

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA – FAMEV  
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

MARIA CLARA MENDES BERNABE

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ESTRÓGENO PREVIAMENTE A  
PROGESTERONA SOBRE A CONTAGEM DE NÚCLEOS E CÉLULAS  
MITÓTICAS EM EMBRIÕES DE ÉGUAS RECEPTORAS ACÍCLICAS**

UBERLÂNDIA–MG

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA – FAMEV  
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

MARIA CLARA MENDES BERNABE

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ESTRÓGENO PREVIAMENTE A  
PROGESTERONA SOBRE A CONTAGEM DE NÚCLEOS E CÉLULAS  
MITÓTICAS EM EMBRIÕES DE ÉGUAS RECEPTORAS ACÍCLICAS**

Trabalho de conclusão de curso — TCC  
apresentado a Faculdade de Medicina  
Veterinária da Universidade Federal de  
Uberlândia, como requisito de aprovação na  
disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso  
2 (TCC 2, GMV054).

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

UBERLÂNDIA–MG

2023

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. Introdução .....                                    | 4  |
| 2. Revisão de Literatura .....                         | 5  |
| 2.1 Sazonalidade reprodutiva.....                      | 5  |
| 2.2 Fisiologia do ciclo estral em equinos. ....        | 6  |
| 2.3 Transferência de embriões em éguas acíclicas. .... | 6  |
| 2.4 Avaliação de embriões equinos.....                 | 7  |
| 2.5 Influencia na duração do estro .....               | 8  |
| 3. Justificativa .....                                 | 10 |
| 4. Objetivo.....                                       | 10 |
| 5. Materiais e Métodos.....                            | 10 |
| 5.1 Embriões.....                                      | 10 |
| 5.2 Marcação embrionária .....                         | 10 |
| 5.3 Avaliação por microscopia confocal .....           | 11 |
| 5.4 Análise estatística .....                          | 11 |
| 6. Resultados.....                                     | 11 |
| 6.1 Taxa de proliferação.....                          | 11 |
| Figura 1.....  | 12 |
| 6.2 Aglomeração de núcleos.....                        | 12 |
| Figura 2.....  | 12 |
| 7. Discussão.....                                      | 13 |
| 8. Conclusão.....                                      | 14 |
| 9. Agradecimentos.....                                 | 14 |

## 1. INTRODUÇÃO

As fêmeas equinas são poliéstricas estacionais, apresentando ciclos estrais ovulatórios nos períodos do ano com maior luminosidade diária (Aurich, 2011). O ciclo estral dura aproximadamente 21 dias e é dividido em proestro, estro, diestro e metaestro sendo que o estro tem duração média de 6 dias (Santos et al., 2015), no entanto, algumas fêmeas podem apresentar estro mais curto.

Éguas acíclicas que se encontram no período de anestro estacional ou transição, podem ser utilizadas como receptoras de embriões quando tratadas com estrógeno seguido de progesterona, simulando o ambiente hormonal das éguas cíclicas. Quanto a esta categoria de receptoras, também foi demonstrado um possível benefício do maior tempo de tratamento com estrógeno, anteriormente a aplicação de progesterona, sobre o ambiente uterino, uma vez que foi observada maior expressão da proteína uterocalina, que fornece lipídeos ao embrião em desenvolvimento inicial, nas éguas que receberam estrógeno por sete dias anteriormente a aplicação de P4 (progesterona), quando comparadas aos animais que receberam por apenas dois dias ou que só receberam P4 (Silva et al., 2019).

Um estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a influência de diferentes durações do tratamento com estrógeno, ou ausência, antes da administração de P4, sobre o desenvolvimento e sobrevivência de embriões transferidos para éguas receptoras acíclicas (Oquendo et al, 2022). Embora não tenha havido diferença significativa entre grupos para a taxa de crescimento embrionário, houve tendência a maior recuperação de embriões nas receptoras que receberam tratamento com estrógeno por sete dias, antes da P4, quando comparado àquelas que receberam apenas a P4. Mesmo que a P4 possa ser usada isoladamente para preparar receptoras acíclicas, a pré-exposição ao estrógeno, antes da progesterona, parece ter desencadeado um melhor ambiente endometrial, aumentando a sobrevivência do embrião (Oquendo et al, 2022).

Apesar de um possível benefício da maior exposição do endométrio ao estrógeno já ter sido demonstrada (Silva et al., 2019), não se conhece ainda os efeitos sobre a viabilidade embrionária, tanto sobre as características morfológicas quanto celulares. Uma vez que Ducheyne et al. (2019) utilizou a metodologia de avaliação de proporção de núcleos normais e quantificação de células mitóticas, entre outras

análises, como método para avaliação de viabilidade em embriões equinos.

O presente projeto teve como objetivo avaliar a contagem de núcleos e proporção de células mitóticas de embriões recuperados de éguas receptoras acíclicas, que foram expostas a um longo tratamento com estrógeno, um curto tratamento com estrógeno, ou que não receberam estrógeno antes da administração de progesterona.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Sazonalidade reprodutiva**

A espécie equina é considerada poliéstrica estacional, o que significa que o ciclo reprodutivo é afetado pelas estações climáticas, onde nos períodos de primavera/verão as éguas apresentam vários ciclos, enquanto no outono/inverno apresentam poucos ciclos ou nenhum (Aurich, 2011). Essa mudança se dá pela maior ou menor incidência de horas luz/dia. Durante a transição de verão para outono a incidência de luz diária diminui, isso leva ao aumento de melatonina que induz a diminuição da produção das gonadotrofinas. Devido a isso há diminuição da atividade folicular e ausência da ovulação, que é chamado de período de anestro estacional (Aurich, 2011).

A égua é o animal que está mais sujeito a variações em seu ciclo reprodutivo, quando comparado a outros animais domésticos. Algumas éguas podem ser verdadeiramente poliéstricas, podendo apresentar estro durante o ano todo, independente da estação do ano, porém a maioria é poliéstrica sazonal. Apesar de algumas éguas no hemisfério Norte apresentarem comportamento de cio nos meses de Fevereiro, Março e Abril, durante essa época do ano esse cio não é acompanhado de ovulação e a taxa de concepção é baixa, porém as melhores taxas de concepção normalmente ocorrem nas éguas cobertas de Maio a Julho. A mesma situação ocorre no hemisfério Sul em éguas cobertas de Outubro a Fevereiro. Próximo a linha do equador há pouca interferência sazonal na duração do ciclo estral (HAFEZ, 2004).

Segundo HAFEZ (2004), as éguas podem ser classificadas de acordo com a estação de monta, em três categorias: estação reprodutiva definida; estação reprodutiva transitória; reprodução anual. Essa classificação deixa evidente que por mais que algumas éguas em certas latitudes apresentem ciclos estrais durante todo

o ano, elas não concebem necessariamente durante todos os períodos estrais.

## **2.2 Fisiologia do ciclo estral em equinos**

A atividade sexual nos equinos é iniciada e mantida por diferentes fatores, como hormonais, nutricionais e genéticos. A fisiologia reprodutiva das éguas é comandada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Aurich, 2011), que desencadeia a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), e conseqüentemente libera os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), ambos atuam diretamente nos ovários. O FSH é responsável pelo crescimento dos folículos ovarianos, enquanto o LH proporciona a maturação final do folículo pré-ovulatório, e induz a ovulação e o início da formação dos corpos lúteos (Silva et al, 1998).

O ciclo estral da égua apresenta duração em média de 21 dias podendo haver variações, e sendo dividido em duas fases. A primeira fase é de domínio do estrógeno ou também chamada de fase folicular, marcada pelo estro com sua duração variando de 5 a 7 dias, enquanto a segunda fase apresenta domínio de progesterona ou fase lútea, sendo marcada pelo o que é chamado de diestro durando de 14 a 15 dias (Aurich, 2011).

## **2.3 Transferência de embriões em éguas acíclicas**

Nos dias de hoje a técnica de transferência de embrião é vastamente difundida no meio equino. Essa técnica é muito utilizada devido a dificuldade de se conseguir sincronizar éguas doadoras e receptoras, sem fazer o uso de quaisquer protocolos hormonais (Campbell, 2014). Devido a isso se tem o aproveitamento de éguas acíclicas pela administração de estrógeno e progesterona, para se manter a gestação tornando a TE mais eficiente ao longo do ano (Hinrichs et al, 1987).

Futino et al (2005) relatou que embriões equinos são transportados através do oviduto para o útero nos dias 5 ou 6 pós-ovulação, momento no qual se encontram em estágio de mórula compacta a blastocisto inicial. Após a entrada no lúmen uterino, o tamanho do embrião aumenta significativamente enquanto se desenvolve para o estágio de blastocisto expandido.

Para se coletar o embrião equino é utilizado o método de lavagem transcervical não cirúrgico. Portanto com a égua contida no brete, com a região perineal lavada com um detergente suave, enxaguada abundantemente com água limpa seguida de

secagem. O manipulador que fará o procedimento introduzirá um cateter ou sonda estéril munido de um balão inflável pela da vagina, passando pela cérvix e chegando ao corpo uterino. Então o balão é inflado com 40 a 80 mL de ar, sendo que a quantidade de ar irá variar de égua para égua, só então é tracionado contra a abertura interna da cérvix garantindo uma oclusão completa e prevenindo a perda do líquido (Lenzi, 2008).

Após a colocação da sonda, é injetado para dentro do útero de um a dois litros de meio tamponado (Ringer Lactato ou PBS - solução salina tamponada em fosfato) (Futino, 2005), sendo o mais utilizado a solução de Ringer Lactato. Utiliza-se e normalmente 3 lavagens onde se coloca um litro e se não houver recuperação embrionária se coloca o segundo litro e o terceiro repetindo-se o procedimento.

Portanto, após o preenchimento do útero, o fluido é drenado através do cateter (sonda) e é passado por um filtro de 0.75 µm sendo esse filtro encontrado dentro de um copo coletor, filtro esse que irá permitir que o embrião fique retido no copo (Ley, 2013). Terminado o processo de lavagem uterina, o filtro deve ser esvaziado em uma Placa de Petri com marcações, recomenda-se enxaguar o filtro com o meio utilizado. O fluido é examinado em busca da presença de embriões utilizando-se um microscópio ou uma lupa. Assim que o embrião é identificado, ele é classificado, lavado e transferido pra a receptora. (Futino, 2005).

#### **2.4 Avaliação de embriões equinos**

É de extrema importância que o veterinário que faça TE saiba avaliar e identificar corretamente um embrião. Deve ser feita uma avaliação sobre o estágio de desenvolvimento, a qualidade e o tamanho dos embriões rigorosamente, além de diferenciar entre um embrião, um oócito não fertilizado e estruturas não embrionárias. Devido a isso recomenda-se que a avaliação seja composta por estágio de desenvolvimento, escore de qualidade (nota) e tamanho (McCue, 2011). De acordo com McCue (2011) e McKinnon (1998) podem ser classificados de grau 1 a 4:

- Embriões grau 1 (Excelentes) - Sem anomalias visíveis; formato esférico; células de tamanho, cor e textura uniformes; tamanho e estágio de desenvolvimento adequados para a idade pós-ovulação.
- Embriões grau 2 (Bons) - Imperfeições mínimas, como alguns blastômeros extrusados; pequenas irregularidades de formato, tamanho, cor ou textura; pouca separação entre a camada trofoblástica e a zona pelúcida ou cápsula.

- Embriões grau 3 (Ruins) - Nível moderado de imperfeições, como grande percentual de blastômeros extrusados ou degenerados; colapso parcial da blastocele ou afastamento moderado do trofoblasto da zona pelúcida ou cápsula.
- Embriões grau 4 (Degenerados ou mortos) - Problemas graves de fácil identificação, como alto percentual de blastômeros extrusados, colapso total da blastocele, ruptura da zona pelúcida ou degeneração completa e morte do embrião.
- UFO- Ovócito não fertilizado.

Porém existem análises mais específicas como a de Ducheyne et al (2019) que avaliou a morfologia nuclear, e a sua velocidade de desenvolvimento e a proporção de núcleos normais; e avaliou também se as características micromorfológicas de campo claro e a velocidade de desenvolvimento que podem ser usadas para prever o estabelecimento da prenhez, e sobrevivência após a TE (transferência de embrião). Após coleta de embriões ambos foram a fixados e marcados de fluorescente para avaliação nuclear. As análises foram feitas pelas imagens obtidas pelo microscópio confocal, que quantificou o número de micronúcleos (MN) e células mitóticas (MC) pelo programa ImageJ.

Os resultados dos embriões produzidos *in vitro* tiveram uma incidência de 16-19 vezes maior de células MN do que embriões *in vivo*. Os resultados deste estudo indicam que o cultivo *in vitro* nas condições utilizadas afeta negativamente a competência desenvolvimento e, provavelmente, a integridade da segregação cromossômica em embriões equinos. De fato, aproximadamente 10% das células em embriões IVP exibiram um ou mais MN. A maior prevalência de MN em IVP em comparação com embriões derivados *in vivo* sugere que as condições de cultura *in vitro* usadas comprometem a capacidade de algumas células de sofrer sequência cromossômica normal durante a mitose (Ducheyne et al, 2019).

## **2.5 Influência na duração do estro**

Entretanto ainda não está exatamente claro se o aumento na duração do estro também influencia a receptividade uterina para o crescimento embrionário. Foi demonstrado que alternando a dominância dos esteroides ovarianos (estradiol para

progesterona) durante a transição do estro para o diestro (Gebhardt et al. 2012), interfere na expressão gênica do endométrio de tal maneira a favorecer a sobrevivência embrionária. Outro estudo recentemente demonstrou uma correlação positiva entre a duração do estro na receptora anteriormente a transferência de embrião e as taxas de prenhez subsequentes (Cuervo-Arango et al. 2018). Tais achados apontam para um efeito positivo em relação à maior exposição ao estrógeno e a qualidade do ambiente endometrial necessário para o estabelecimento de uma gestação.

Silva et al (2019) selecionou um painel de genes endometriais conhecidos e considerados envolvidos no suporte e desenvolvimento do concepto durante a fase móvel, ou aqueles que são conhecidos por serem regulados por estrógeno e como eles são influenciados por diferentes durações de estimulação do estrógeno. Portanto Silva et al (2019) no presente estudo levantou a hipótese que uma diferença na duração da exposição ao estrógeno antes do tratamento com progesterona poderia influenciar a expressão de genes endometriais. Os resultados mostram que os níveis basais de 17- $\beta$  estradiol (E2) e progesterona em todas as éguas no início do estudo confirmaram o status em anestro sazonal, e como era esperado as concentrações plasmáticas de E2 aumentaram mais cedo (dia 5) naquelas égua LE do que nos outros grupos.

No trabalho de Oquendo et al (2022), foi levantada a hipótese de que a presença e a maior duração do tratamento com estrógeno antes da administração de progesterona aumentariam a sobrevivência do embrião dentro de 48 horas após TE em éguas receptoras acíclicas, e a taxa de crescimento dos embriões sobreviventes até 48 horas após TE. As receptoras de embriões foram divididas em 3 grupos, Estro Longo (EL), 8mg de benzoato de estradiol em doses consecutivas; Estro Curto (EC), com uma dose única de 2,5mg de benzoato de estradiol; Sem Estro (SE), recebeu apenas progesterona. Os resultados mostraram que a taxa de crescimento ou grau do embrião dois dias após TE, não foi influenciada pelo grupo de tratamento hormonal. Ou seja, mesmo que a presença e a duração do tratamento com estrógeno antes da progesterona tendem a influenciar a sobrevivência do embrião, aqueles embriões recuperados não apresentaram nenhuma diferença de tamanho e morfologia (Oquendo et al, 2022). Por outro lado, a probabilidade de recuperação do embrião dois dias após TE foi de 46,1% nas SE; 62,5% nas EC; e de 85,7% nas EL.

### **3. JUSTIFICATIVA**

Baseado em trabalhos que já mostraram que o estro possui um possível benefício no útero e na recuperação embrionária (Oquendo et al, 2022), o presente trabalho se justifica para testar a hipótese de que embriões transferidos para receptoras que foram expostas a um maior período de tratamento com estrógeno antes da aplicação de P4, serão mais viáveis quando comparados aos embriões transferidos para receptoras que receberam curta exposição ao estrógeno ou que não foram expostas ao hormônio anteriormente a P4. A técnica de viabilidade empregada, através da contagem de núcleos e células mitóticas, foi baseada em uma das técnicas descritas previamente por Ducheyne et al. (2019).

### **4. OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi realizar a contagem de núcleos e proporção de células mitóticas de embriões recuperados de éguas receptoras acíclicas que foram expostas a um longo tratamento com estrógeno (7 dias), anteriormente a aplicação de P4 (grupo estro longo -EL); curto tratamento com estrógeno (2 dias), previamente a aplicação de P4 (grupo estro curto — EC); ou que não receberam estrógeno, apenas a administração de P4 (sem estro - SE).

### **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **5.1 Embriões**

Dezessete embriões com 10 dias de idade, previamente recuperados das receptoras de três grupos, sendo seis do grupo estro longo, cinco do estro curto e seis do grupo sem estro, foram fixados em paraformaldeído 1% e mantidos a 4°C, até serem submetidos à técnica de imunofluorescência para marcação de embriões.

#### **5.2 Marcação embrionária**

Os embriões fixados foram lavados 3x em PBS (solução de fosfato tamponada – Sigma Aldrich) por 5 min e permeabilizados em 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) em PBS, por 30 min em temperatura ambiente. Em seguida, os embriões foram incubados, no escuro, com o marcador de DNA YO-PRO-1 Iodide 491/509 (Thermo Fischer Scientific), na diluição de 1:100 por 1h em temperatura ambiente. Novamente os embriões foram lavados 3x em PBS, no escuro, por 5 min e montados em lâmina de

microscopia utilizando glicerol. As lâminas foram cobertas com lamínula e vedadas utilizando esmalte de unhas.

### **5.3 Avaliação por microscopia confocal**

Os embriões marcados foram analisados usando o Microscópio Confocal LSM 510 Meta (Zeiss) com objetiva de 20x e 40x. O YO-PRO-1 foi excitado pelo laser de 488 nm. As imagens capturadas foram gravadas e analisadas no programa Image J (National Institutes of Health).

### **5.4 Contagem dos núcleos e células mitóticas**

Foram analisadas quatro diferentes regiões por embrião, uma vez que o embrião com 10 dias de idade é muito grande (média 3000  $\mu\text{M}$  de diâmetro) para ser analisado em sua totalidade. Em cada região, foram gerados *stacks* (captação ótica de diferentes camadas do embrião) e contados o total de núcleos íntegros e células em divisão (metáfase, anáfase ou telófase).

Foram calculadas a taxa de proliferação de núcleos, a partir da contagem do número de núcleos em divisão em relação ao total de núcleos por área, bem como a taxa de aglomeração de núcleos, que foi calculada a partir da área total de onde estavam os aglomerados de núcleos em cada *stack*, em relação ao diâmetro de cada núcleo. Foi calculada a média das variáveis em cada embrião e posteriormente foi gerada a média por grupo (EL, EC e SE).

### **5.5. Análise Estatística**

A comparação das médias das taxas de aglomeração de núcleos e taxa de proliferação entre os grupos EL, EC e SE foi realizada pelo teste ANOVA. Foi considerada diferença estatística quando  $p < 0.05$ .

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Taxa de Proliferação**

Ao avaliar os resultados não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) da taxa de proliferação entre os três grupos (Figura 1).

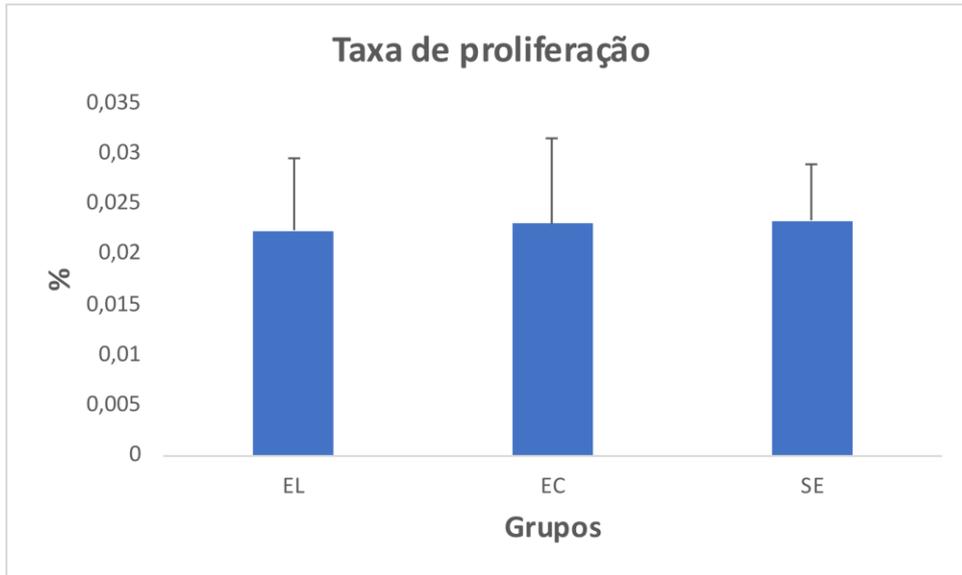


Figura 1: Média ( $\pm$ desvio padrão) da taxa de proliferação nuclear (% de núcleos em divisão em relação ao total de núcleos por área) dos embriões nos grupos EL – estro longo, EC – estro curto e SE – sem estro.  $P>0,05$ .

## 6.2 Aglomeração de Núcleos

Na aglomeração de núcleos não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os grupos, EL, EC e SE. (Figura 2).

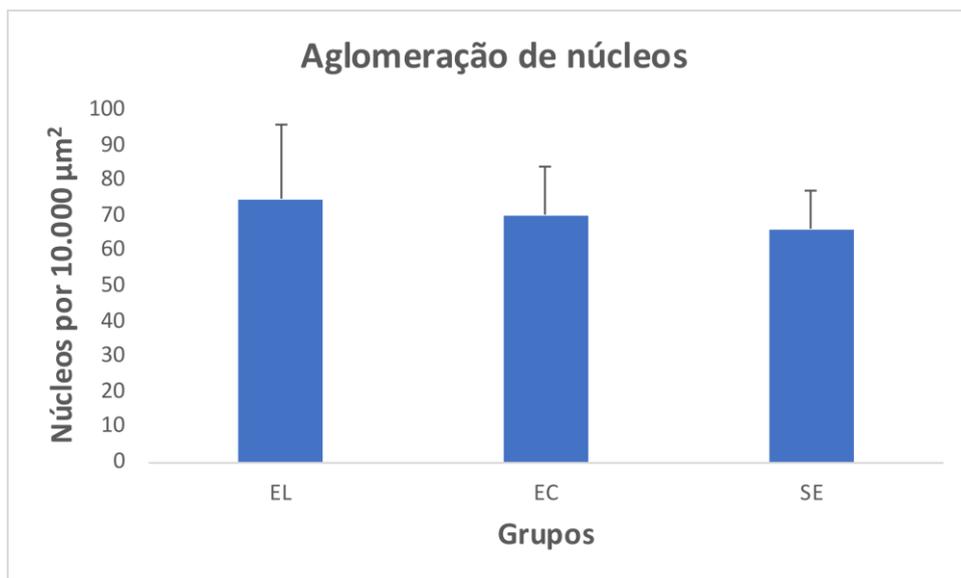


Figura 2: Média ( $\pm$  desvio padrão) da aglomeração de núcleos nos grupos EL – estro longo, EC – estro curto e SE – sem estro.  $P>0,05$ .

## 7. DISCUSSÃO

No presente experimento não foi possível comprovar a hipótese de que embriões transferidos a um útero exposto a um maior tempo estrógeno anteriormente a progesterona tivessem maior grau de desenvolvimento através de uma maior aglomeração de núcleos e células em divisão.

A metodologia utilizada no presente experimento foi baseada no trabalho de Ducheyne et al (2019), que avaliou a contagem total de núcleos e células em divisão, os embriões analisados por Ducheyne eram provenientes de ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoides) e foram recuperados com 8 dias após TE, portanto já se espera que eles apresentassem um menor diâmetro (0,5 mm) e por isso foi possível de ser feita uma fotografia do embrião inteiro, diferente do presente estudo onde foram analisadas quatro diferentes regiões por embrião, já que o embrião com 10 dias de idade é bem maior (média 3000  $\mu$ M de diâmetro) para ser analisado em sua totalidade.

É bem provável que somente o método de contagens de núcleos não acuse uma diferença na viabilidade dos embriões. Para isso existem outros parâmetros que podem ser avaliados como a porcentagem de micronúcleos, porém não foi avaliado no presente estudo por não apresentar significancia em embriões *in vivo* (Ducheyne, 2019). Outro parâmetro que pode vir a ser avaliado é a fragmentação nuclear que não foi avaliado neste estudo devido a ser uma avaliação subjetiva e com alto grau de erro, apesar de haver outros indicadores de apoptose mais objetivos como as caspases (Chowdhury, Tharakan, Bhat, 2006), morfologia celular (Allan et al, 1998), DNA laddering (Wyllie, 1980), pela identificação de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática (Henriksen et al, 1998), e pelo TUNEL (TdTmediated deoxyuridine thiphosphate nick end-labeling) que é uma marcação feita para identificação da fragmentação da cromatina (Gavrieli et al, 1992), no entanto não foi possível essa avaliação. Outro parâmetro de avaliação é a porcentagem de células mitóticas, que foi avaliado no presente estudo e assim como Ducheyne et al (2019) não foi observado diferença significativa entre os grupos avaliados.

É possível que uma vez que esses embriões sobrevivam nesse útero independente do tempo em que foi exposto ao estrógeno, aparentemente eles têm

capacidade de se desenvolver da mesma forma nessas 48 horas. Uma hipótese a ser levada em consideração é que quando o embrião não se adapte ao ambiente ele morre antes de 48 horas, portanto uma vez que se colhe em 48 horas é porque eles já iriam se desenvolver independente do ambiente. Outro ponto é a utilização relativamente baixa de embriões, talvez avaliando um número maior de embriões pudesse acusar o diferença mais significativas.

## **8. CONCLUSÕES**

Não foi possível observar diferenças na aglomeração de núcleos e taxa de proliferação entre os embriões transferidos para ambientes uterinos expostos a maior ou menor tempo de exposição ao estradiol antes da progesterona, ou mesmo na ausência de estradiol previamente a progesterona. São necessários estudos adicionais utilizando outras técnicas para avaliação de viabilidade e, se possível, maior número de embriões por grupo.

## **9. AGRADECIMENTOS**

Gostaria em primeiro lugar agradecer a Deus, pois foi ele que iluminou meu caminho até aqui, sem Deus e meus pais nada disso seria possível.

Aos meus pais, Aida Fabiana e Silvano Luis que nunca mediram esforços para que eu pudesse seguir meu sonho, sempre apoiando e conduzindo meus passos ao meu lado independente de qualquer coisa.

A minha orientadora, Elisa que esteve comigo em todo o processo, sempre me amparando e auxiliando a qualquer momento, agradeço a ela pela paciência e dedicação que teve comigo e pelo nosso trabalho.

A minha madrinha, Ana Paula que sempre me tratou como filha e me recebeu de braços abertos em sua casa.

Aos meus avós, Maurício e Noêmia que estão sempre ao meu lado.

Ao Pedro Oquendo, porque foi a partir do trabalho dele que foi possível o meu, agradeço ao tempo que ele disponibilizou para que pudesse me explicar várias

coisas, e pela paciência que ele teve.

Aos meus amigos, Amanda Luiza, Bianca de Jesus, Bianca Salviano, Danielle, Thamires, Lavínia e a muitos outros que estiveram ao meu lado em toda a graduação fazendo com que fosse mais leve.

## REFERÊNCIAS

ALLAN, D. J.; Harmon, B. V.; Roberts, S. A. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm.

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

CAMPBELL MLH. Embryo transfer in competition horses: Managing mares and expectations. *Equine Veterinary Education*. 2014;26(6):322-7. <http://dx.doi.org/10.1111/eve.12182>.

CHOWDHURY I, Tharakan B, Bhat GK, 2006. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett* 11: 506—25.

CUERVO-ARANGO, J., et al.. Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. **Equine Vet J**. v.50(3), p.386-90, 2018.

DUCHEYNE, Kaatje D.; B, Marilena Rizzo; CUERVO-ARANGO, Juan; CLAES, Anthony; DAELS, Peter F.; STOUT, Tom A. E.; RUIJTER-VILLANI, Marta de. In vitro production of horse embryos predisposes to micronucleus formation, whereas time to blastocyst formation affects likelihood of pregnancy: s.i. **Csiro: Journal compilation**. S.I, p. 1831-1839. 27 nov. 2019.

during normal spermatogenesis. *Cell Proliferation*, Oxford, v. 25, p. 241-250, 1998.

FUTINO, Daniele Oga, 2005. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUÍNOS- de conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Tuiuti do Paraná.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *Journal of Cell Biology*, New York, v. 119, n.3, p. 493-501, 1992.

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

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.s.e.; ESTEVES, Sérgio Novita (ed.). **Reprodução Animal**: sétima edição. 7. ed. Rio de Janeiro: Manole, 2004. 513 p.

HENRIKSEN, K.; PARVINEN, M. Stage-specific apoptosis of male germ cells in the rat: mechanisms of cell death studied by supravital squash preparations. *Tissue Cell*, Essex, v. 30, n. 6, p. 692-701, 1998.

HINRICHS K, Kenney RM. Effect of timing of progesterone administration on pregnancy rate and embryo transfer in ovariectomized mares. *J Reprod Fertil*. 1987;(35):439-43.

LENZI, Cassiano, 2008. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS-Trabalho LEY, William B., 2013 Reprodução em Éguas para Veterinários de Equinos. — São Paulo, Roca. , pp. 48- 160.

MCCUE, P. M.,2011. Transferência de Embriões em Equinos– Avaliação do Embrião

MCKINNON AO, SQUIRES EL. Morphologic assessment of the equine embryo. *J Am Vet Med Assoc* 1988;192:401–406.

Monografia apresentada para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

OQUENDO, P. S., Silva, E. S. M., Oquendo, F. M. G., Cuervo-Arango, J., & Beletti, M. E (2022). The effect of priming and duration of oestradiol benzoate treatment before progesterone administration on embryo development and survival in anestrous recipient mares. *Reproduction in Domestic Animals*, 00, 1-4. <https://doi.org/10.1111/rda.14220>

Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV- SP / Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 9, n. 3 (2011), p. 80–83.

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

SILVA, Antonio Emídio Dias Feliciano; UNANIAN, Maria Marina; ESTEVES, Sérgio Novita. **Criação de Equinos**: manejo reprodutivo e da alimentação. Brasília, Df:

Serviço de Produção de Informação - Spi, 1998. 101 p.

SILVA, Elisa S.M.; CUERVO-ARANGO, Juan; RUIJTER-VILLANI, Marta de; KLOSE, Kristin; OQUENDO, Pedro S.; STOUT, Tom A.e.. Effect of the duration of estradiol priming prior to progesterone administration on endometrial gene expression in anestrus mares. **Theriogenology**, [S.L.], v. 131, p. 96-105, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.025>.

WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, London, v. 284, p. 555-556, 1980.