

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

LETÍCIA SAYURI SETOGUCHI

**EFEITO DE DIFERENTES TIPOS DE ESTRÓGENO SOBRE A
CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ESTRADIOL E O EDEMA
ENDOMETRIAL EM ÉGUAS EM ANESTRO**

UBERLÂNDIA

2022

LETÍCIA SAYURI SETOGUCHI

**EFEITO DE DIFERENTES TIPOS DE ESTRÓGENO SOBRE E A
CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ESTRADIOL E 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.

Orientador: Profa. Dra. Elisa Sant’Anna
Monteiro da Silva

UBERLÂNDIA

2022

LETÍCIA SAYURI SETOGUCHI

**EFEITO DE DIFERENTES TIPOS DE ESTRÓGENO SOBRE A
CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ESTRADIOL E 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.

Uberlândia, 2022

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Elisa Sant’Anna Monteiro da Silva - FAMEV UFU

Nome – Titulação (sigla da instituição)

Profª. Dra. Ricarda Maria dos Santos – FAMEV UFU

Nome – Titulação (sigla da instituição)

Dra. Maria Augusta Alonso

Nome – Titulação (sigla da instituição)

RESUMO

Protocolos hormonais são muito utilizados para o preparo de receptoras acíclicas, e eles diferem, principalmente, no tipo de estrógeno utilizado e sua dosagem. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de tratamento com benzoato de estradiol, cipionato de estradiol e 17β estradiol, utilizando as mesmas doses e regime de aplicação, sobre a concentração plasmática de estradiol em éguas acíclicas e sua correlação com o escore de edema endometrial. Quatorze éguas acíclicas receberam 16 tratamentos e foram divididas em 3 grupos, cada um tratado com um tipo de estrógeno, durante 3 dias. Os grupos ECP (n=5), BE (n=5) e 17β (n=6) receberam doses de 10 mg em D0, 6 mg em D1 e 4 mg em D2 de cipionato de estradiol, benzoato de estradiol e 17β estradiol, respectivamente. Foram feitas coletas de sangue em todas as éguas diariamente, imediatamente antes da realização da primeira aplicação hormonal (D0) prolongando-se até 9 dias após a primeira aplicação de estrógeno. A máxima concentração de estradiol foi atingida 24hs após a primeira aplicação de estrógeno no grupo BE, sendo significativamente maior em relação aos outros grupos de tratamento ($P < 0,0001$). No entanto apresentou uma queda expressiva dois dias após o pico. No grupo CE o pico foi atingido 48hs após a primeira aplicação de estrógeno, corroborando com estudos prévios em bovinos. O grupo 17β não apresentou crescimento expressivo da concentração plasmática de estradiol, contudo, pode ser que o pico tenha acontecido antes das avaliações realizadas. As correlações entre edema endometrial e concentrações plasmáticas são positivas, porém moderadas em BE e CE e fraca em 17β . Conclui-se o grupo que atingiu a maior concentração plasmática de estradiol foi o grupo BE, em D1. No grupo CE, o pico foi atingido apenas em D2. O grupo 17β não apresentou crescimento expressivo da concentração plasmática de estradiol. As correlações entre edema endometrial e concentrações plasmáticas foram positivas moderadas e fracas.

Palavras-chave: tratamento hormonal; estradiol; éguas acíclicas.

ABSTRACT

Hormonal protocols are widely used for the preparation of acyclic receptors, and they differ mainly in the type of estrogen used and its dosage. In this sense, the present study aimed to evaluate the effect of treatment with estradiol benzoate, estradiol cypionate and 17 β estradiol, using the same doses and application regimen, on the plasma concentration of estradiol in acyclic mares and its correlation with the score of endometrial edema. Fourteen acyclic mares received 16 treatments and were divided into 3 groups, each treated with one type of estrogen, for 3 days. The ECP (n=5), BE (n=5) and 17 β (n=6) groups received doses of 10 mg on D0, 6 mg on D1 and 4 mg on D2 of estradiol cypionate, estradiol benzoate and estradiol 17 β , respectively. Blood samples were taken from all mares daily, immediately before the first hormonal application (D0) and lasting up to 9 days after the first estrogen application. The maximum estradiol concentration was reached 24 hours after the first estrogen application in the BE group, being significantly higher in relation to the other treatment groups ($P < 0.0001$). However, it showed a significant drop two days after the peak. In the EC group, the peak was reached 48 hours after the first estrogen application, corroborating previous studies in cattle. The 17 β group did not show a significant increase in plasma estradiol concentration, however, it may be that the peak occurred before the evaluations performed. Correlations between endometrial edema and plasma concentrations are positive, but moderate in BE and EC and weak in 17 β . In conclusion, the group that reached the highest plasma concentration of estradiol was the BE group, on D1. In the CE group, the peak was reached only on D2. The 17 β group did not show a significant increase in plasma estradiol concentration. Correlations between endometrial edema and plasma concentrations were moderate to weak positive.

Keywords: hormonal treatment; oestradiol; non-cyclic mares.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Sazonalidade reprodutiva.....	7
2.2 Ciclo estral e produção de estrógeno e progesterona.....	8
2.3 Estradiol e seus ésteres.....	8
2.5 Perfil plasmático de estradiol em éguas em estro e anestro.....	9
2.6 Protocolos hormonais utilizados no preparo de receptoras acíclicas.....	11
3. METODOLOGIA.....	15
3.1 Animais.....	15
3.2 Tratamentos hormonais	15
3.3 Colheita de sangue.....	15
3.4 Palpações retais e avaliações ultrassonográficas	16
3.5 Análise estatística.....	16
4 RESULTADOS.....	17
5 DISCUSSÃO	20
6 CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) é uma biotecnologia reprodutiva muito utilizada em vários países e permite o melhor aproveitamento dos animais e seu incremento genético a fim de otimizar a obtenção de potros (ARRUDA et al. 2011; SQUIRES, 2013), sendo possível gerar produtos de éguas idosas, subférteis ou que estejam em atividade esportiva e, portanto, impossibilitadas de levar uma gestação a termo (ARRUDA et al., 2001; CAMPBELL, 2014; DAELS, 2007; HURTTGEN, 2008). Segundo Viana (2021), o Brasil é o maior produtor de embriões *in vivo* do mundo, com 38.762 lavados uterinos e 21.954 embriões transferidos no ano de 2020.

A seleção da receptora é considerada o elemento determinante para o êxito da TE (MCKINNON; SQUIRES, 2007; VANDERWALL; WOODS, 2007). O comportamento sazonal reprodutivo das éguas e as diferenças de manejo entre doadoras e receptoras limitam o número de receptoras cíclicas disponíveis ao longo do ano, sendo assim o uso de receptoras acíclicas, tanto em anestro quanto em transição, é uma alternativa para o programa de TE (SQUIRES et al., 1999). Para isso, é necessário a utilização de protocolos hormonais para prepará-las para o recebimento do embrião e manutenção da gestação (BOTELHO et al., 2015; ROCHA FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2014; SQUIRES, 1999).

Inúmeros estudos demonstram a eficácia dos protocolos hormonais em receptoras acíclicas, e estes consistem primeiramente, na administração de estrógeno e, posteriormente, de progestágenos. Eles diferem, principalmente, no tipo de estrógeno exógeno utilizado (cipionato de estradiol, benzoato de estradiol e 17 β estradiol), assim como sua dose e frequência de aplicações (BOTELHO et al., 2015; GRECO et al., 2012; OLIVEIRA NETO et al., 2018; ROCHA FILHO et al., 2004; ROSER et al., 2020; SILVA et al., 2014; 2016; 2017). Alguns trabalhos conduzidos em vacas demonstram diferenças farmacocinéticas entre esses ésteres de estradiol, e apontam que eles apresentam tempos de meia-vida distintos. O cipionato de estradiol possui maior tempo de meia-vida que o benzoato de estradiol, que por sua vez apresenta maior tempo de meia-vida que o 17 β estradiol (BURKE et al., 2000; LARSON; BALL, 1992; SALES et al., 2012). Contudo, não há estudos que avaliem essas características em éguas, e ainda faltam dados que esclareçam qual a melhor dose, tipo de hormônio a ser utilizado e tempo de tratamento. Considerando as informações expostas acima, hipotetizamos que a concentração plasmática de estradiol após a administração do cipionato de estradiol possa permanecer alta por mais tempo do que as concentrações plasmáticas de estradiol induzidas pelo benzoato de estradiol e pelo 17 β estradiol, baseado nos tempos de meia-vida anteriormente

relatados sobre esses hormônios.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de tratamento com benzoato de estradiol, cipionato de estradiol ou 17β estradiol, utilizando as mesmas doses e regime de aplicação, sobre a concentração plasmática de estradiol em éguas acíclicas e sua correlação com o escore de edema endometrial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sazonalidade reprodutiva

O comportamento reprodutivo da égua é caracterizado como poliéstrico estacional, sendo que o seu ciclo estral tem início em períodos de maior luminosidade diária (FREEDMAN et al., 1979). Isso se deve às suas características fotossensíveis, envolvendo o sistema neuro-endócrino-gonadal (FITZGERALD, 2000). De acordo com Ginther et al. (2004a), pode-se dividir o ciclo reprodutivo em quatro fases: anestro, transição de primavera, ovulatória e transição de outono.

O comprimento do dia é percebido pela glândula pineal através dos olhos (GINTHER, 1992). Esta produz o hormônio melatonina, sintetizado e secretado em maiores quantidades durante o período de menor incidência de luz, ou seja, nos meses de outono e inverno, inibindo a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano (SHARP, 1980). Com isso, não há liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo, levando a uma atividade folicular mínima ou ausente na fase caracterizada como anestro (GINTHER, 1992).

Na fase de transição de primavera é possível observar maior atividade ovariana, com aumento de folículos com diâmetro maior que 15 mm e desenvolvimento de um folículo dominante de 20 a 30 mm de diâmetro, sendo este de uma onda folicular anovulatória devido às baixas concentrações do hormônio luteinizante (LH) sistêmico nesse período (AURICH, 2011).

Conforme os dias tornam-se mais longos e ocorre a maior estimulação luminosa, como em meses do final de primavera e verão, é removida a inibição do eixo havendo liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), aumento de hormônio folículo estimulante (FSH) e conseguinte aumento nas concentrações de LH, permitindo que ocorra a dinâmica ovariana que leva à ovulação (FITZGERALD et al., 1987; NAGY, 2000). Nessa fase ovulatória ocorrerão ciclos ovulatórios espontâneos (MOREL, 2003).

Quando ocorre o último ciclo ovulatório, o estímulo gonadotrófico cai

consideravelmente e as concentrações de FSH e LH são baixas, levando ao desenvolvimento folicular inadequado. Esse período é caracterizado como transição de outono, que caminha para a aciclicidade da égua vista no período de anestro (AURICH, 2011). Além do fotoperíodo outros fatores são importantes para definir a sazonalidade reprodutiva, como plano nutricional, condição corporal, idade (GINTHER, 1994; MOREL, et al., 2010), raça, temperatura ambiental, questões individuais e latitude (MOREL, et al. 2010). Éguas situadas mais próximas à linha do Equador tendem a ter menor oscilação estacional, por exemplo, sofrendo menos interferências a latitude, e mais com a nutrição (HUGHES et al., 1972; MOREL, 2003).

2.2 Ciclo estral e produção de estrógeno e progesterona

Define-se o ciclo estral como o intervalo entre duas ovulações sucessivas e sua duração média é de 21 dias (BELFERG, 2000). Segundo Ginther (1992), o ciclo estral é dividido em duas fases diferenciadas: estro ou fase folicular e diestro ou fase luteal, que são caracterizadas por diversas variações nos órgãos do sistema reprodutivo e por alterações comportamentais (AURICH, 2011; CROWELL, 2007).

O estro, ou fase folicular, tem duração média de 5 a 7 dias e é marcado pela presença de folículos pré-ovulatórios e aumento da secreção de estrógeno pelos mesmos, sendo o principal o 17- β Estradiol (MOREL, 2003; SATUÉ; GARDÓN, 2013). O estrógeno é o hormônio responsável pelo comportamento de estro expressado pelas éguas nessa fase, como por exemplo o desvio de cauda, exposição da região perineal, micções frequentes com pequenas quantidades de urina e receptividade ao garanhão (CROWELL, 2007). Este também provoca aumento de vascularização uterina e consequente extravasamento de líquido para o interstício, causando o edema endometrial (BELGFERT, 2000; SATUÉ; GARDÓN, 2013). Essa alteração uterina facilita o transporte de espermatozoides para a tuba uterina e a conseguinte fertilização do oócito (BELGFERT, 2000; CROWELL 2007; SATUÉ; GARDÓN, 2013). Ademais, vários estudos feitos em éguas cíclicas mostram que o estradiol estimula a expressão de seus próprios receptores e receptores de progesterona (P4) no endométrio (AUPPERLE, 2000; HARTT et al., 2005; MCDOWELL et al., 1999; WATSON et al., 1992). Cuervo Arango et al. (2018) demonstram em um estudo em receptoras cíclicas que houve maior taxa de prenhez naquelas que apresentaram maior tempo de estro anteriormente à ovulação. Nesse sentido, Silva et. al (2019) realizaram um estudo em éguas acíclicas que mostrou que a maior exposição do útero ao estradiol previamente a progesterona aumenta a expressão de uterocalina, uma proteína responsável pela nutrição do embrião na fase inicial de vida.

O encerramento do estro se dá logo após a ovulação e formação do corpo lúteo,

caracterizando a fase de diestro, que possui duração média de 14-15 dias. As células da granulosa do folículo que na fase estral antes produziam estrógeno, se tornam células luteais, produzindo P4 (SATUÉ; GARDÓN, 2013). As altas concentrações de P4 são responsáveis pela preparação do endométrio para manter a gestação, estimulação de produção de histotrofo pelas glândulas endometriais e inibição de contratilidade miometral (VANDERWALL, 2011). Além disso, esse hormônio é o responsável por cessar os comportamentos de cio e o edema uterino presentes na fase estral (CROWELL 2007; SATUÉ; GARDÓN, 2013). Nos dias 13 a 16 de diestro, se não houver reconhecimento materno gestacional, há o que se chama de luteólise funcional, que é caracterizada pela diminuição na produção de P4 pelo corpo lúteo primário e posterior luteólise estrutural com a regressão e desintegração dele. Esses fenômenos são desencadeados pela prostaglandina F2alfa (PGF2 α) endometrial e permitem com que se inicie uma nova fase folicular (BAG, 2011; DAELS; HUGHES, 1993; GINTHER, 2011, 2012.)

2.3 Estradiol e seus ésteres

Os estrógenos são esteroides compostos por 18 átomos de carbono, um anel fenólico A, responsável pela ligação e seletividade em seus receptores, e um anel fenólico D. Seus principais compostos são o 17 β -estradiol, a estrona e o estriol, sendo o 17 β o mais potente em animais e em humanos (MAPLETOFT et al., 2002; VYNCKIER, 1990). O local principal de produção é o ovário, porém também é produzido pela glândula adrenal e pela placenta (CREPALDI, 2009). Os estrógenos se distribuem por todo o organismo e tem como característica a deposição em tecido adiposo. O fígado é responsável por sua metabolização, e a sua excreção é feita pela urina e pela bile, onde a maior parte passa por reabsorção no intestino (MAPLETOFT et al., 2002).

Os ésteres de estradiol são formados a partir da esterificação do 17 β -hidroxil do 17 β -estradiol, permitindo maior prolongamento do efeito pela resistência adquirida pela molécula em relação ao seu metabolismo. A meia-vida de cada um dos compostos depende da polaridade da molécula, relacionada com o seu tamanho (MAPLETOFT et al., 2002), além da presença dos anéis aromáticos e a simetria das ligações (CREPALDI, 2009).

O cipionato de estradiol é formado a partir da esterificação do estradiol com ácido ciclopentano propiônico e possui um efeito prolongado em relação ao 17 β -estradiol e ao benzoato de estradiol. Já o benzoato de estradiol é formado a partir da esterificação do carbono 3 e possui um efeito mais curto em relação ao cipionato de estradiol (MAPLETOFT et al.,

2002), contudo, ainda maior que o do 17β -estradiol, uma vez que este não precisa passar por metabolização e transformação para sua forma biologicamente ativa (LARSON, BALL, 1992).

2.4 Perfil plasmático de estradiol em éguas em estro e anestro

Diversos autores conduziram estudos sobre o perfil hormonal em éguas cíclicas em períodos de estro e éguas acíclicas em períodos de anestro e de transição. Durante a fase de anestro e transição de outono os níveis de estradiol circulantes são extremamente baixos (DONADEU; GINTHER, 2002), sendo a concentração plasmática deste hormônio considerada basal, ou seja, abaixo de 2pg/ml (PYCOCK, 1995), em razão da diminuição ou ausência de atividade ovariana nesses períodos. Em fase final de períodos de transição, concomitante ao desenvolvimento dos grandes folículos, ocorre o aumento das concentrações plasmáticas de estradiol (FREEDMAN et al., 1979; OXENDER et al., 1977; SEAMANS; SHARP, 1982), podendo chegar a 6,6 +/- 1,1 pg/ml em transição de primavera (WATSON et al., 2002).

No período de estro, a secreção ativa pelos folículos pré-ovulatórios começa a aumentar a concentração plasmática de 17β estradiol cinco a sete dias antes da ovulação (SATUE; GARDON, 2013), atingindo o pico (10-15pg/ml) dois dias antes do início do diestro (D-2) (AMER et al., 2008; AUPPERLE et al., 2000; GASTAL, 2009; GINTHER et al., 2008). Um dia previamente à ovulação os níveis de estradiol começam a decrescer gradualmente, alcançando os níveis basais cinco dias pós ovulação (D5) (BELGFERT et al., 2001; GINTHER et al., 2004b, 2004c; SATUÉ, 2013).

2.6 Protocolos hormonais utilizados no preparo de receptoras acíclicas

O comportamento sazonal reprodutivo das éguas e as diferenças de manejo entre doadoras e receptoras limitam o número de receptoras cíclicas disponíveis ao longo do ano, sendo assim, o uso de receptoras acíclicas, tanto em anestro quanto em transição, uma alternativa para programas de TE (SQUIRES et al., 1999). Os protocolos hormonais em receptoras acíclicas consistem, primeiramente, na administração de estrógeno e, posteriormente, na administração de progestágenos. O estrógeno mimetiza as condições hormonais de estro encontradas nas éguas cíclicas (AUPPERLE et al. 2000; MCKINNON et al., 2000; MCDOWELL, et al., 1997; ZAVY et al., 1979), e os progestágenos possuem competência para ligarem-se aos receptores de P4 expressos no endométrio, mimetizando as condições hormonais encontradas no diestro de éguas cíclicas (DANTE et al., 2013).

Alguns estudos publicados nos últimos anos abrangem diferentes tipos de protocolos

hormonais em éguas acíclicas, variando entre si, principalmente, o tipo de estrógeno exógeno utilizado, assim como sua dose e frequência de aplicações (BOTELHO et al., 2015; GRECO et al., 2012; OLIVEIRA NETO et al., 2018; ROCHA FILHO et al., 2004; ROSER et al., 2020; SILVA et al., 2014; 2016; 2017; 2021; SEGABINAZZI et al., 2021).

Para comparar taxas de prenhez e morte embrionária entre receptoras cíclicas e acíclicas, Rocha Filho et al. (2004) usaram quatro protocolos diferentes, nos quais eram utilizadas doses únicas de cipionato de estradiol (10mg) a cada 24 horas aplicado via intramuscular (IM), diferindo apenas os progestágenos de longa e curta duração durante 5 a 8 dias antes da TE. Ambos os tipos de progesterona mostraram bons resultados em preparar as receptoras acíclicas e não foi encontrada diferença entre a taxa de gestação entre elas (75,9%) e as éguas cíclicas (75%), comprovando o sucesso na utilização desses regimes hormonais.

Em um outro estudo comparativo entre receptoras cíclicas e as acíclicas, Greco et al. (2012) observaram como taxa de prenhez 44,12% e 57,68%, respectivamente, utilizando doses decrescentes de cipionato de estradiol (10, 6 e 4 mg) uma vez ao dia, e após verificação de edema foi feita a aplicação de 1500 mg de progesterona (P4LA) de longa duração, via IM. Seguindo o mesmo protocolo para éguas receptoras anovulatórias, Roser et al. (2020) conduziram um trabalho em que também utilizaram o cipionato de estradiol como fonte exógena de estrógeno, porém com aplicação de 1500mg de progesterona depois de observado 3 dias de edema endometrial, ou seja, no quarto dia do protocolo. Os embriões foram transferidos para as receptoras entre o terceiro e sexto dia após a injeção de P4LA, que foram tratadas com o mesmo hormônio no dia da transferência e a cada 10 dias até os 100 dias de gestação. Neste estudo, eles obtiveram uma taxa de gestação de 59%.

Silva et al. (2014) analisaram a interrupção do fornecimento de progesterona sintética (altrenogest) via oral (VO) aos 70 e aos 120 dias de gestação em receptoras acíclicas, assim como período de formação de corpo lúteo suplementar e perfil de P4 durante os primeiros 120 dias de gestação. O protocolo utilizou como fonte exógena de estrógeno o benzoato de estradiol (BE), em dose única de 2,5 mg. Um dia após, as éguas foram examinadas por ultrassonografia e se confirmado o edema uterino eram suplementadas com 33 mg de altrenogest, VO, a cada 24 horas, até os 70 ou 120 dias gestacionais. Em 2015, Botelho et al. também utilizaram o BE como fonte exógena de estrógeno em seus protocolos para comparar as taxas gestacionais entre éguas cíclicas e acíclicas, como feito em vários trabalhos supracitados. O regime de tratamento consistia em três dias de aplicação de BE, via IM, com doses consecutivas de 5, 3 e 2 mg, começando oito dias antes da TE. Cinco dias antes da TE foi feita a aplicação de 1500 mg de progesterona de longa ação (P4LA), IM. Obtiveram como resultado maior taxa de prenhez em receptoras acíclicas (73%) do que em cíclicas (43,3%). Outros estudos realizados utilizando o

benzoato de estradiol como fonte de estrógeno em diferentes protocolos (dose, regime de tratamento e fonte exógena de P4) nos mostraram que, as máximas concentrações de estradiol foram atingidas 24hs após a primeira dose de BE e atingiu edema máximo esperado (SILVA et al., 2016; 2017; 2021).

O uso de 17β estradiol como fonte exógena de estrógeno foi descrito no trabalho feito por Oliveira Neto et al. (2018), que com o intuito de otimizar a sincronização de doadoras com receptoras em programas de TE, compararam os resultados da utilização do protocolo em éguas em anestro, transição de primavera e em diferentes fases do ciclo estral, levando em consideração o edema uterino e taxas de prenhez utilizando embriões refrigerados. Foram feitas aplicações diárias consecutivas de 17β estradiol, durante 3 dias, nas doses de 10mg, 20mg e 10mg, respectivamente, via IM, e no dia seguinte a aplicação de 300mg de P4LA, via IM, repetida no dia da transferência e mantida semanalmente nas éguas com prenhez confirmada, estendendo-se até 120 dias de gestação. Observaram edema uterino e taxas de prenhez satisfatórias ($\geq 65\%$) em quase todos os grupos experimentais. Segabinazzi et al. (2021) utilizaram diferentes protocolos hormonais para comparar taxas de prenhez e morte embrionária entre receptoras cíclicas e acíclicas. As éguas acíclicas receberam três doses consecutivas de 17β estradiol, 10mg, 20mg e 10mg e foram divididas em diferentes grupos: grupo que apenas diferiam no regime de tratamento e tipo de progesterona usados. As éguas do trabalho que confirmaram prenhez receberam 1500mg de P4LA semanalmente até o 120º dia de gestação. Não houve diferença entre os grupos na taxa de prenhez e perda embrionária, reafirmando o sucesso desses protocolos no preparo de receptoras acíclicas.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizadas 14 éguas mestiças, com a faixa etária entre 5 e 15 anos e peso entre 350 a 450kg. As éguas foram mantidas em pastagem Tifton (*Cynodon dactylon*) com acesso a água e sal mineralizado. O experimento foi realizado 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) da Universidade Federal de Uberlândia (nº 003/21).

Todos os animais que foram utilizados estavam em anestro. Para participar do experimento, cada égua foi avaliada com base em sua atividade ovariana e condição uterina. Foram selecionadas aquelas que apresentarem ausência de corpo lúteo, de edema endometrial

e folículos ovarianos ≤ 20 mm, por pelo menos 21 dias consecutivos.

3.2 Tratamentos hormonais

Foram realizados 16 tratamentos sendo as 14 éguas divididas aleatoriamente em 3 grupos: BE (n=5), que recebeu benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ouro Fino, Brasil); CE (n=5), em que foi administrado cipionato de estradiol (E.C.P®, Zoetis, Brasil); e 17 β (n=6), que recebeu 17 β estradiol (17 beta®, Botupharma, Brasil). Os animais dos grupos BE, CE e 17 β foram tratados, durante 3 dias consecutivos, com as mesmas doses de 10, 6 e 4 mg dos respectivos tipos de estrógeno. Todos os hormônios foram administrados por via intramuscular.

3.3 Colheita de sangue e dosagem de estradiol

As amostras de sangue foram obtidas por venopunção da veia jugular em tubos com EDTA, coletadas diariamente, imediatamente antes da primeira aplicação hormonal (D0) estendendo-se até o desaparecimento do edema endometrial ou no máximo 9 dias após a primeira aplicação. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas (900 X g/10min) e o plasma foi armazenado em freezer a -20°C até o momento da realização da dosagem de estradiol plasmático, que foi feita através da técnica de radioimunoensaio. Foram utilizados kits comerciais para determinar as concentrações de 17 β - estradiol (Ultra-Sensitive Estradiol RIA – Beckman Coulter, Prague 10, Republica Tcheca). A sensibilidade do ensaio foi de 0,48 pg/ml e o coeficiente de variação foram 8,60% para controle alto e 10,72% para controle baixo. As dosagens foram realizadas no laboratório de endocrinologia da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP – Araçatuba), sob coordenação do Prof. Guilherme de Paula Nogueira.

3.4 Palpações retais e avaliações ultrassonográficas

Em todas as éguas foram realizadas palpações retais e avaliações ultrassonográficas diariamente, começando imediatamente antes do primeiro tratamento hormonal no D0 e se estendendo até o desaparecimento do edema ou até no máximo 9 dias após a primeira aplicação de estrógeno. Durante essas avaliações foram observados os dois ovários, para monitoramento do diâmetro e crescimento folicular, bem como o útero, para quantificação do edema uterino. A intensidade do edema endometrial foi classificado em um escore 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.

3.5 Análise estatística

Os dados de concentração hormonal do 17- β estradiol foram analisados por um modelo linear geral de variância com medidas repetidas. Os testes de Kruskal Wallis seguido pelo de Mann Whitney foram utilizados para comparar o escore de edema endometrial entre os grupos. O teste de correlação de Spearman's foi usado para analisar a correlação entre as concentrações de estradiol e o escore de edema endometrial. Considerou-se diferença estatística quando $p \leq 0,05$.

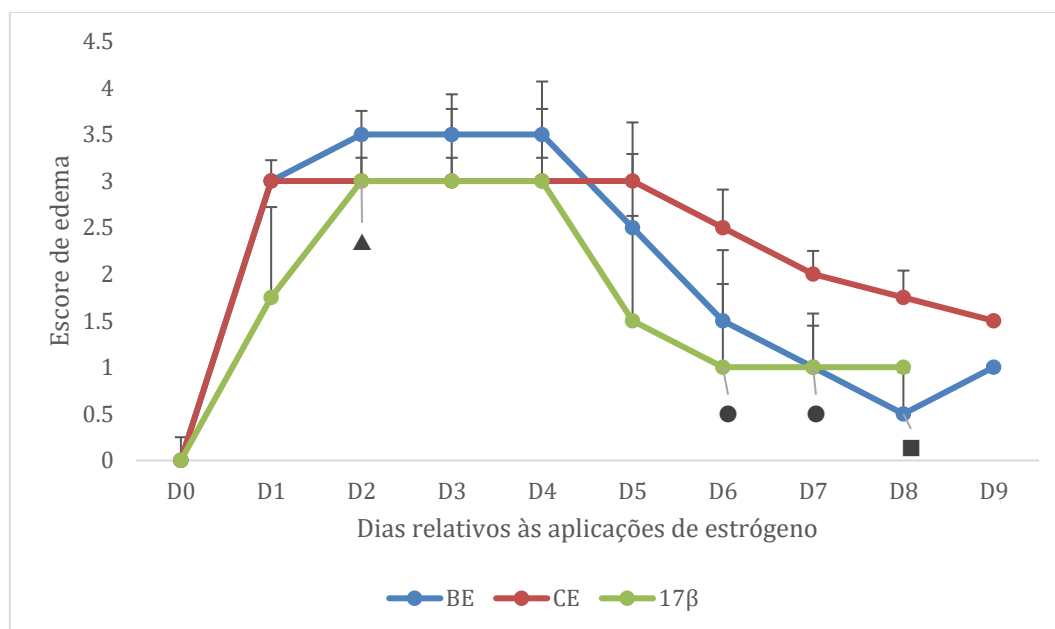
4 RESULTADOS

4.1 Edema uterino

A mediana dos escores de edema endometrial dos três grupos encontram-se na Figura 1. Os grupos BE e CE atingiram edema 3 um dia após a primeira aplicação de estradiol. No entanto, o grupo 17 β apenas atingiu edema 3 dois dias após a primeira aplicação de estrógeno. No grupo BE foi possível observar o aumento do escore no D2, que se manteve em 3,5 até o D4. O grupo CE manteve o escore em grau 3 por mais tempo que os grupos BE e 17 β , até o D5, quando então houve uma diminuição gradativa, atingindo grau 1,5 no último dia de avaliação ultrassonográfica (D9). Nos grupos BE e 17 β o edema começou a diminuir em D4, sendo classificados como grau 1 em ambos os grupos nos seus últimos dias de avaliação.

Foi possível observar diferença estatística entre os grupos 17 β e BE no D2, assim como em D6 e D7 entre 17 β e CE e em D8 entre BE e CE. Não houve diferença estatística em nenhum dos outros dias comparados entre os diferentes grupos.

FIGURA 1 – Mediana dos escores de edema nos grupos BE, CE e 17 β .



Representação gráfica das medianas do escore de edema endometrial nos grupos BE, CE e 17 β . Cada grupo recebeu as mesmas doses de 10mg, 6mg e 4mg, de benzoato de estradiol, cipionato de estradiol e 17 β estradiol, nos dias D0, D1 e D2, respectivamente. O símbolo \blacktriangle representa diferença estatística entre 17 β e BE; \bullet representa diferença estatística entre CE e 17 β e \blacksquare representa diferença entre CE e BE.

Fonte: A autora.

4.2 Concentrações plasmáticas de estradiol

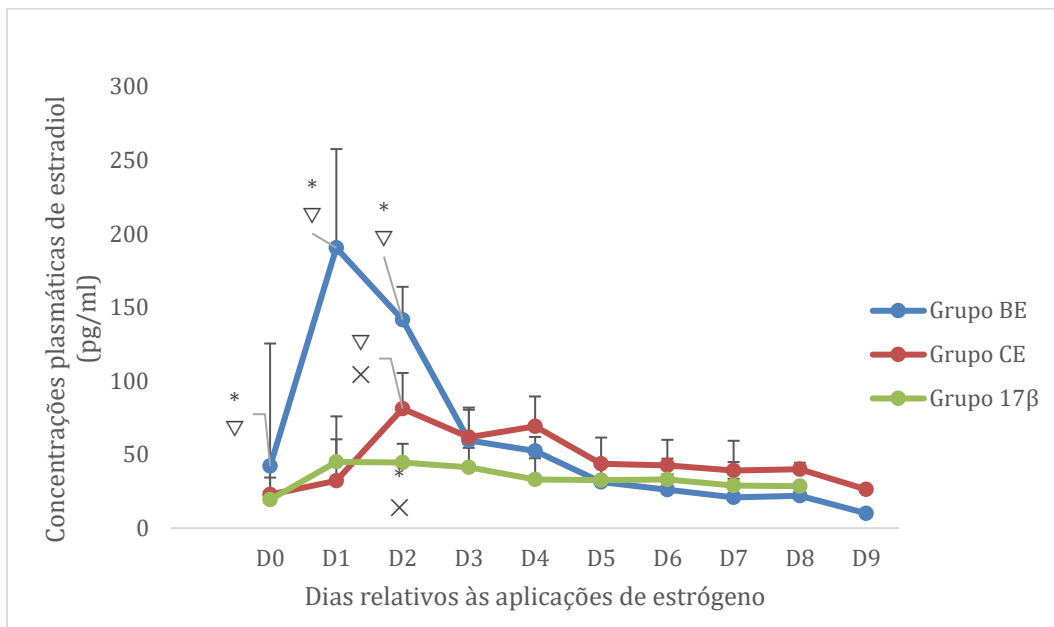
As médias das concentrações plasmáticas de estradiol dos três grupos encontram-se na Figura 2. As concentrações máximas de E2 foram observadas um dia após a aplicação de estrógeno no grupo BE, que apresentou pico médio de 190 pg/ml, representando um aumento de 4,5 vezes em relação a concentração inicial no D0. No grupo 17 β , a média da concentração máxima, também foi observada no D1 (44,99 pg/mL), o qual representou um aumento de 2,3 vezes em relação à D0. Já no grupo CE, as concentrações máximas foram observadas apenas em D2, 48h após a primeira aplicação de estrógeno, e as concentrações aumentaram em 3,5 vezes entre D0 e o dia do pico.

No grupo BE, após o pico atingido, houve queda na concentração plasmática de E2 até D3 (59,50 pg/ml), depois uma queda gradual de D3 a D9. Dentre os grupos, foi o que atingiu menores valores a partir de D5. No grupo CE, a concentração começou a diminuir em D4, e no grupo 17 β a concentração de estradiol já começou a decrescer de modo gradual desde D2.

Uma égua do grupo CE apresentou como resultados em D0 concentrações de estradiol elevadas (197,61 pg/mL), seguindo de concentrações mais baixas em D1 e D2. A égua apresentava inatividade ovariana e ausência de edema endometrial, característicos de anestro. Por não se saber se houve contaminação cruzada entre amostras, com medicamento durante a colheita sanguínea naquele dia específico, ou alguma troca durante a quantificação hormonal, a égua foi retirada das análises.

Observou-se diferença ($P < 0,0001$) em D0 e D1 quando BE foi comparado aos outros grupos e em D2 entre os três grupos tratados grupos. Com relação a diferença entre um mesmo grupo nos diferentes dias, foi possível observá-la entre D0 e D1 e D0 e D2 no grupo BE e no grupo CE em D2 e D3 comparado ao resto dos dias de tratamento ($P < 0,0001$). No grupo 17 β não se observou diferença estatística entre os diferentes dias de tratamento.

FIGURA 2 – Média das concentrações plasmáticas de estradiol nos grupos BE, CE e 17 β .

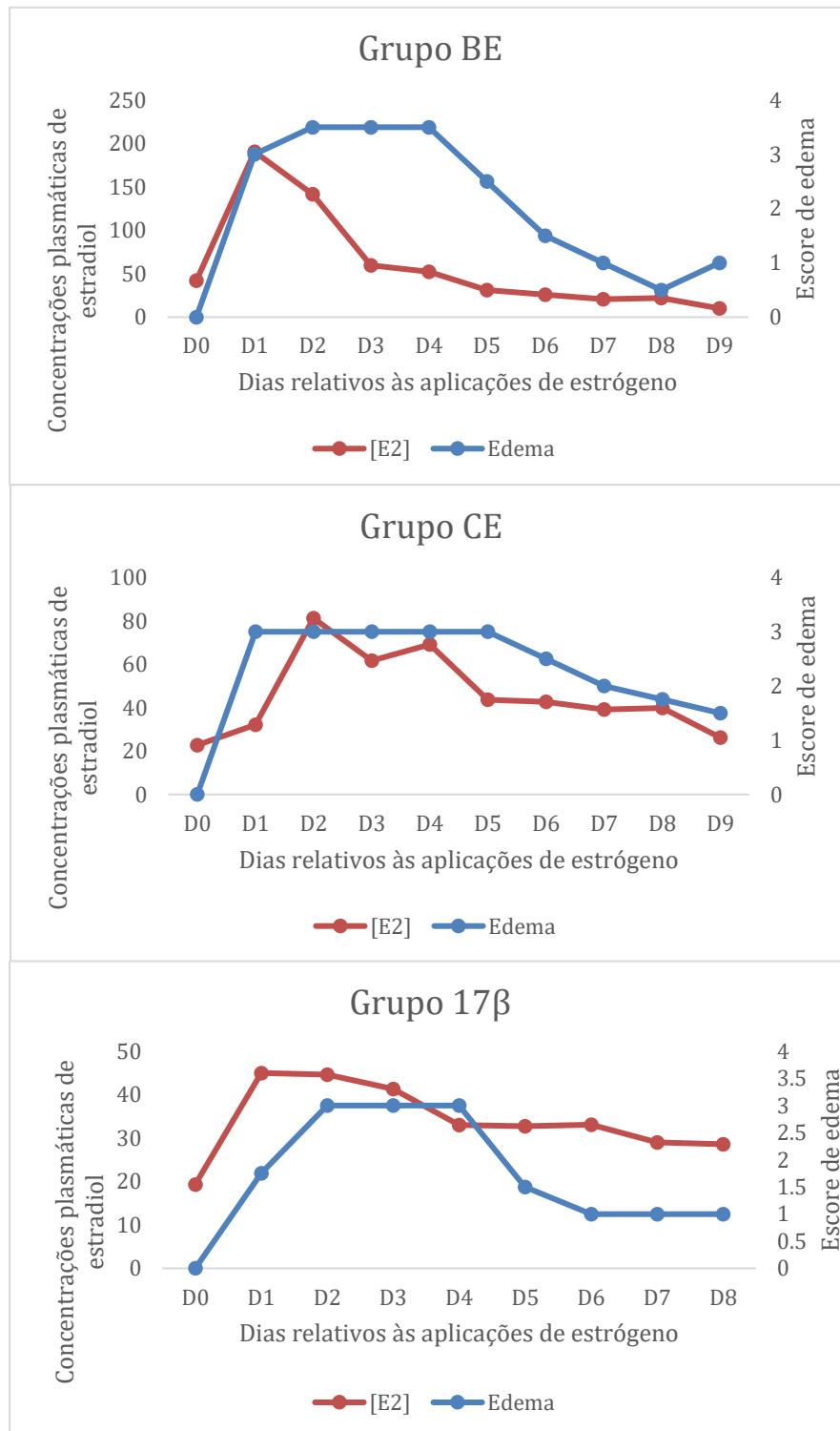


Representação gráfica das médias da concentração plasmática de estradiol nos grupos BE, CE e 17 β . Cada grupo recebeu três aplicações em três dias consecutivos de doses decrescentes (10mg, 6mg e 4mg) de benzoato de estradiol, cipionato de estradiol e 17 β estradiol, respectivamente. O símbolo ∇ representa diferença estatística entre BE e CE; * representa diferença estatística entre BE e 17 β e \times representa diferença entre CE e 17 β .

Fonte: A autora.

A correlação entre concentrações plasmáticas de estradiol e escore de edema foi positiva nos três grupos. Nos grupos BE e CE, os coeficientes de correlação (r) foram considerados moderados (BE: $r = 0,47$, $P < 0,001$; e CE: $r = 0,45$, $P < 0,001$) e no grupo 17 β a correlação foi considerada fraca ($r = 0,39$, $P < 0,001$). A comparação entre o perfil da mediana do edema endometrial e médias das concentrações plasmáticas de estradiol nos três grupos de tratamento, BE, CE e 17 β encontram-se na Figura 3.

FIGURA 3 – Comparação entre o perfil da mediana do edema endometrial e médias das concentrações plasmáticas de estradiol nos grupos BE, CE e 17β .



Comparação entre o perfil da mediana do edema endometrial e médias das concentrações plasmáticas de estradiol nos três grupos de tratamento, BE, CE e 17β .

Fonte: A autora.

5 DISCUSSÃO

O uso de receptoras acíclicas tem se mostrado cada vez mais necessário para a otimização dos programas de transferência de embriões em éguas, tendo em vista que a disponibilidade de receptoras cíclicas é limitada, principalmente no começo da estação de monta (SQUIRES et al., 1999). Para isso, é imprescindível a utilização de protocolos hormonais que consistem em aplicações de estrógeno e, posteriormente, de progesterona. No entanto, apesar de inúmeros estudos que comprovem a eficácia dos protocolos, ainda não há uma completa investigação do comportamento do estradiol em éguas, e faltam dados que esclareçam qual a melhor dose, tipo de hormônio a ser utilizado e tempo de tratamento. No presente trabalho, fez-se a avaliação das concentrações plasmáticas de estradiol usando três diferentes tipos de estrógeno, sendo eles o benzoato de estradiol, o cipionato de estradiol e o 17β estradiol e suas correlações com o edema endometrial.

Foi possível observar que o grupo BE apresentou o pico de concentração plasmática de estradiol um dia após a primeira dose de estrógeno (D1) e o grupo CE atingiu maior concentração plasmática dois dias após (D2) e apresentou pico menos evidente em relação ao grupo BE. Já o grupo 17β teve seu maior valor plasmático de estradiol em D1, apresentando aumento menos expressivo que os demais grupos.

Estudos prévios realizados com éguas acíclicas (SILVA et al., 2016, 2017, 2021) e com bovinos (VYNCKIER et al., 1990) utilizando o benzoato de estradiol corroboram com os nossos resultados, nos quais foi possível observar comportamentos semelhantes em relação às suas máximas concentrações. Em relação aos outros dois grupos, o grupo BE foi o que atingiu maior nível plasmáticos de estradiol ($P < 0,0001$) aumentando em 4,5 vezes o valor identificado antes do início do tratamento e apresentou uma queda expressiva dois dias após o pico.

Em um trabalho realizado por Vynckier et al. (1990), comparando concentrações plasmáticas de estradiol em vacas utilizando cipionato de estradiol e benzoato de estradiol, ambos na dosagem de 10mg, observou-se que o grupo de animais que recebeu a dose de cipionato não apresentou aumento expressivo como no grupo que recebeu o benzoato, e que o pico foi atingido posteriormente. No presente estudo, a média da concentração plasmática dos animais do grupo CE também atingiu o maior valor em D2 e apresentou pico menos evidente em relação ao grupo BE, o que reafirma os resultados do trabalho supracitado. Além disso, a queda da concentração começou a acontecer apenas em D4, enquanto nos outros grupos as concentrações já começaram a cair a partir de D2.

Em todos os dias de tratamento, o grupo 17 β mostrou menores valores de concentração de estrógeno em comparação aos grupos BE e CE, demonstrando um aumento de apenas 2,3 vezes entre o início do tratamento e o dia de pico observado neste estudo. É possível observar também que diferente do BE e do CE, o grupo 17 β não sofreu acentuada redução nas suas concentrações após as 24hs. Pode ser que pelos diferentes tipos de veículos utilizados em cada um dos hormônios, o comportamento provocado pelo 17 β estradiol tenha sido diferente dos demais.

Embora todos os animais selecionados apresentassem edema score 0 e folículos < 20 mm nos dois ovários por 21 dias consecutivos no início do tratamento, duas éguas do grupo BE apresentaram concentrações mais altas em D0, aumentando a média desse dia em relação aos demais grupos ($P < 0,0001$). Além disso, uma égua do grupo CE e outra do grupo 17 β também mostraram valores de estradiol elevados em D0, divergindo dos valores encontrados nos outros animais nesse mesmo dia. Uma das éguas do grupo BE mostrava-se com um escore de condição corporal consideravelmente abaixo do ideal. Sabe-se que os estrógenos se distribuem por todo o organismo e tem como característica a deposição em tecido adiposo (MAPLETOF, 2002). É possível que por apresentar pouco tecido adiposo para estocá-lo, os níveis de estrógeno circulantes apresentaram-se maiores. As demais éguas que apresentaram essa alteração, por sua vez, tinham em comum o fato de estarem com potros ao pé, e mesmo que com quase 9 meses, nenhum deles havia sido desmamado. São necessárias novas investigações para verificar possíveis interferências desses fatos sobre as concentrações plasmáticas de estradiol.

Os estudos conduzidos em bovinos que evidenciam os tempos de meia-vida distintos entre esses ésteres de estradiol nos revelam que o cipionato de estradiol possui maior tempo de meia vida que o benzoato de estradiol, que por sua vez apresenta maior tempo de meia-vida que o 17 β estradiol (BURKE et al., 2000; LARSON; BALL, 1992; SALES et al., 2012). Com base nisso, esperava-se que as concentrações plasmáticas de estradiol no grupo CE permanecessem altas por mais tempo em relação ao grupo BE, e que as de BE permanecessem altas por mais tempo do que 17 β . Os resultados do presente estudo nos mostraram que, a média da concentração do grupo CE demorou cerca de nove dias para atingir valor próximo ao encontrado no D0, e que o valor atingido no pico (81 pg/ml) demorou cerca de cinco dias (D7) para reduzir-se próximo a sua metade (39 pg/ml); enquanto em BE demorou cerca de cinco dias para atingir valor próximo a D0 e o valor encontrado no pico (190,48 pg/ml) demorou cerca de dois dias para mostrar um valor de concentração abaixo da metade (59,50 pg/ml). Pelo exposto, tais resultados comprovam nossa hipótese inicial referente ao comportamento do BE e CE. Apesar

disso, estatisticamente não houve diferença nas concentrações atingidas pelos dois grupos entre D3 e D9, não sendo possível afirmar que as concentrações de cipionato realmente permanecem por mais tempo altas em relação ao BE.

Já no grupo 17 β , em D8, a concentração ainda não tinha atingido valor próximo de D0, assim como a concentração ainda não tinha atingido metade do maior valor encontrado indicado nesse estudo (D1). Divergências foram observadas entre os animais utilizados dentro do grupo 17 β , em que três das seis éguas que compunham o grupo apresentaram valores próximos a D0 entre o D6 e D8, e uma delas reduziu em metade o valor do pico três dias após atingi-lo. Apesar de ser um hormônio bastante utilizado na rotina reprodutiva equina, ainda não há evidências científicas sobre seu comportamento na espécie. Para manter o padrão do trabalho, escolheu-se utilizar a mesma dose com os diferentes tipos de hormônios, portanto, não se seguiu a recomendação do fabricante em relação a dosagem do 17 β estradiol (Botupharma). Em bovinos, o perfil plasmático de 17 β estradiol em vacas ovariectomizadas é descrito com um rápido aumento e rápido decréscimo das concentrações, comparado ao benzoato de estradiol e cipionato de estradiol. No entanto, a maioria dos estudos realizam dosagens antes de 24hs após a aplicação hormonal. Com isso, foi possível perceber que, vacas tratadas com 17 β estradiol atingiram picos de estrógeno maiores do que as vacas tratadas com benzoato de estradiol (12hs após a aplicação). Nas 24hs após aplicação as concentrações já se mostraram significativamente menores e se mantiveram nas próximas 48hs em queda, de maneira gradual (MARTINEZ et al., 2005). No presente trabalho não foi possível observar esse pico descrito nos bovinos. Não se sabe se, assim como visto no trabalho supracitado, o 17 β estradiol também provoque um pico antes de 24hs em equinos e não tenha sido possível detectá-lo porque as colheitas sanguíneas para a dosagem hormonal começaram a ser realizadas após esse intervalo de tempo ou se o fato de termos utilizado uma dosagem menor do que a indicada pelo fabricante não foi capaz de induzir o pico esperado.

Em todos os grupos tratados o edema endometrial atingiu o escore 3. Numericamente, a mediana do edema do grupo 17 β mostrou-se mais baixa em relação aos outros dois grupos em D1, já que apenas atingiu grau 3 de edema em D2. Devido ao pequeno número de animais dispostos para a realização do trabalho simultaneamente, duas éguas que fizeram parte do grupo BE e outras duas éguas que haviam sido utilizadas em outro experimento também recebendo estrógeno foram selecionadas para compor o grupo 17 β , havendo um intervalo de 10 dias entre o final do tratamento anterior e início do novo. Como todas apresentavam edema 0 após os 10 dias, elas foram selecionadas para compor o grupo. Foi possível observar que essas éguas não

atingiram o grau de edema esperado em D1, sugerindo que o tratamento anterior pudesse interferir na ação do estrógeno a nível uterino. As outras éguas que não foram utilizadas previamente atingiram grau de edema 3 em 24hs após a primeira aplicação, sugerindo realmente que a exposição ao estrógeno anteriormente possa ter interferido no grau de edema atingido.

O edema começou a decrescer em D4 nos grupos BE e 17 β , dois dias após a última dose de estrógeno aplicada. Em D6 e D7 o edema foi significativamente maior em CE com relação ao grupo 17 β ($P < 0,05$). Em CE, o edema começou a decrescer apenas em D5, três dias após a última dose de cipionato de estradiol, sendo que em D8 o edema em CE ainda se mostrava maior em relação ao BE ($P < 0,05$). As concentrações plasmáticas nesses dias não se mostram com diferenças estatísticas e é observado que a diminuição das concentrações de estrógeno não acompanha a diminuição do edema uterino na mesma proporção, fenômeno este já visto em trabalhos anteriores (SILVA et al., 2016 e 2021), o que também justifica as correlações positivas moderadas e fracas entre edema e concentração de estradiol. No último dia de avaliação (D8), duas éguas do grupo 17 β ainda não haviam atingido graus de edema abaixo de 1. Não foi possível continuar as avaliações até a ausência de edema ou até 9 dias após o início do tratamento pela quantidade limitada de kits disponíveis para a dosagem hormonal.

O estudo apresentou algumas limitações, como o baixo número de animais disponíveis a serem utilizados, não sendo possível aumentar o número de animais por grupo e incluir um grupo controle recebendo apenas solução salina. Além disso, as coletas de sangue foram realizadas a cada 24hs, não sendo possível concluir se a média da maior concentração plasmática atingida pelo grupo 17 β aconteceu anteriormente.

6 CONCLUSÃO

A concentração plasmática de estradiol no grupo BE atingiu seu pico em D1 e foi significativamente maior em relação aos outros dois grupos, contudo, apresentou queda expressiva dois dias após. No grupo CE, o pico foi atingido apenas em D2. O grupo 17 β não apresentou crescimento expressivo da concentração plasmática de estradiol. As correlações entre edema endometrial e concentrações plasmáticas foram positivas moderadas nos grupos BE e CE e fraca no grupo 17 β .

REFERÊNCIAS

- AMER, H. A.; SHAWKING, G.; ISMAIL, R. Profile of steroid hormones during oestrus and early pregnancy in Arabian mares. **Slovenian Veterinary Research**, Ljubljana, v. 45, p. 25-32, 2008. Disponível em: [http://www2.vf.uni-lj.si/ZB/SlovVetRes_45_\(1\)_pp25-32.pdf](http://www2.vf.uni-lj.si/ZB/SlovVetRes_45_(1)_pp25-32.pdf). Acesso em: 13 out. 2020.
- 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**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 233-239, 2001. DOI: 10.1590/S1413-95962001000500007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962001000500007&lng=en &nrm=iso. Acesso em: 7 Out. 2020.
- AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, p. 220-228, 2011. DOI:10.1016/j.anireprosci.2011.02.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/animal-reproduction-science>. Acesso em: 10 out. 2020.
- AUPPERLE, H.; OZGEN SSHOON, 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**, Newmarket, v. 32, n. 3, p. 228-232, 2000. DOI: 10.2746/042516400776563554. Disponível em: <https://beva.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2746/042516400776563554>. Acesso em: 13 out. 2020.
- BERGFELT, D. R. Estrous synchronization. *In*: SAMPER, J. C. **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: Saunders Company, 2000. p. 165-177. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/288527525_Estrous_synchronization. Acesso em: 7 out. 2020.
- 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**, Amsterdam, v. 152, p. 39-43, 2015. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.12.014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432014004114?via%3Dihub>. Acesso em: 15 out. 2020.
- 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**, Champaign, v. 78, n. 1, p.145, 1 jan. 2000. DOI: 10.2527/2000.781145x. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/78/1/145/4625591?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 15 out. 2020.
- CAMPBELL, M. L. H. Embryo transfer in competition horses: Managing mares and expectations. **Equine Veterinary Education**, Newmarket, v. 26, n. 6, p. 322-327, 2014.

DOI: 10.1111/eve.12182. Disponível em:
<https://beva.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/eve.12182>. Acesso em: 15 out. 2020.

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**, Newmarket, v. 50, n. 3, p. 386-390, 2018. DOI: 10.1111/evj.12739. Disponível em:
<https://beva.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/evj.12739>. Acesso em: 15 out. 2020.

CREPALDI, G.A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. 2009. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-17122009-133943/publico/Gabriel_Armond_Crepaldi.pdf. Acesso em: 4 ago. 2022.

CROWELL DAVIS, S. L. Sexual behavior of mares. **Hormones and Behavior**, New York, v. 52, p. 12-17, 2007. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2007.03.020. Disponível em:
[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0018-506X\(07\)00067-0](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0018-506X(07)00067-0). Acesso em: 16 out. 2020.

DAELS, P. F; HUGHES, J. P. The normal estrous cycle. **Equine reproduction**, Philadelphia, p. 121-32, 1993. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/292005959_The_estrous_cycle. Acesso em: 16 out. 2020.

DANTE, G.; VACCARO, F.; FACCHINETTI, F. Use of progestagens during early pregnancy. **Facts, View & Vision in Obgyn**, St-Niklaas, v. 5, n. 1, p. 66-71, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3987350/>. Acesso em: 16 out. 2020.

DONADEU, F. X; GINTHER, O. J. Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin and oestradiol during the anovulatory season. **Reproduction**, Cambridge, v. 124, n. 6, p. 875-885, 2002. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/10947870_Follicular_Waves_and_Circulating_Concentrations_of_Gonadotropins_Inhibin_and_Oestradiol_during_the_Anovulatory_Season_in_Mares. Acesso em: 16 out. 2020.

FITZGERALD, B. P. *et al.* Changes in LH pulse frequency and amplitude in intact mares during the transition into the breeding season. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 79, n. 2, p. 485-493, 1987. DOI: 10.1530/jrf.0.0790485. Disponível em:
https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/79/2/jrf_79_2_019.xml. Acesso em: 16 out. 2020.

FITZGERALD, B. P; MCMANUS, C. J. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 61, n.1, p. 335-340, 2000. DOI: 10.1095/biolreprod63.1.335. Disponível em:
<https://academic.oup.com/biolreprod/article/63/1/335/2723710>. Acesso em: 1 nov. 2020

FREEDMAN, L. J; GARCIA, M. C.; GINTHER, O. J. Influence of Photoperiod and Ovaries on Seasonal Reproductive Activity in Mares. **Biology of Reproduction**,

Champaign, v. 20, n. 3, p. 567-574, 1979. DOI: 10.1095/biolreprod20.3.567. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/20/3/567/2767791>. Acesso em: 30 out. 2020

GASTAL, E. L. Recent advances and new concepts on follicle and endocrine dynamics during the equine periovulatory period. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 6, n.1 p. 144-158, 2009. Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/5b5a606df7783717068b47>. Acesso em: 15 nov. 2020.

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

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Seasonal influence on equine follicle dynamics. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 31-44, 2004a. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/228862997_Seasonal_influence_on_equine_follicle_dynamics. Acesso em: 14 out. 2020.

GINTHER, O. J; BEG, M. A.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. Follicle dynamics and selection in mares. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 1, n.1, p. 45-63, 2004b. Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a608bf7783717068b480d#:~:text=The%20interovulatory%20intervals%20of%20mares,until%20the%20beginning%20of%20deviation>. Acesso em: 14 out. 2020.

GINTHER, O. J; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; BELGFERT, D. R.; BAERWALD, A. R. et al. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mare and women. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 71, n. 4, p. 1195-1201, 2004c. DOI: 10.1095/biolreprod.104.031054. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2891974/>. Acesso em: 14 out. 2020.

GINTHER, O. J; BEG, M. A; NEVES, A. P.; MATTOS, R. C.; PETRUCCI, B. P. L.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. Miniature ponies: 2: endocrinology of the oestrous cycle. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 20, n. 3, p. 386-390, 2008. DOI: 10.1071/rd07165. Disponível em: <https://www.publish.csiro.au/RD/RD07165>. Acesso em: 14 out. 2020.

GINTHER, O. J; BAG, M. A. Hormone concentration changes temporally associated with the hour of transition from preluteolysis to luteolysis in mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, p. 67-72, 2011. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2011.09.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037843201100248X?via%3Dihub>. Acesso em: 20 out. 2020.

GINTHER, O. J. The end of the tour de force of the corpus luteum in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 77, n. 6, p. 1042-1049, 2012. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.10.026. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X11005413?via%3Dihub>. Acesso em: 20 out. 2020.

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**, Viçosa, v. 41, n. 3, p. 607-611, 2012.

DOI:10.1590/S1516-35982012000300019. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982012000300019&lng=en&nrm=iso)

[35982012000300019&lng=en &nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982012000300019&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 20 out. 2020.

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**,

Cambridge, v. 130, p. 241-250, 2005. DOI: 10.1530/rep.1.00596. Disponível em:

<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/130/2/1300241.xml>. Acesso em: 22 out. 2020.

LARSON, L. L.; BALL, P. J. H. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. **Theriogenology**, Los Altos, v. 38, n. 2, p. 255-267, 1992. DOI:

10.1016/0093-691x(92)90234-i. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X9290234I?via%3Dihub>

. Acesso em: 4 nov. 2020.

LUNDH, T.; PETTERSON, H.I.; MARTINSSON, K.A. Comparative levels of free and conjugated plant estrogens in blood plasma of sheep and cattle fed estrogenic silage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, ed. 7, p. 1530-1534, 1990. DOI

10.1021/jf00097a022. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00097a022#>.

Acesso em: 2 jul. 2022.

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. **American Embryo Transfer Association**, 2002. p.27-38.

MARTÍNEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; BÓ, G.A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated ceef cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 86, p. 37-52, 2005. DOI 10.1016/j.anireprosci.2004.06.005. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15721658/>. Acesso em: 30 jun. 2022.

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**, Cambridge, v. 117, n. 1, p. 135-142, 1999. DOI:

10.1530/jrf.0.1170135.

MCKINNON, A. O; SQUIRES, E. L. Embryo transfer and related Technologies.

In: SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A.O. **Current therapy equine reproduction**. 2. ed. [S. l.]: W.B. Saunders, 2007. cap. 51, p. 319-334.

MOREL, M. C. G. D. **Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management**. 2. ed. New York: CABI Publishing, 2003. 28 p.

MOREL, M. C. G. D.; Newcombe, J. R.; Hayward, K. Factors affecting pre-ovulatory follicle diameter in the mare: the effect of mare age, season and presence of other ovulatory follicles (multiple ovulation). **Theriogenology**, Los Altos, v. 74, p. 1241-1247, 19 maio 2010. DOI:10.1016/j.theriogenology.2010.05.027. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X10002815?via%3Dihub>. Acesso em: 3 nov. 2020.

NAGY, P.; GUILLLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 245-62, 2000. DOI: 10.1016/s0378-4320(00)00133-0. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432000001330?via%3Dihub>. Acesso em 13 out. 2020.

OLIVEIRA NETO, I. V.; CANISSO, I. F.; SEGABINAZZI, L. G.; DELL'AQUA, C. P. F.; ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A. Synchronization of cyclic and acyclic embryo recipient mares with donor mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 190, p. 1-9, 2018. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.12.016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432017307947?via%3Dihub>. Acesso em: 20 out. 2020.

OXENDER, W. D.; NODEN, P. A.; HAFS, H. D. Estrus, ovulation, and serum progesterone, estradiol and LH concentrations in mare after an increased photoperiod during winter. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 38, n. 2, p. 203-207, 1977.

PYCOCK, J. F.; DIELEMEN, S.; DRIFJHOUT, P.; BRUG, Y. VAN DER; OEI, C.; WEIJDEN, G. C. V. Correlation of plasma concentration of progesterone and oestradiol with ultrasound characteristics of the uterus and duration of oestrus behavior in the cycling mare. **Reproduction Domestic Animals**, Berlim, v. 30, p. 224-227, 1995. DOI: 10.1111/j.1439-0531.1995.tb00150.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0531.1995.tb00150.x>. Acesso em: 11 out. 2020.

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**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 91-95, 2004. Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a608bf7783717068b4810#:~:text=In%20conclusion%2C%20anovulatory%20mares%20treated,few%20cycling%20recipients%20are%20available>. Acesso em: 2 nov. 2020.

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**, Los Altos, v. 142, p. 291-295, 2020. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.10.030. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X19304844?via%3Dihub>. Acesso em: 10 nov. 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**, Los Altos, v. 78, n. 3, p. 510–516, 2012. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.02.031.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X12001422?via%3Dihub>.

Acesso em: 15 nov. 2020.

SATUÉ, K.; GARDÓN, J. C. A review of the estrous cycle and the neuroendocrine mechanisms in the mare. **Journal of Steroids and Hormonal Science**, Los Angeles, v. 4, n. 2, p. 115-123, 2013. DOI: 10.4172/2157-7536.1000115. Disponível em:

<https://www.longdom.org/open-access/a-review-of-the-estrous-cycle-and-the-neuroendocrine-mechanisms-in-the-mare-2157-7536.1000115.pdf>. Acesso em: 17 out. 2020.

SEAMANS, K. W.; SHARP, D. C. Changes in equine follicular aromatase activity during transition from winter anoestrus. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Oxford, v. 32, p. 225-233, 1982.

SEGABINAZZI, L.G.T.M.; ANDRADE JR., L.R.P.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA JR., J.A. 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**, Basel, v. 8, ed. 190, 2021. DOI 10.3390/vetsci8090190.

Disponível em: https://www.mdpi.com/2306-7381/8/9/190?type=check_update&version=1. Acesso em: 2 jul. 2022.

SHARP, D. C. Environmental influences on reproduction in horses. **The Veterinary Clinics of North America. Large animal practice**, Philadelphia, v. 2, n. 2, p. 207-223, 1980. DOI: 10.1016/s0196-9846(17)30157-x.

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, Los Altos, v. 97, p. 159-69, 2017. DOI:

10.1016/j.theriogenology.2017.04.031. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X17301917?via%3Dihub>. Acesso em: 17 out. 2020.

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**, Amsterdam, v. 144, n. 3-4, p. 122- 128, 2014. DOI:

10.1016/j.anireprosci.2013.12.004. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432013003515?via%3Dihub>. Acesso em: 20 out. 2020.

SILVA, E. S. M.; ROSER, J. F.; GOMES, A. R. C.; FRITSCH, S. C.; PANTOJA, J. C. F. Comparison of different regimens of estradiol benzoate treatments followed by long-acting progesterone to prepare noncycling mares as embryo recipients. **Theriogenology**, Los Altos, v. 86, n. 7, p. 1449-1756, 2016. DOI:10.1016/j.theriogenology.2016.05.041.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X16302424?via%3Dihub>. Acesso em: 6 out. 2020.

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 anestrus mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 131, p. 96- 105, 2019. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.03.025. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X1930072X?via%3Dihub>. Acesso em: 20 out. 2020.

SILVA, E. S.M.; VAZ, I.S.; RODRIGUES, T.S.; BRANDÃO, F.Z.; OQUENDO, P.S.; OQUENDO, F.M.G.; BELETTI, M.E.; CUERVO-ARANGO, J. Artificial Long Estrus Protocols Administered Prior to Progesterone Increase Endometrial Uterocalin Expression in Anestrus Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, CA, v. 103, 2021. DOI 10.1016/j.jevs.2021.103669. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080621002999?via%3Dihub>. Acesso em: 2 jul. 2022.

SQUIRES, E. L; MCCUE, P. M; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, Los Altos, v. 51, n. 1, p. 91-104, 1999. DOI: 10.1016/s0093-691x(98)00234-9. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X98002349?via%3Dihub>. Acesso em: 10 out. 2020.

SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M. Superovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 99, n. 1-2, p. 1-8, 2007. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2006.04.054. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432006002478?via%3Dihub>. Acesso em: 31 out. 2020.

VANDERWALL, D. K; WOODS, G. L. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses. *In*: YOUNGQUIST, S.; THRELFALL, D.V.M. **Current therapy in large animal theriogenology**. 2. ed. [S. l.]: W.B. Saunders, 2007. cap. 29, p. 211-219.

VANDERWALL, D. K. Progesterone. *In*: MC KINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**. 2. ed. [S. l.]: Blackwell Publishing, 2011. p. 1637-1641.

VIANA, J. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, [s. l.], v. 39. n. 4, 2021. Disponível em: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2020.pdf. Acesso em: 26 de jun. 2022.

VYNCKIER, L. 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. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 36-42, 1990. DOI 10.1111/j.1365-2885.1990.tb00745.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2319634/>. Acesso em: 6 ago. 2022.

VOLGESANG, S. G.; SORENSEN, A. M.; POTTER, G. D.; BURNS, S. J.; KRAEMER,

D. C. Fertility of donor mare following nonsurgical collection of embryos. **Journal of reproduction and fertility supplement**, Oxford, v. 27, p. 383-386, 1979.

WATSON, E. D.; SKOLNIK, S. B.; ZANECOSKY, H. Z. Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. **Theriogenology**, Los Altos, v. 38, n. 4, p. 575-580, 1992. DOI: 10.1016/0093-691x(92)90020-r. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X9290020R?via%3Dihub>. Acesso em: 26 de out. 2020.

WATSON, E. D; THOMASSEN, R.; STEELE, M.; HEALD, M.; LEASK, R.; GROOME, N. P.; RILEY, S. C. Concentrations of inhibin, progesterone and oestradiol in fluid from dominant and subordinate follicles from mares during spring transition and the breeding season. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 74, n. 1-2, p. 55-67, 2002. DOI: 10.1016/s0378-4320(02)00170-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432002001707?via%3Dihub>. Acesso em: 12 de nov 2020.