade e duração semelhantes, enquanto o grupo 17 β E-20mg edema menos duradouro e menos intenso quando comparado ao grupo 17 β E-40mg.

Palavras-chave: Protocolo hormonal, Estrógeno, Éguas acíclicas.

ABSTRACT

The use of acyclic mares as recipients is an alternative that optimizes embryo transfer programs, enabling the generation of a greater number of foals per year. This is only possible with the application of hormonal protocols that use estrogens and progestins in these mares, simulating an uterine environment that resembles cyclic recipients. Several studies have shown the effectiveness of using these exogenous hormones in noncycling mares in order to use them as recipients, some studies even reporting higher pregnancy rates in acyclic mares when compared to cyclic mares. As a result, these protocols have been widely used, with several variations regarding the regimen used, time of exposure to the hormone, type of hormone used, doses, routes of administration, among others. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of different treatment regimens using estradiol benzoate, estradiol cypionate and estradiol-17 β on the intensity and duration of uterine edema in acyclic mares, in order to bring more information that can improve the use of hormonal protocols in acyclic mares, optimizing embryo transfer programs. For this purpose, 16 acyclic mares were used, separated into 4 groups that were treated with different estrogen regimens for 3 days. The ECP, BE and 17 β E-20mg groups received doses of 10mg, 6mg and 4mg of estradiol cypionate, estradiol benzoate and 17 β respectively, whereas group 17 β E-40mg was treated with doses of 10mg, 20mg and 10mg of estradiol-17 β . Transrectal palpations and ultrasonographic exams were performed on all mares daily, starting on the day of the first hormonal application (D0) and extending for until 10 days or until the disappearance of uterine edema. There was no difference in the intensity and duration of endometrial edema between groups BE, EC and 17 β E-40mg. The group 17 β E-20mg presented less lasting edema, although a statistical difference in the edema intensity from D4 to D7 was pointed out only when compared to the 17 β E-40mg group. It was concluded that the BE, EC and 17 β E-40mg groups had similar edema intensity and duration, while the 17 β E-20mg group had less lasting and less intense edema when compared to the 17 β E-40mg group.

Keywords: Hormonal protocol, Estrogen, Noncyclic mares.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Sazonalidade Reprodutiva	7
2.2 Ciclo Estral e a ação dos estrógenos no útero	8
2.3 Estradiol e seus ésteres	9
2.4 Transferência de Embriões (TE) em equinos	10
2.5 Protocolos hormonais utilizados no preparo de receptoras acíclicas	11
3. METODOLOGIA	14
3.1 Animais	14
3.2 Tratamentos hormonais	14
3.3 Palpações retais e avaliações ultrassonográficas	15
3.4 Análise estatística	16
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÃO	20
7. REFERÊNCIAS	21

1. INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) em equinos é uma técnica amplamente desenvolvida e disseminada no Brasil. Nosso país ocupa lugar de destaque mundial na utilização dessa técnica, onde foi registrado o maior número de TE na espécie equina no mundo em 2020 (VIANA, 2021). Essa biotecnologia possibilita a obtenção de maior número de potros ao longo do ano de éguas doadoras com alto valor genético, além de permitir a produção de descendentes de éguas que possuem subfertilidade por problemas adquiridos, de éguas idosas, e de animais que estejam em atividade esportiva (ARRUDA et al., 2001).

A escolha da receptora é de extrema importância para o sucesso da TE. Entretanto, uma importante limitação em programas de TE é o número de receptoras disponíveis, haja visto que no começo da estação de monta muitas se encontram em anestro devido a sazonalidade reprodutiva e à diferença no manejo nutricional entre doadoras e receptoras (SILVA et al., 2014). Com o intuito de aumentar a oferta de receptoras nos programas de TE, protocolos hormonais utilizando estrógenos e progestágenos são frequentemente aplicados em éguas acíclicas (ROCHA FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2014).

Diversos estudos confirmam a eficiência de protocolos hormonais utilizando estrógenos e progestágenos no preparo de éguas em anestro como receptoras nos programas de TE (BOTELHO et al., 2015; ROCHA FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2014). Um estudo publicado em 2017 demonstrou que a aplicação de benzoato de estradiol seguido de progesterona (P4) em éguas acíclicas promove mudanças morfológicas no útero e concentrações plasmáticas hormonais semelhantes àquelas encontradas em éguas cíclicas, nos períodos correspondentes avaliados (SILVA et al., 2017). Um fato interessante é que estes estudos relatam a utilização de diferentes tipos e frequências de aplicação de estrógenos nos protocolos hormonais, como o cipionato de estradiol (GRECO et al., 2012; ROSER et al., 2020), benzoato de estradiol (BOTELHO et al., 2015; KAERCHER et al., 2013; SILVA et al., 2014) e 17 β estradiol (OLIVEIRA-NETO et al., 2018; SEGABINAZZI et al., 2021). Esses ésteres de estradiol possuem diferenças principalmente em sua farmacocinética, apresentando tempos de meia-vida distintos, sendo o tempo de meia-vida do cipionato de estradiol (CE) maior do que o do benzoato de estradiol (BE), que por sua vez possui o tempo de meia-vida maior que o do 17 β estradiol (17 β E) (BURKE et al., 2000; LARSON; BALL, 1992; SALES et al., 2012).

Apesar dos inúmeros estudos comprovando a eficácia dos protocolos hormonais nas éguas acíclicas, há variadas formas de conduzir esses protocolos, e ainda faltam estudos para esclarecer qual a melhor dose, tipo de hormônio utilizado e tempo de tratamento. Além disso, as informações disponíveis sobre a ação e farmacocinética dos diferentes tipos de estrógeno são relativas a vacas. Não há estudos avaliando as características desses hormônios em éguas em anestro.

Com as informações expostas acima, hipotetizamos que o edema endometrial causado pelos três tipos de estrógeno atinja intensidades elevadas 24 h após a administração, no entanto, que o edema provocado pelo CE dure mais tempo que aquele provocado pelo BE, que por sua vez poderá se manter por mais tempo que aquele ocasionado pelo 17β estradiol, baseado nos tempos de meia-vida previamente relatados sobre tais hormônios.

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes regimes de tratamento utilizando as mesmas doses (10mg, 6mg e 4 mg) de CE, BE e 17β E, assim como a dose recomendada pelo fabricante e utilizada a campo do 17β E (10mg, 20mg e 10mg), sobre a intensidade e duração do edema endometrial em éguas acíclicas, a fim de trazer mais informações que possam aprimorar a utilização de protocolos hormonais em éguas em anestro, otimizando programas de TE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sazonalidade Reprodutiva

As éguas manifestam comportamento reprodutivo poliéstrico estacional, apresentando ciclicidade naqueles períodos onde a incidência de luz diária é maior. No hemisfério sul esses períodos de maior incidência solar acontecem em média de outubro a maio e no hemisfério norte de abril até novembro. No entanto, a sazonalidade reprodutiva pode ser influenciada por questões individuais, pela raça, estado nutricional e também pela latitude, sendo menos influente nas éguas que vivem próximas à linha do Equador. A inibição da atividade reprodutiva nos dias mais curtos acontece devido a maior liberação de melatonina pela glândula pineal, que por sua vez vai inibir a liberação de GnRH pelo hipotálamo, impedindo os processos fisiológicos do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal que levariam a uma ovulação (DAVIES MOREL, M.C.G, 2003).

Segundo Ginther (2004), o ciclo reprodutivo das éguas é dividido em quatro fases: anestro, transição de primavera, ovulatória e transição de outono, sendo essas fases baseadas na dinâmica folicular. No período de anestro as éguas apresentam pouca ou nenhuma atividade folicular, com ovários pequenos e folículos com diâmetro médio de 5 a 15 mm. Como consequência da atrofia das gônadas, durante o anestro os hormônios ovarianos e seus efeitos comportamentais e fisiológicos são mínimos (SHARP, 1980).

Na fase de transição de primavera, inicia-se um maior desenvolvimento folicular e os folículos possuem, em média, o diâmetro de 15 a 25mm. A ausência de corpo lúteo evidencia que ainda não ocorreu a primeira ovulação (SHARP, 1980). Durante essa fase, podem aparecer folículos de 30 mm ou maiores, porém não vão chegar até o estágio ovulatório devido as baixas concentrações de LH (FREEDMAN; GARCIA; GINTHER, 1979).

A partir do momento que ocorrer a primeira ovulação e consequente formação do corpo lúteo, a égua se encontrará na fase ovulatória, onde ocorrerão regularmente os ciclos estrais. Após a última ovulação da fase cíclica, haverá o desenvolvimento de uma nova onda folicular onde o maior folículo não irá ovular, devido a diminuição da pulsatilidade de LH na fase de transição de outono. A partir de então a égua retornará para a fase de anestro (SHARP, 1980).

2.2 Ciclo Estral e a ação dos estrógenos no útero

Define-se como ciclo estral o intervalo entre uma ovulação e a subsequente, e na espécie equina esse intervalo dura aproximadamente 21 dias (BERGFELT, 2000). O ciclo é composto por duas fases principais: a fase de estro, que dura aproximadamente de 5 a 7 dias, e a fase luteal com duração aproximada de 14 a 15 dias (GINTHER, 1992). A fase de estro caracteriza-se pela presença de folículos dominantes e pré-ovulatórios secretores de estrógeno, sendo esse hormônio o responsável por induzir o comportamento de cio nas éguas e aumentar a vascularização e permeabilidade vascular no útero, resultando no aparecimento do edema endometrial (BERGFELT, 2000; SATUÉ; GARDÓN, 2013;). O estro se encerra no momento da ovulação, dando início então ao diestro, caracterizado pela formação do corpo lúteo e aumento da produção da P4, que cessará o edema endometrial e os comportamentos compatíveis com o cio (CROWEELL-DAVIS, 2007; SATUÉ; GARDÓN, 2013). Caso não haja o reconhecimento de gestação, teremos a diminuição da produção de P4 devido ao processo de luteólise, desencadeado pela prostaglandina F2 alfa (PGF-2 α) produzida no endométrio. Após a luteólise, inicia-se o desenvolvimento de mais uma onda folicular dando início a uma nova fase de estro (DAELS; HUGHES, 1993).

O estrógeno, principal hormônio presente durante o estro, medeia alterações fisiológicas importantíssimas no útero, sendo as principais relacionadas com o aumento da perfusão vascular e extravasamento de líquido para o interstício uterino, resultando na formação do edema endometrial (GINTHER, 1992). Além disso, ele atua na diferenciação e proliferação de células do endométrio e do miométrio (AUPPERLE et al., 2000, MELLOR & THOMAS, 1995). O edema endometrial ajuda em importantes processos relacionados a reprodução, como o recebimento do sêmen e o seu deslocamento até as tubas uterinas, onde ocorre a fecundação (BERGFELT, 2000). Além disso, outra função do estradiol é a estimulação da expressão dos receptores de progesterona e dos seus próprios receptores no endométrio, demonstrado em vários estudos em éguas cíclicas (HARTT et al., 2005; MCDOWELL et al., 1999; WATSON; SKOLNIK; ZANECOSKY, 1992).

Vale ressaltar que já foi demonstrado em éguas receptoras cíclicas maior taxa de prenhez naquelas que apresentaram um estro longo (> 3 dias) previamente a ovulação (CUERVO-ARANGO et al., 2018a). Mais recentemente, Silva et al. (2019) demonstraram que o estrógeno também aparenta desempenhar um papel relevante no ambiente molecular uterino de éguas

acíclicas. Eles observaram que quando o útero é exposto por um período de tempo maior a esse hormônio antes da ação da P4 (sete dias, quando comparado a dois ou ausência de estrógeno antes da aplicação de P4) ocorrem alterações moleculares, como a diminuição da expressão gênica de FGF-2 (fator de crescimento fibroblástico 2) e o aumento da expressão gênica e proteica de uterocalina, que podem estar relacionadas com o aumento da receptividade do endométrio ao embrião.

2.3 Estradiol e seus ésteres

Classificado como um hormônio esteroide, o estrógeno possui como principais compostos a estrona, o estriol e o 17β -estradiol, sendo produzido principalmente no ovário pelos folículos, mas também em outros locais do organismo animal, como na placenta e glândula adrenal (CREPALDI, 2009). O estradiol e seus ésteres são amplamente utilizados no manejo reprodutivo das espécies domésticas, sendo comumente empregado na reprodução bovina para controle do ciclo estral nos protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) (BO et al., 2006).

Os estrógenos naturais são esteroides com 18 átomos de carbono, com um anel fenólico A e um grupo hidroxila ou cetona no carbono 17. O anel fenólico é a principal estrutura responsável pela alta seletividade e afinidade entre o estrógeno e seus receptores. Um éster é uma cadeia, composta majoritariamente por átomos de carbono, que normalmente se liga ao hormônio esteroide no carbono 17. A esterificação do grupo hidroxila do 17β -estradiol permite que esse grupo fique mais resistente ao metabolismo, fazendo com que sua duração no organismo seja prolongada (MAPLETOFT et al., 2002).

Nesse sentido, as esterificações promovidas à molécula do 17β -estradiol para a formação do cipionato de estradiol e benzoato de estradiol, aumentam o tempo de meia-vida desses compostos. O cipionato de estradiol é produzido através da esterificação do 17β -estradiol com o ácido propiônico ciclopentano, resultando em uma molécula biologicamente mais estável do que a do 17β -estradiol (VYNCKIER et al., 1990). Já o benzoato de estradiol é obtido através da esterificação do carbono 3 e possui um menor tempo de ação comparado com o cipionato de estradiol, mas ainda superior ao 17β -estradiol. Para que se atinja o efeito biológico do estrógeno no organismo, esses ésteres necessitam passar por uma hidrólise enzimática, a fim de se tornarem

a molécula do 17 β -estradiol, que é a forma biologicamente ativa do estradiol (MAPLETOFT et al., 2002).

2.4 Transferência de Embriões (TE) em equinos

Segundo Ginther (1992), a espécie equina apresentou durante muito tempo taxas de fertilidade inferiores as demais espécies domésticas, devido a características de seleção genética e problemas relacionados ao manejo reprodutivo. No entanto, o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas como a TE possibilitou aprimorar e acelerar o manejo reprodutivo em equinos, aumentando o número de potros obtidos anualmente (ARRUDA et al, 2001).

No Brasil, a técnica de TE foi primeiramente descrita por Fleury et al. (1987) e desde então ela vem sendo amplamente utilizada como ferramenta para aumentar o aproveitamento de éguas que possuem alto valor zootécnico, que estão em atividade esportiva, éguas idosas ou até mesmo daquelas que possuem subfertilidade adquirida (ARRUDA et al, 2001).

Alguns fatores importantes interferem no sucesso da recuperação embrionária e nas taxas de prenhez nos programas de TE. Entre eles podemos citar a qualidade do sêmen, a experiência do técnico, a idade e estado reprodutivo da doadora, o dia da recuperação do embrião, número de ovulações da doadora, a sincronização entre doadora e receptora, a técnica utilizada na transferência e questões envolvendo a qualidade e viabilidade do embrião, bem como seu acondicionamento durante o transporte (CUERVO-ARANGO; CLAES; STOUT, 2018b; PANZANI et al, 2014; SQUIRES; MCCUE; VANDERWALL, 1999).

Nesse contexto, vários autores (MCKINNON; SQUIRES, 2007; LOPES, 2015; VANDERWALL; WOODS, 2007) apontam a seleção da égua receptora como um dos pontos mais críticos para o sucesso de um programa de TE, já que é a receptora que irá reconhecer o embrião e será a responsável por fornecer os recursos para seu desenvolvimento (FLEURY et al., 2007). Vanderwall e Woods (2007) apontam como características de uma receptora ideal: idade entre 3 a 10 anos, bom escore corporal, bom desenvolvimento da glândula mamária e ausência de anormalidades nos ovários e útero, como tumores ovarianos e a presença de líquido, cistos, debris e ar no útero. Além disso, é importante que as receptoras tenham um comportamento dócil e, no caso das receptoras cíclicas, que apresentem ciclos estrais normais. Outro ponto importante e muitas vezes negligenciado, é a instauração de um bom manejo sanitário e nutricional para o plantel de receptoras. A oferta de um volumoso e água de qualidade, suplementação mineral, controle de

parasitas, prevenção e monitoramento de doenças infectocontagiosas são alguns cuidados básicos que ajudam a assegurar a saúde das receptoras, permitindo que elas expressem todo seu potencial reprodutivo (LOPES, 2015). O uso da ultrassonografia para acompanhar a ovulação e as mudanças uterinas na receptora é indispensável. No dia da transferência deve-se observar a presença de um corpo lúteo e a ausência de edema endometrial através do exame ultrassonográfico, e pela palpação retal deve-se avaliar o tônus uterino (SQUIRES; MCCUE; VANDERWALL, 1999).

Nos programas de TE podem ser utilizadas tanto receptoras cíclicas quanto aquelas em anestro ou transição (acíclicas), dependendo principalmente da época do ano. No caso da utilização de receptoras acíclicas, é necessário implementar protocolos hormonais para que essas éguas possam receber o embrião e manter a gestação de forma adequada (BOTELHO et al., 2015; ROCHA FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2014).

2.5 Protocolos hormonais utilizados no preparo de receptoras acíclicas

Devido a sazonalidade reprodutiva e a diferença no manejo nutricional entre doadoras e receptoras no período de transição de primavera, muitas vezes temos uma baixa disponibilidade de receptoras cíclicas no início da estação da monta (SILVA; MEIRA, 2014). Tais limitações impulsionaram a realização de diversas pesquisas utilizando protocolos hormonais com estrógenos e progestágenos em éguas receptoras acíclicas, criando uma ótima alternativa para a falta de receptoras cíclicas (SQUIRES; MCCUE; VANDERWALL, 1999).

Diversos trabalhos utilizando protocolos hormonais em éguas acíclicas foram publicados nos últimos anos, contendo diferenças marcantes entre eles, principalmente em relação ao estrógeno, como o tipo de hormônio usado, dose e frequência de aplicação (BOTELHO et al., 2015; GRECO et al., 2012; OLIVEIRA-NETO et al., 2018; ROCHA FILHO et al., 2004; ROSER et al., 2020; SEGABINAZZI et al., 2021; SILVA et al., 2017).

Rocha Filho et al (2004) compararam taxas de prenhez e morte embrionária entre receptoras cíclicas e acíclicas suplementadas com estrógeno e P4 de longa e curta ação. As éguas que estavam em anestro eram tratadas durante dois dias com CE aplicado por via intramuscular (IM) (10mg/dia) e em seguida recebiam P4 de curta ou de longa ação durante 5 a 8 dias antes da realização da transferência. Não houve diferença na taxa de gestação entre as receptoras cíclicas (75%) e aquelas em anestro (75,9%), legitimando a eficiência dos protocolos hormonais utilizados. Greco et al

(2012) também utilizaram protocolos com CE em seu trabalho, onde compararam índices de prenhez entre éguas cíclicas e acíclicas tratadas durante três dias com doses decrescentes de CE: 10 mg, 6 mg e 4 mg respectivamente, aplicados via IM. Caso fosse constatado edema endometrial após a aplicação do estrógeno, as éguas recebiam 1500mg de progesterona de longa ação (P4 LA) via IM. As taxas de prenhez das éguas cíclicas e acíclicas foram 44,12% e 57,68%, respectivamente. Mais recentemente, Roser et al. (2020) também utilizaram doses decrescentes de 10mg, 6mg e 4mg de CE seguidos da administração de P4 LA para preparar éguas acíclicas como receptoras. Os embriões foram colhidos de éguas doadoras em anestro que foram tratadas com diferentes regimes utilizando FSH equino recombinante (reFSH). O estudo foi pioneiro em apresentar sucesso na produção e TE de doadoras em anestro tratadas com reFHS, obtendo uma taxa de prenhez de 59% nas receptoras levando em consideração o número de embriões recuperados das doadoras.

O uso de BE nos protocolos hormonais para preparo de éguas receptoras acíclicas também foi descrito em alguns trabalhos. Botelho et al. (2015), ao analisar a manutenção da prenhez em éguas acíclicas em comparação com um grupo controle composto por éguas cíclicas, utilizou um regime de tratamento baseado em 3 dias de aplicação de BE, via IM, com doses consecutivas de 5mg, 3mg e 2mg, começando oito dias antes da transferência. No quinto dia que antecedia a transferência, foi aplicado 1500mg de P4 LA IM. Como resultado, foi constatada maior taxa de prenhez nas receptoras acíclicas (73%) em comparação com as cíclicas (43,3%). Silva et al. (2014) avaliaram a interrupção do fornecimento de altrenogest, uma progesterona sintética, aos 70 e aos 120 dias de gestação em éguas receptoras acíclicas, além do período de formação dos corpos lúteos suplementares e o perfil endógeno de P4 durante os primeiros 120 dias de gestação. Nesse trabalho, foi utilizado um protocolo que consistia em uma única aplicação de 2,5 mg de BE nas éguas acíclicas, e um dia depois, se constatado edema endometrial, iniciava-se o fornecimento de 33mg de altrenogest a cada 24 horas, via oral, até os 70 ou 120 dias de gestação.

Oliveira Neto et al. (2018), com o intuito de fornecer informações que otimizem a sincronização de doadoras com receptoras em programas de TE, comparou em seu trabalho resultados de protocolos hormonais em éguas em anestro, transição de primavera e em diferentes fases do ciclo estral, analisando características uterinas como edema e tônus e taxas de prenhez utilizando embriões refrigerados. Neste caso, foram utilizadas aplicações diárias consecutivas de 17βE, durante 4 dias, nas doses de 10mg, 10mg, 20 mg e 10 mg respectivamente, via IM. No dia

seguinte as éguas receberam 300 mg de altrenogest de longa ação, via IM, que foi repetida no dia da transferência. Foram feitas doses de 1500mg de P4LA semanalmente naquelas éguas com prenhez confirmada, até o 120º de gestação. Os resultados mostraram edema uterino e taxas de prenhez satisfatórias ($\geq 65\%$) em quase todos os grupos experimentais. Recentemente, Segabinazzi et al. (2021) compararam taxas de prenhez e morte embrionária entre receptoras cíclicas e acíclicas tratadas com diferentes protocolos hormonais. As éguas acíclicas foram divididas em diferentes grupos e receberam três doses consecutivas de $17\beta E$ (10mg, 20mg e 10mg). Os animais do grupo P4LA receberam uma dose única de 1500mg de P4L4 um dia após as aplicações de $17\beta E$, e a TE foi feita de quatro a oito dias após a aplicação de P4. Já as éguas do grupo IPRD receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (1g) um dia após as aplicações de $17\beta E$, que foi mantido até o momento da TE, entre quatro a oito dias após sua inserção. O Grupo RE-IPRD foi sincronizado da mesma maneira que o grupo IPRD, mas a princípio não foi utilizado para a TE e os animais foram ressincronizados de 8 a 15 dias depois, utilizando o mesmo protocolo e realizando a TE. As éguas do grupo IPRD e RE-IPRD tiveram seus dispositivos substituídos no momento da TE. Após o primeiro diagnóstico de gestação, o dispositivo de P4 foi retirado das éguas de ambos os grupos. As éguas gestantes receberam doses semanais de 1500mg de P4LA até o 120º dia de gestação. Como resultado, constatou-se que não houve diferença nas taxas de prenhez e perda embrionária entre os grupos.

3. METODOLOGIA

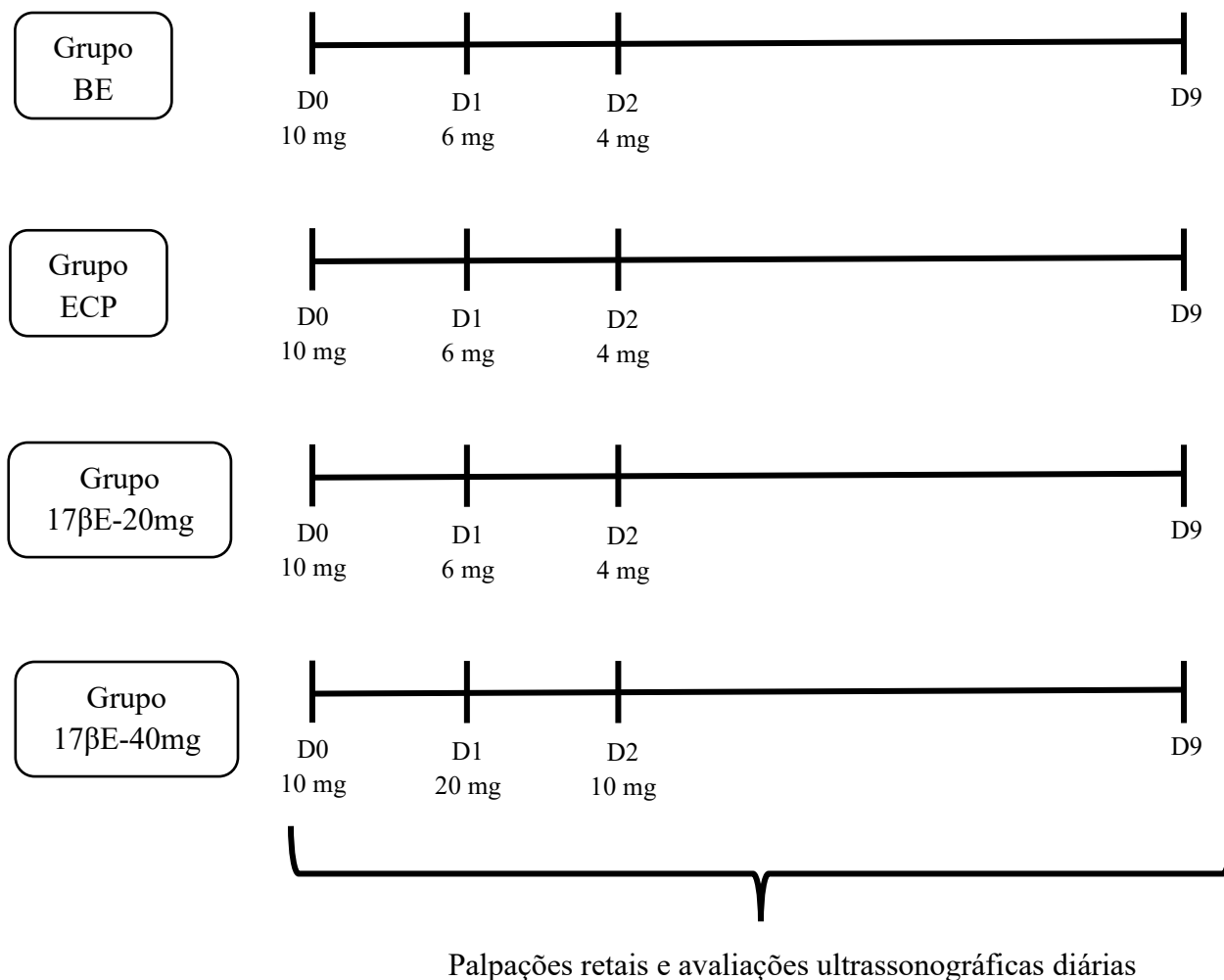
3.1 Animais

Foram utilizadas 16 éguas mestiças, com a faixa etária entre 5 e 15 anos e peso entre 350 a 450kg. As foram mantidas em pastagem Tifton (*Cynodon dactylon*) com acesso a água e sal mineralizado. O experimento foi conduzido entre julho e agosto de 2021 em um haras situado em Uberlândia – Minas Gerais – Brasil. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram realizados de acordo com a aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA – protocolo nº 003/21) da Universidade Federal de Uberlândia.

Todos os animais utilizados estavam em anestro. Para participar do experimento, cada égua foi avaliada com base em sua atividade ovariana e estado uterino. Foram selecionadas aquelas éguas que apresentaram ausência de corpo lúteo, folículos ovarianos com diâmetro menor que 20mm e ausência de edema endometrial, por pelo menos 21 dias consecutivos.

3.2 Tratamentos hormonais

As éguas selecionadas foram divididas aleatoriamente em 4 grupos de 4 animais cada: grupos BE, CE, 17 β E-20mg e 17 β E-40mg. Cada grupo foi tratado com uma dose diária de estrógeno, durante três dias. O grupo BE recebeu 3 doses de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ouro Fino), sendo 10mg no D0, 6mg no D1 e 4mg no D2. O grupo CE por sua vez recebeu 3 doses de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Zoetis), com as mesmas doses de 10mg no D0, 6mg no D1 e 4mg no D2. Os animais do grupo 17 β E-20mg receberam 3 doses de 17 β Estradiol, as mesmas 10mg no D0, 6mg no D1 e 4mg no D2. Por fim, os animais do grupo 17 β E-40mg receberam também 3 doses de 17 β Estradiol, dessa vez sendo 10mg no D0, 20mg no D1 e 10mg no D2, para avaliar os efeitos das doses recomendadas pelo fabricante (17 Beta®, Botupharma) (Figura 1). Todos os hormônios foram administrados por via intramuscular.



Fonte: o autor.

Figura 1 – Esquema das aplicações hormonais de estrógeno e avaliações ultrassonográficas nos grupos.

3.3 Palpações retais e avaliações ultrassonográficas

Foram realizadas palpações retais e avaliações ultrassonográficas em todas as éguas diariamente, começando imediatamente antes do primeiro tratamento hormonal no D0 e se estendendo até o desaparecimento do edema endometrial ou até no máximo 10 dias após a primeira aplicação. Foram avaliados os dois ovários, para monitoramento do diâmetro e crescimento

folicular, bem como o útero, para quantificação do edema uterino (Figura 2). A intensidade do edema endometrial foi classificada em escores de 0 a 4, com o acréscimo de 0.5 dependendo da intensidade, onde 0=ausência de edema uterino, 1=edema discreto, 2=edema moderado, 3=edema alto e 4=edema exagerado.

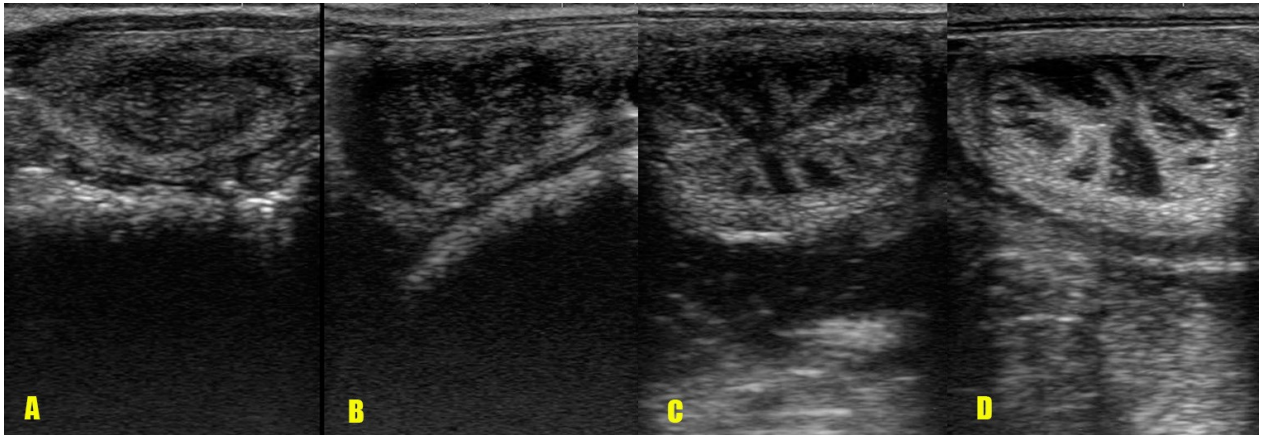


Figura 2 – Imagens ultrassonográficas de cortes transversais de cornos uterinos mostrando diferentes graus de edema endometrial.

Figura 2 – Imagens ultrassonográficas de cornos uterinos evidenciando diferentes graus de edema endometrial. A: escore 0 ou ausência de edema. B: edema endometrial classificado como 1. C: escore ou grau 2. D: grau 3.

Fonte: arquivo pessoal.

3.4 Análise estatística

Análises descritivas foram inicialmente realizadas para caracterizar os grupos experimentais. O efeito do tratamento sobre o escore de edema endometrial foi testado usando o método não paramétrico de Kruskal Wallis. Diferença estatística foi considerada quando $p < 0.05$. As análises foram feitas no programa de livre acesso R (R Core Team, 2020).

4. RESULTADOS

A mediana dos escores de edema endometrial dos quatro grupos estão representadas na Figura 3-A. Um dia após a primeira aplicação de estrógeno, os grupos CE e BE apresentaram edema endometrial escore 3, ao passo que o grupo 17 β E-40mg exibiu escore 3 dois dias após a primeira aplicação hormonal. Já o grupo 17 β E-20mg, que foi tratado com as mesmas doses de estrógeno que grupo BE e CE, não apresentou edema endometrial escore 3 em nenhum dia em que foram realizadas as avaliações ultrassonográficas, apresentando edema máximo de 2,5 dois dias após a primeira aplicação hormonal. No D5, os grupos CE e BE já apresentaram edema 2,5, à medida que no grupo 17 β E-40mg o edema se manteve com escore 3 até o D7. Já o grupo 17 β E-20mg apresentou edema escore 1 em D5 e em D7 já apresentava edema de 0,5, sendo este o último dia de avaliação ultrassonográfica neste grupo, haja visto o desaparecimento do edema. No nono dia após o início das aplicações de estrógeno, o grupo 17 β E-40mg ainda apresentava edema 2, enquanto os grupos CE e BE medianas de 1,5 e 1,25, respectivamente.

Nos grupos que foram tratados com as mesmas doses de estrógeno (BE, CE e 17 β E-20mg), o edema endometrial do grupo 17 β E-20mg reduziu e desapareceu antes, quando comparado com os demais grupos. Em D5, o grupo 17 β E-20mg já apresentava escore abaixo de 2, enquanto os grupos CE e BE apresentaram edema abaixo de 2 a partir de D7, momento em que o edema do grupo 17 β E-20mg já havia desaparecido (Figura 3-B).

Não houve diferença estatística na intensidade do edema endometrial em nenhum dos dias avaliados entre os grupos BE, CE e 17 β E-40mg ($p>0,05$). No D1, houve diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos 17 β E-20mg e BE. Já entre os grupos 17 β E-40mg e 17 β E-20mg, houve tendência a diferença estatística em D3 ($p=0,05$) e diferença significativa em todos os dias de D4 a D7 ($p<0,05$).

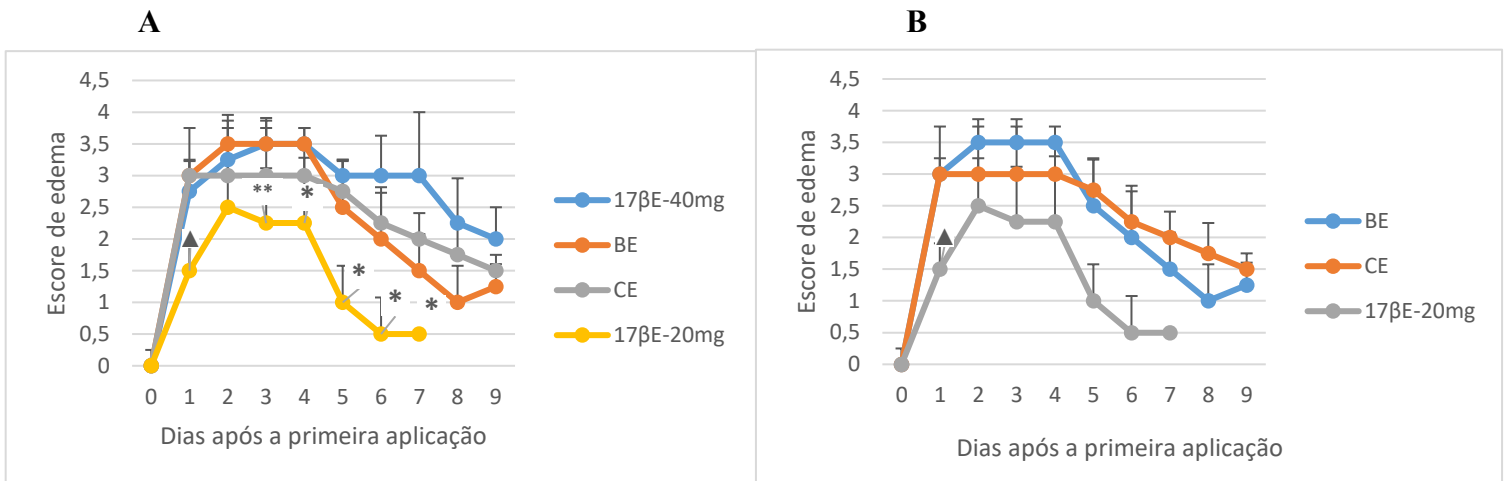


Figura 3 – Representação gráfica das medianas do escore de edema endometrial nos grupos.

A: BE, CE, 17βE-40mg e 17βE-20mg; B: BE, CE e 17βE-20mg.

Figura 3 – Representação gráfica das medianas dos escores de edema uterino (0 a 4) do dia da primeira aplicação hormonal (D0) até o D9 nos grupos: **A**: BE, que recebeu 3 aplicações de Benzoato de Estradiol em 3 dias consecutivos (10 mg, 6 mg e 4 mg); CE, que recebeu 3 aplicações de Cipionato de Estradiol nos mesmos dias consecutivos a partir do D0 (10 mg, 6 mg e 4 mg); 17βE-20mg, que recebeu 3 aplicações de 17β Estradiol em dias consecutivos a partir do D0 (10 mg, 6 mg e 4 mg) e 17βE-40mg que também recebeu 3 aplicações em dias consecutivos de 17β Estradiol, mas nas doses de 10mg, 20mg e 10 mg. **B**: nos grupos que receberam as mesmas doses de estrógeno: BE, CE e 17βE-20mg. O símbolo ▲ representa diferença estatística ($p < 0.05$) entre 17βE-20mg e BE; * representa diferença estatística ($p < 0.05$) entre 17βE-20mg e 17βE-40mg e ** representa tendência a diferença estatística entre 17βE-20mg e 17βE-40mg.

5. DISCUSSÃO

A utilização de éguas acíclicas em programas de TE aumenta o número de receptoras disponíveis, otimizando a biotécnica. Os protocolos hormonais para preparar essas receptoras incluem estrógenos e progestágenos para simular um ambiente uterino semelhante ao encontrado nas éguas receptoras cíclicas (SILVA et al., 2017). Embora a aplicação de P4 ou progestágenos já seja bem estabelecida, o regime de tratamento com estrógenos ainda é muito variável. Sendo assim, o presente trabalho visou trazer mais informações a respeito da ação dos três principais tipos de estrógenos disponíveis, ou seja, CE, BE e $17\beta\text{E}$, sobre a intensidade e duração do edema endometrial em éguas acíclicas.

Baseado nos trabalhos que evidenciam o tempo de meia-vida dos diferentes ésteres de estradiol (BE, CE e $17\beta\text{E}$) em bovinos, esperava-se que, utilizando as mesmas doses desses hormônios, o edema endometrial provocado pelo CE seria mais duradouro que BE, e pelo BE mais duradouro que $17\beta\text{E}$. No entanto, os resultados obtidos pelas avaliações ultrassonográficas do edema endometrial mostraram que não houve diferença entre os grupos BE e CE, tanto na intensidade quanto na duração do edema endometrial. Já o grupo $17\beta\text{E}$ -20mg, apresentou duração do edema endometrial inferior aos grupos BE e CE, chegando ao escore 0,5 em D7. Porém, a intensidade do edema foi significativamente menor somente em D1 quando os grupos BE e $17\beta\text{E}$ -20mg foram comparados.

Além disso, é possível afirmar que as éguas do grupo $17\beta\text{E}$ -40mg, ou seja, que receberam 10, 20 e 10 mg de $17\beta\text{E}$ por 3 dias consecutivos apresentaram edema de intensidade e duração semelhantes ao dos demais grupos. Tal resultado é contrário a hipótese inicial baseada na literatura em bovinos. Uma possível explicação para esse resultado é a maior dose de estrógeno fornecida para o grupo $17\beta\text{E}$ -40mg comparada à aplicada nos demais (10mg, 6mg, 4mg). Além disso, o veículo do 17β estradiol utilizado possivelmente contribuiu para a maior duração do edema neste grupo.

Diferente do que foi observado nos resultados do grupo $17\beta\text{E}$ -40mg, o edema endometrial provocado pelo $17\beta\text{E}$ no grupo $17\beta\text{E}$ -20mg se mostrou menos duradouro do que o edema evidenciado nos grupos CE e BE. Esses resultados se mostram mais coerentes com a hipótese inicial de que o $17\beta\text{E}$ provocaria um edema de menor duração que o CE e o BE. No entanto, é importante citar que, devido ao pequeno número de éguas disponíveis para o projeto, os animais designados para o grupo $17\beta\text{E}$ -20mg já haviam recebido estrógeno com pelo menos 10 dias de

antecedência ao início do tratamento hormonal no grupo. Mas como todas as éguas apresentavam edema 0 no início do tratamento, elas foram selecionadas para compor o grupo, mesmo que haviam recebido estrógeno 10 dias antes. Embora não acreditássemos a princípio que o tratamento com estrógeno anterior, no referido intervalo, pudesse interferir com o tratamento subsequente, a partir do resultado observado é possível que tenha causado alguma interferência na ação do estrógeno na segunda aplicação, haja visto que o grupo não atingiu o escore de edema máximo esperado. É interessante chamar a atenção para o fato de que profissionais que atuam a campo já terem relatado a observação de edema de menor intensidade ao aplicar estrógeno em éguas que já haviam recebido o hormônio previamente, em intervalo de poucos dias ou mesmo semanas.

Para excluir essa possível interferência de aplicação estrogênica prévia no grupo, o protocolo hormonal utilizando três aplicações consecutivas de $17\beta\text{E}$ nas mesmas doses de 10mg, 6mg e 4mg será repetido futuramente, com o intuito de avaliar a intensidade e duração do edema endometrial novamente. Além disso, os resultados obtidos tratam-se de resultados preliminares, é necessário aumentar o número de animais por grupo no estudo para confirmar os achados. Vale ainda ressaltar que o delineamento experimental utilizando as dosagens de 10mg, 6mg e 4mg para os grupos CE, BE e $17\beta\text{E}$ -20mg foi estabelecido pensando na dosagem da concentração plasmática de estradiol e correlação com o edema endometrial, que será realizada futuramente.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que não houve diferença na intensidade e duração do edema endometrial entre os grupos BE e CE, os quais também não foram diferentes do grupo $17\beta\text{E}$ -40mg. No entanto, o grupo $17\beta\text{E}$ -20mg apresentou edema menos duradouro quando comparado aos demais grupos, e menos intenso de D4 a D7 apenas quando comparado ao grupo $17\beta\text{E}$ -40mg. Análises futuras serão realizadas para quantificar a concentração plasmática do estradiol e correlacionar com a intensidade e duração do edema.

7. REFERÊNCIAS

ARRUDA, R. P.; VISITIN, J. A.; FLEURY, J. J.; GARCIA, A. R.; MADUREIRA, E. H.; CELEGHINI, E. C. C.; NEVES-NETO, J.R. 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.

AUPPERLE, H.; OZGEN SSSHOON, H. A.; SCOON, D.; HOPPEN, H. O.; SIEME, H.; TANNAPFEL, A. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 32(3), p. 228-232, 2000.

BERGFELT, D. R. Estrous synchronization. In: Samper, J.C. **Equine breeding management and artificial insemination**, Saunders Company, Philadelphia: p. 165-177, 2000.

BÓ, G.A.; COLAZO, M.G.; MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación em animals tratados com progestagenos y diferentes esteres de estradiol. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA – Biotecnologia da Reprodução em Bovinos**, Anais... Curitiba, PR: Editora Paraná, 2006. p.201

BOTELHO, J. H. V.; PESSOA, G. O.; ROCHA, L. G. P.; YESTE, M. 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.

BURKE, C. R.; DAY, M. L.; BUNT, C. R.; MACMILLAN, K. L. Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 1, p.145, 1 jan. 2000.

CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A. N.; RUIJTER-VILLANI, M.; STOUT, T. A. Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. **Equine Veterinary Journal**. v.50(3), p.386-390, 2018a.

CREPALDI, G.A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. 2009. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A.N.; STOUT, T.A. Effect of embryo transfer technique on the likelihood of pregnancy in the mare: a comparison of conventional and Wilsher’s forceps-assited transfer. **Veterinary Record**. 2018b.

DAELS, P. F; HUGHES, J. P. The normal estrous cycle. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febi; 1993. p. 121-32.

DAVIES MOREL, M. C. G. **Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management**. 2nd ed. CABI Publishing, 2003. p. 28.

FLEURY, J. J.; ALVARENGA, M. A.; COSTA-NETO J. B. F.; PAPA, F. O. Transferência de embriões em eqüinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.39, p. 485-487, 1987.

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

FREEDMAN, L. J; GARCIA, M. C.; GINTHER, O. J. Influence of Photoperiod and Ovaries on Seasonal Reproductive Activity in Mares. **Biology of Reproduction**. v.20, p.567-574. 1979.

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

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

HARTT, L. S.; CARLING, S. J.; JOYCE, M. M.; JOHNSON, G. A.; VANDERWALL, D. K.; OTT, T. L. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. **Reproduction**, v.130, p.241-250, 2005.

KAERCHER, F.; KOZICKI, L. E.; CAMARGO, C. E.; WEISS, R. R.; SANTOS, I. W; MURADAS; P. R.; BERTOL, M. A. F.; ABREU, R. A. Embryo Transfer in Anovulatory Recipient Mares Treated with Estradiol Benzoate and Long-Acting Progesterone. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.33, p.205-209, 2013.

LARSON, L. L.; BALL, P. J. H. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: A Review. **Theriogenology**, v. 38, p. 255-267, 1992.

LOPES, E. P. Transferência de embriões equinos: maximizando resultados com a escolha de receptoras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.39, p.223-229, 2015.

MAPLETOFT, R.J.; COLAZO, M. G.; MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P. Estrogen esters to synchronize follicular wave emergence and ovulation in CIDR-treated cattle. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION, 2002, Albuquerque, New Mexico. **Proceedings... Albuquerque: American Embryo Transfer Association**, 2002. p.27-38.

MCDOWELL, K. J.; ADAMS, M. H.; ADAM, C. Y.; SIMPSON, K. S. Changes in equine endometrial oestrogen receptor and progesterone receptor mRNAs during the oestrous cycle, early

pregnancy and after treatment with exogenous steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 135-142, 1999.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Embryo transfer and related Technologies. **Current Therapy Equine Reproduction**, p.319-334, 2007.

MELLOR, S. J.; THOMAS, E. J. Interactions between oestradiol and epidermal growth factor in endometrial stromal proliferation and differentiation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.104, p. 157-164, 1995.

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

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

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

ROSER, J. F.; ETCHARREN, M. V.; MIRAGAYA, M. H.; MUTTO, A.; COLGIN, M.; LOSINNO, L.; ROSS, P.J. Superovulation, embryo recovery, and pregnancy rates from seasonally anovulatory donor mares treated with recombinant equine FSH (reFHS). **Theriogenology**. 2020.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.; JACOMINI, J. O.; MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510–516, 2012.

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(2), p. 115, 2013.

SEGABINAZZI, L. G. T. M.; ANDRADE, L. R. P.; ALVARENGA, M. A.; DELL'AQUA, J. A.; CANISSO, I. F. Use of Intravaginal Progesterone-Releasing Device Results in Similar Pregnancy Rates and Losses to Long-Acting Progesterone to Synchronize Acyclic Embryo Recipient Mares. **Veterinary Sciences**, v. 8, p.190, 2021.

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

SILVA, E. S. M.; IGNÁCIO, F. S.; FRITSCH, S. C.; PANTOJA, J. C. F.; OLIVEIRA-FILHO, J. P.; MEIRA, C. 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.; MEIRA, C. Expressão endometrial de receptores de estradiol e progesterona em éguas cíclicas, gestantes e acíclicas tratadas com hormônios esteroidais. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n.22, 2014.

SILVA, E. S. M.; FRADE, S. C. F.; IGNÁCIO, F. S.; PANTOJA, J. C. F.; PUOLI-FILHO, J. N. P.; MEIRA, C. 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; CUERVO-ARANGO, J.; VILLANI-RUIJTER, M.; KLOSE, K.; OQUENDO, P. S.; STOUT, T. A. E. Effect of the duration of estradiol priming prior to progesterone administration on endometrial gene expression in anestrous mares. **Theriogenology**. v.131, p.96-105, 2019.

SQUIRES, E. L; MCCUE, P. M; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.51(1), p.91-104, 1999.

VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. p. 211-219, 2007.

VIANA, J. H. M. 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **IETS**, 2021. Disponível em: <https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2020.pdf>. Acesso em: 01 de março de 2022.

VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; DE KRUIF, A.; CORYN, M. Plasma estradiol-17 beta concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 beta benzoate and estradiol-17 beta cypionate--a preliminary study. **J Vet Pharmacol Ther**, v. 13, n. 1, p. 36-42, 1990.

WATSON, E. D.; SKOLNIK, S. B.; ZANECOSKY, H. Z. Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. **Theriogenology**, v.38, p. 575-580, 1992.