

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

ARTHUR PELEGI MARAN

**AVALIAÇÃO DO EDEMA E TÔNUS UTERINOS EM ÉGUAS ACÍCLICAS
TRATADAS COM CIPIONATO DE ESTRADIOL E PROGESTERONA**

Uberlândia

2023

ARTHUR PELEGI MARAN

**AVALIAÇÃO DO EDEMA E TÔNUS UTERINOS EM ÉGUAS ACÍCLICAS
TRATADAS COM CIPIONATO DE ESTRADIOL E PROGESTERONA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2.

**Orientadora: Prof.^a Dra. Elisa Sant'Anna
Monteiro da Silva**

Uberlândia

2023

ARTHUR PELEGI MARAN

**AVALIAÇÃO DO EDEMA E TÔNUS UTERINOS EM ÉGUAS ACÍCLICAS
TRATADAS COM CIPIONATO DE ESTRADIOL E PROGESTERONA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2.

Uberlândia, 17 de Novembro de 2023

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva – FAMEV - UFU

Nome – Titulação (sigla da instituição)

Prof.^a Dra. Renata Lançoni – FAMEV - UFU

Nome – Titulação (sigla da instituição)

Médico Veterinário Fernando Alves Soares Ramos

Nome – Titulação (sigla da instituição)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, a todo momento, pelo apoio incondicional aos meus passos. À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, por ter provido a estrutura necessária para que eu chegasse até aqui. Aos professores que me ensinaram e inspiraram. Agradeço especialmente à minha orientadora, por ter me acolhido e guiado, fazendo com que aumentasse a paixão pelo futuro que escolhi. Aos amigos que tinha e àqueles que conheci, sem os quais a caminhada teria beirado o impossível.

Deixo aqui minha eterna gratidão ao Amor, que constantemente me abastece da força e resiliência necessárias para prosseguir!

RESUMO

O uso de receptoras acíclicas na execução de programas de transferência de embriões é uma prática crescente e de grande importância, dadas as diferenças na ciclicidade reprodutiva de doadoras e receptoras e interesse econômico no desempenho atlético de potros nascidos precocemente na estação de nascimentos. Diversos protocolos com duas ou mais aplicações de estradiol antes da administração de progesterona têm sido descritos para preparação das receptoras acíclicas. Ainda, o tempo de exposição do endométrio ao estradiol vem sendo associado a melhores taxas de prenhez. Diante desses aspectos, e considerando estudos prévios que descreveram o comportamento do cipionato de estradiol em éguas, o presente estudo teve como objetivo avaliar edema e tônus uterinos de éguas acíclicas após exposição ao cipionato de estradiol por três ou seis dias antes da administração de progesterona de longa ação. Para isto, foram selecionados dois grupos de cinco éguas em anestro estacional, as quais receberam a mesma dose de cipionato de estradiol, previamente à administração de progesterona, também em doses iguais. As avaliações foram realizadas através de palpções retais e exames ultrassonográficos diários. O grupo exposto por mais tempo ao estradiol demonstrou redução gradual do escore de edema antes da administração de progesterona, diferentemente do grupo exposto por período menor. O tônus uterino não foi diferente entre os grupos. Assim, concluiu-se que o grupo com exposição mais prolongada exibiu um perfil de edema uterino próximo do observado em éguas cíclicas, embora a expressão do tônus não tenha sido alterada pela duração do domínio estrogênico.

Palavras-chave: equino; receptoras; protocolo; estrógeno; útero; endométrio; progestágenos.

ABSTRACT

The use of acyclic recipient mares in the execution of embryo transfer programs is a growing and greatly important practice, given the differences between donor and recipient mares reproductive cyclicity and economic interest in the athletic performance of foals born early in the foaling season. Several protocols using two or more estradiol applications prior to progesterone administration have been described for preparing acyclic recipients. Furthermore, the exposure time of the endometrium to estradiol has been being associated with better pregnancy rates. In view of these aspects and considering previous studies that described the behavior of estradiol cypionate in mares, the present study aimed to evaluate uterine edema and tone of acyclic mares after exposure to estradiol cypionate for three or six days prior to long-acting progesterone administration. For this, two groups of five mares in seasonal anestrous were selected, which received the same dose of estradiol cypionate, prior to progesterone administration, also in equal doses. Evaluations were performed by daily rectal palpations and ultrasound examinations. The group exposed to estradiol for a longer period showed gradual reduction in the edema score before progesterone administration, differently from the group shorter exposed. Uterine tone was not different between the groups. Thus, it was concluded that the group with longer exposure exhibited an uterine edema profile close to that observed in cyclic mares, although the expression of tone was not altered by the duration of the estrogenic domain.

Keywords: equine; recipients; protocol; estrogen; uterus; endometrium; progestins.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 ESTACIONALIDADE REPRODUTIVA	9
2.2 CICLO ESTRAL.....	9
2.3 RELEVÂNCIA DE RECEPTORAS EM PROGRAMAS DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES	10
2.3.1 Receptoras acíclicas	11
2.3.2 Tempo de exposição ao estrógeno e taxas de prenhez.....	12
2.4 CIPIONATO DE ESTRADIOL	13
2.4.1 Estrutura molecular	13
2.4.2 Comportamento em éguas.....	13
2.5 ULTRASSONOGRAFIA NA QUANTIFICAÇÃO DE EDEMA EM ÉGUAS.....	14
3. METODOLOGIA.....	16
3.1 ANIMAIS.....	16
3.2 TRATAMENTOS.....	16
3.3 AVALIAÇÃO DE EDEMA E TÔNUS UTERINO	17
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1 EDEMA ENDOMETRIAL	18
4.2 TÔNUS UTERINO	19
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS.....	25

1. INTRODUÇÃO

Uma ampla variedade de biotecnologias reprodutivas foi desenvolvida nas últimas décadas, mudando a abordagem reprodutiva frente à espécie equina (SQUIRES, 2020). Em programas de transferência de embriões, a aplicação destas biotecnologias faz-se de suma importância, sobretudo ao levar em consideração diferenças no desempenho reprodutivo observadas entre doadoras e receptoras, assim como o interesse inerente ao melhor desempenho de potros que nascem precocemente na estação de nascimentos (ROCHA FILHO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2016).

Diante desse contexto, o uso de receptoras acíclicas, ou seja, éguas que estejam em anestro ou transição, através de protocolos hormonais que visam mimetizar o ciclo estral mostra-se como uma alternativa (LINO *et al.*, 2022). Protocolos descritos para preparação de receptoras acíclicas, em que na maioria das vezes são aplicados duas a três doses de estrógeno (ROCHA FILHO *et al.*, 2004; GRECO *et al.*, 2012; OLIVEIRA NETO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021), buscam associar a administração de estradiol exógeno e progestágenos, variando sobretudo no tipo, dose e frequência de aplicações do estradiol exógeno (SETOGUCHI *et al.*, 2023).

Considerando o perfil de estradiol nas éguas cíclicas, em que há um aumento gradual na concentração de estrógeno durante o estro e declínio dois dias antes da ovulação (GINTHER, 1992), é possível que o uso do cipionato de estradiol em protocolos hormonais pensados para preparação de receptoras acíclicas seja mais adequado, visto que, por apresentar maior tempo de meia-vida (VYNCKIER, 1990; MAPLETOFT *et al.*, 2002; SALES *et al.*, 2012), talvez esse éster demande menor quantidade de aplicações.

Recentemente, Setoguchi *et al.* (2023) descreveram os efeitos gerados pela administração, em três aplicações, de diferentes tipos de estrógeno exógeno sobre a concentração plasmática de estradiol, e correlacionaram os resultados ao edema endometrial demonstrado pelas éguas durante o tratamento. Os resultados obtidos mostraram que o grupo tratado com cipionato de estradiol (EC) apresentou edema em tempo similar aos demais. Porém, no grupo tratado com EC o edema permaneceu alto por mais tempo. Ainda, ressalta-se que o pico de concentração plasmática de estradiol no grupo EC foi obtido de dois a quatro dias após a primeira aplicação, e a redução foi gradual, enquanto no grupo tratado com benzoato de estradiol o pico de concentração foi atingido um dia após a primeira aplicação, seguido de

queda, e no grupo tratado com 17β -estradiol tal pico não foi observado (SETOGUCHI *et al.*, 2023).

Em receptoras cíclicas, sabe-se que estros mais longos, demarcados pela presença de edema endometrial, resultam em maiores taxas de prenhez (CUERVO-ARANGO *et al.*, 2018). No mesmo sentido, foi descrito, para receptoras acíclicas, que o uso de protocolos hormonais baseados na exposição prolongada do endométrio ao estradiol resulta em maior expressão do gene P19, responsável por promover a síntese da uterocalina (SILVA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2021). Em função das características dessa proteína (CROSSETT *et al.*, 1998), é aceito que a presença expressiva da uterocalina no lúmen uterino, tanto no momento da transferência de um embrião, quanto no início do período gestacional, possa estar associada a melhores taxas de prenhez e desenvolvimento embrionário (SILVA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2021).

Frente ao exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o edema e tônus uterinos em éguas acíclicas tratadas com cipionato de estradiol, na dose única de 20 mg, durante três ou seis dias antes da aplicação de progesterona de longa ação (P4 LA), na dose de 1500 mg.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estacionalidade reprodutiva

Na espécie equina, a síntese de GnRH e, por consequência, das gonadotrofinas FSH e LH é influenciada negativamente pela melatonina secretada pela glândula pineal (GINTHER *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2012). Como o estímulo à produção de melatonina ocorre em períodos escuros do dia, a ciclicidade reprodutiva de éguas é, naturalmente, afetada pelas variações na duração de períodos de claro e escuro ao longo das estações do ano e, por essa razão, são classificadas como poliéstricas estacionais (LINO *et al.*, 2022; GINTHER *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2012).

Durante o verão, quando a duração da luminosidade diária é aumentada, é observada atividade folicular e múltiplos ciclos estrais. Já durante o inverno, quando as horas de luz por dia são reduzidas, observa-se atividade folicular diminuída e ausência de ovulações, o que caracteriza o anestro estacional (GINTHER *et al.* 2004; AURICH, 2011). Na transição entre verão e outono, tal atividade encontra-se em redução gradual, enquanto na transição de inverno para primavera acontece o oposto, ou seja, a atividade folicular aumenta gradativamente (FITZGERALD e MCMANUS, 2000; GINTHER *et al.* 2004; AURICH, 2011).

É importante ressaltar que a sazonalidade reprodutiva é mais evidente quanto mais distante da Linha do Equador (LINO *et al.*, 2022), e que outros fatores como nutrição, condição corporal e saúde geral também podem causar variações na ciclicidade reprodutiva de fêmeas equinas (GINTHER *et al.*, 2004; AURICH, 2011; ARAÚJO e OLIVEIRA, 2018).

2.2 Ciclo Estral

O ciclo estral de éguas compreende o intervalo entre duas ovulações consecutivas, podendo ser dividido em fase folicular ou estrogênica, durante a qual o hormônio dominante é o estrógeno, e fase luteal ou progesterônica, durante a qual o hormônio dominante é a progesterona (LINO *et al.*, 2022). A primeira, também conhecida como estro, dura de 5 a 7 dias e é demarcada por alterações tanto no trato reprodutivo das éguas, quanto por alterações comportamentais. A segunda, chamada também de diestro, apresenta mudanças características do trato reprodutivo e sua duração varia entre 14 e 15 dias. O ciclo estral como um todo pode

durar de 19 a 25 dias, sendo 21 dias a média observada (GINTHER *et al.*, 2004; CROWELL-DAVIS, 2007; AURICH, 2011).

O controle fisiológico do ciclo estral e suas fases se dá pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (AURICH, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2012). Células neuronais do hipotálamo são responsáveis pela produção e secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que atua diretamente sobre a adenohipófise, fazendo com que suas células sintetizem e secretem FSH - hormônio folículo estimulante - e LH - hormônio luteinizante. Estas gonadotrofinas, uma vez na circulação, irão agir sobre as gônadas estimulando a liberação dos hormônios esteroides (estrógeno e progesterona), além de regularem a secreção do GnRH através do mecanismo de *feedback* negativo. O padrão de secreção dos esteroides gonadais é responsável pela determinação das fases do ciclo estral na égua e levam às características observadas em cada uma delas (GINTHER, *et al.*, 2005; CROWELL-DAVIS, 2007; AURICH, 2011).

No estro, as células da granulosa respondem ao estímulo do FSH produzindo e liberando estrógeno. Após a ovulação do folículo dominante, por ação do LH, as células da granulosa remanescentes sofrem luteinização e passam, por ação da mesma gonadotrofina, a secretar progesterona, cujo domínio caracteriza o diestro (AURICH, 2011).

2.3 Relevância de receptoras em programas de transferência de embriões

A transferência de embriões (TE) em equinos foi primeiramente reportada em meados da década de 1970. Hoje, encontra-se bem estabelecida como biotecnologia de reprodução assistida para a espécie, sendo Brasil e Argentina líderes mundiais no uso desta. A aplicabilidade da TE baseia-se na disponibilidade, bom monitoramento e preparo de receptoras para a implantação do embrião, manutenção da gestação e boa habilidade materna por parte da receptora (HINRICHS, 2018; SQUIRES, 2020).

Dentre as justificativas para uso desta biotécnica, destacam-se a obtenção de potros provenientes de doadoras de alto valor zootécnico, que tenham idade avançada, apresentem problemas reprodutivos, ou mesmo cuja gestação seja inconveniente ao proprietário pela participação em competições. Ademais, a TE possibilita a geração de mais de um potro por doadora por ano, muitas vezes utilizando sêmen de diferentes garanhões (HINRICHS, 2018; SQUIRES, 2020).

2.3.1 Receptoras acíclicas

São consideradas acíclicas éguas que estejam em anestro, ou seja, que apresentem folículos de, no máximo, 20 mm de diâmetro, ausência de corpo lúteo e concentração sérica de progesterona abaixo de 1 ng/ml por, no mínimo, 21 dias consecutivos. Éguas em transição também se caracterizam por ausência de corpo lúteo e concentração de progesterona abaixo de 1 ng/ml, porém o diâmetro dos folículos ovarianos varia entre 20-30 mm nesta fase (SILVA *et al.*, 2017).

O uso de protocolos hormonais para preparação de receptoras acíclicas em programas de transferência de embriões faz-se importante devido a aspectos como a precocidade do ciclo das doadoras em períodos de transição, reflexo do melhor manejo e melhor condição nutricional recebidos, resultando na escassez de receptoras cíclicas (SILVA *et al.*, 2016; LINO *et al.*, 2022), além do grande interesse no melhor desempenho atlético de potros nascidos no início da estação de nascimentos (ROCHA FILHO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2016).

Inicialmente, os protocolos propostos para a preparação de receptoras acíclicas baseavam-se apenas na administração de progestágenos (P4 ou altrenogest), como os descritos por Hinrichs *et al.* (1986), Hinrichs e Kenney (1987) e Carnevale *et al.* (2000). Contudo, Silva *et al.* (2017), baseados em estudos prévios, demonstraram que a aplicação de estradiol seguida da aplicação de P4 em éguas acíclicas resulta em condições uterinas muito semelhantes às observadas em éguas cíclicas, no que diz respeito a tônus e edema uterino, concentrações de E2 e expressão gênica de receptores de E2 (ER α e ER β) e P4 (PR). Concluiu-se, portanto, que este modelo de protocolo seria o mais viável, por apresentar menor custo e demandar menos manejo (LINO *et al.*, 2022).

Rocha Filho *et al.* (2004) avaliaram a taxa de prenhez apresentada por receptoras acíclicas tratadas com 10 mg de cipionato de estradiol por dois dias consecutivos, seguido do uso de progesterona de longa (1500 mg) ou curta ação (200 ou 400 mg). Os resultados obtidos foram semelhantes entre os grupos tratados e o grupo controle de receptoras cíclicas, entretanto, o uso de P4 LA pode ser mais interessante por demandar menor número de aplicações, facilitando o manejo das receptoras e reduzindo o estresse causado às mesmas. Greco *et al.* (2012) descreveram a utilização de doses decrescentes de cipionato de estradiol (10 mg, 6 mg e 4 mg), seguidas da aplicação de P4 LA, e avaliaram as taxas de prenhez após a transferência

de embrião em comparação a receptoras cíclicas. Os resultados obtidos sugeriram maior taxa de prenhez para receptoras acíclicas, contudo, isso foi atribuído pelos autores como reflexo do maior número de receptoras acíclicas utilizadas no estudo em comparação às cíclicas, já que estudos anteriores obtiveram taxas iguais ou menores.

Silva *et al.* (2021) testaram a expressão do gene P19 (uterocalina) após protocolos de estro longo, sendo um dos grupos tratado com cinco aplicações de benzoato de estradiol (BE), consecutivas e em doses crescentes (0,5 mg; 1,0 mg; 1,5 mg; 2,0 mg; 3,0 mg), antes da aplicação de 1500 mg de progesterona longa ação (P4 LA), e outro grupo tratado com duas aplicações de BE (3,0 mg; 5,0 mg), com intervalo de 72 horas entre as elas, previamente à aplicação de 1500 mg de P4 LA. Tais protocolos mostraram-se semelhantes quanto à expressão do gene avaliado, sendo possivelmente adequados para o preparo de receptoras acíclicas em programas de transferência de embriões. Apesar de semelhantes, o protocolo com menor número de aplicações pode ser mais praticável para utilização a campo (LINO *et al.*, 2022).

2.3.2 Tempo de exposição ao estrógeno e taxas de prenhez

Em estudo preliminar, conduzido com receptoras cíclicas, Cuervo-Arango *et al.* (2018) concluíram que períodos de estro mais longos, demarcados pela presença de edema uterino, aumentam a possibilidade de estabelecimento de prenhez após transferência de embrião. Baseados nesses resultados, Silva *et al.* (2019) buscaram avaliar, em grupos de éguas acíclicas e após diferentes tempos de exposição ao benzoato de estradiol, a expressão de genes que melhoram a sobrevivência e desenvolvimento embrionário. A expressão do gene P19, que codifica a proteína uterocalina, foi maior no grupo cuja exposição ao estradiol exógeno teve maior duração (SILVA *et al.*, 2019), corroborando com os resultados de Cuervo-Arango *et al.* (2018).

A uterocalina é produzida e secretada pelas glândulas endometriais durante o diestro e gestação recente e é responsável pelo transporte de moléculas lipofílicas do lúmen uterino através da cápsula embrionária (CROSSETT, *et al.*, 1998). Por conseguinte, acredita-se que a maior expressão do gene P19, e maior síntese da uterocalina, estejam associadas à melhor receptividade do endométrio ao embrião, visto que, possivelmente, apresente efeitos positivos ao metabolismo e nutrição do mesmo (SILVA *et al.*, 2019).

2.4 Cipionato de estradiol

2.4.1 Estrutura molecular

Os estrógenos compreendem um grupo molecular de esteroides compostos por 18 átomos de carbono, dentre os quais encontra-se um anel fenólico A e um anel fenólico D. O primeiro é responsável pela ligação e confere às moléculas seletividade em seus receptores (VYNCKIER, 1990; MAPLETOFT *et al.*, 2002). Por suas características lipofílicas, os estrógenos possuem a característica de se depositar em tecido adiposo. Estes esteroides possuem metabolização hepática, e sua excreção se dá através da bile e da urina (MAPLETOFT *et al.*, 2002).

Os chamados ésteres de estradiol são formados a partir da esterificação do grupo 17 β -hidroxil da molécula de 17 β -estradiol, sendo o cipionato de estradiol resultado da esterificação deste com o ácido ciclopentano propiônico (SALES *et al.*, 2012). Esse último apresenta efeito prolongado quando comparado ao benzoato de estradiol e ao 17 β -estradiol (MAPLETOFT *et al.*, 2002; SALES *et al.*, 2012). O processo de esterificação aumenta o tempo de meia-vida das moléculas, visto que adquirem resistência ao metabolismo. Tal fato se deve ao tamanho molecular, presença de anéis aromáticos e simetria das ligações, que alteram a polaridade da cadeia (MAPLETOFT *et al.*, 2002; CREPALDI, 2009).

2.4.2 Comportamento em éguas

O comportamento do cipionato de estradiol (EC), assim como do benzoato de estradiol (BE) e do 17 β -estradiol (17 β), administrados a receptoras acíclicas em doses consecutivas de 10 mg, 6 mg e 4 mg foram avaliados por Setoguchi *et al.* (2023). Os resultados obtidos mostraram que o pico de concentração plasmática no grupo cipionato de estradiol foi observado e mantido de dois a quatro dias após a administração da primeira dose e fora menos evidente que o observado pela administração de benzoato de estradiol, que ocorreu no primeiro dia pós exposição seguido de queda. No grupo tratado com 17 β -estradiol tal pico não foi observado. Observou-se, portanto, que a concentração plasmática do cipionato de estradiol reduziu de maneira menos expressiva se comparada à redução da concentração plasmática do benzoato de

estradiol, embora as concentrações tenham sido estatisticamente indiferentes entre três e nove dias após a primeira aplicação.

Nos grupos EC e BE houve correlação positiva moderada entre a concentração plasmática de estradiol e o edema endometrial, ao passo que no grupo 17β , tal correlação foi positiva fraca. Um dia após a administração de cipionato de estradiol, o edema atingiu escore 3, considerado alto. O mesmo aconteceu grupo tratado com benzoato de estradiol, ao passo que no grupo tratado com 17β -estradiol, o edema 3 foi observado somente dois dias após a primeira aplicação. O edema apresentado pelo grupo cipionato de estradiol persistiu até cinco dias após a primeira aplicação, diferente dos outros grupos, em que houve diminuição já a partir do quarto dia de exposição (SETOGUCHI *et al.*, 2023).

Levando em consideração estudos anteriores, conduzidos com bovinos, o comportamento da curva de concentração plasmática e expressão do edema endometrial em éguas, exibidos após o uso do cipionato de estradiol, provavelmente seja explicado pelas diferenças farmacocinéticas entre os ésteres de estradiol. Isso pois, o cipionato de estradiol apresenta menor solubilidade em água e maior resistência ao metabolismo. Conseqüentemente, observa-se um maior tempo de atividade biológica (MAPLETOFT *et al.*, 2002; CREPALDI, 2009; SALES *et al.*, 2012).

2.5 Ultrassonografia na quantificação de edema em éguas

O uso de avaliações ultrassonográficas na rotina de reprodução equina tem levado ao desenvolvimento de novas linhas de pesquisa. Além disso, se tornou uma ferramenta de grande relevância ao diagnóstico clínico e à obtenção de melhores índices reprodutivos na espécie (ORTEGA-FERRUSOLA *et al.*, 2022).

Sabe-se que, durante o ciclo estral, útero, vagina e endométrio sofrem alterações decorrentes das variações no perfil hormonal (AURICH, 2011). No estro, é possível visualizar as dobras endometriais de maneira evidente, enquanto no diestro tais dobras são indistinguíveis pela avaliação ultrassonográfica, considerando que o nível de progesterona circulante esteja adequado (GINTHER e PIERSON, 1984). Segundo Aurich (2011), o edema endometrial durante o estro pode ser facilmente detectado pela ultrassonografia transretal, uma vez que é possível individualizar as dobras endometriais. Por outro lado, quando no diestro, a ecotextura uterina deve apresentar-se homogênea, com ausência de edema endometrial (AURICH, 2011),

visto que os efeitos da progesterona no endométrio são opostos aos do estrógeno (ALONSO *et al.*, 2008).

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram selecionadas 10 éguas mestiças, em anestro estacional, com faixa etária entre 3 e 8 anos e peso entre 350 kg e 450 kg. Os animais foram mantidos no Setor de Equídeos da Universidade Federal de Uberlândia – Fazenda Experimental do Campus Glória – em pastagem de capim tifton (*Cynodon dactylon*) e com acesso a água e sal mineralizado *ad libitum*.

A fim de serem inclusas no experimento, cada égua fora avaliada com base em sua atividade ovariana e condição uterina. Selecionou-se apenas éguas em anestro estacional, ou seja, aquelas que apresentaram ausência de corpo lúteo, de edema endometrial e presença de folículos ovarianos ≤ 20 mm por, pelo menos, 21 dias.

O projeto foi submetido à CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) e aprovado pela mesma, sob o protocolo número 23117.036108/2023-23.

3.2 Tratamentos

As éguas selecionadas foram divididas aleatoriamente em dois grupos: Estro Longo - EL (n=5), as quais receberam dose única de 20 mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Zoetis) seis dias antes da administração de 1500 mg de progesterona de longa ação (P4 300®, Botupharma); e Estro Curto - EC (n=5), as quais receberam 20 mg de ECP três dias antes da aplicação de 1500 mg de P4 LA.

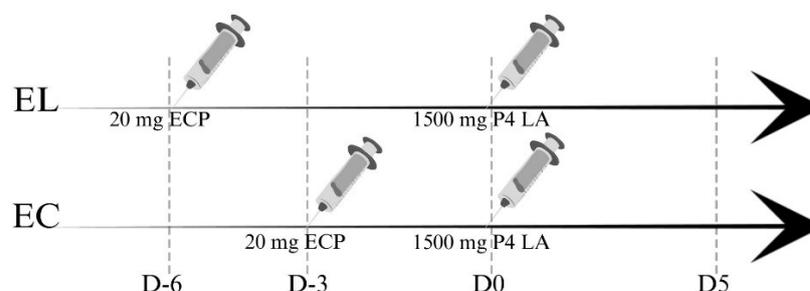


Figura 1: Esquema de delineamento experimental adotado. Fonte: próprio autor.

3.3 Avaliação de edema e tônus uterino

Os animais foram avaliados por ultrassonografia transretal para avaliação do crescimento folicular e quantificação do edema uterino, numa escala de 0 a 4 e com variações de 0,5 a depender da intensidade. O critério adotado fora o mesmo utilizado por Setoguchi *et al.* (2023): 0 = ausência de edema; 1 = edema discreto; 2 = edema moderado; 3 = edema alto; e 4 = edema exacerbado. O tônus uterino foi avaliado, através de palpções retais, numa escala de 0 a 3, na qual 0 representa ausência de tônus e 3 representa tônus intenso (ARISTIZABAL *et al.*, 2017). Tais avaliações foram conduzidas diariamente desde o dia da administração do cipionato de estradiol, até 5 dias após aplicação da P4 LA, em ambos os grupos de tratamento. Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador, autor deste trabalho.

3.4 Análise Estatística

O teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn foram utilizados para comparar o score de edema endometrial e tônus uterino entre os dias em cada grupo e entre os grupos dia a dia. Foi considerada diferença estatística nas análises em que $p \leq 0,05$. O programa estatístico utilizado fora o Programa R®, *software* livre para computação estatística.

4. RESULTADOS

4.1 Edema endometrial

Após o tratamento com 20 mg de cipionato de estradiol, observou-se, no grupo Estro Longo (n=5), aumento do edema uterino, que teve seu ápice em D-4, seguido de gradual redução. Houve diferença significativa de D-4 em relação aos dias D-5, D-2, D-1 e D0. Os dias D1 a D5 foram iguais entre si e diferentes dos demais dias de avaliação. Embora o valor máximo de mediana de edema endometrial tenha sido observado em D-4, não houve diferença estatística significativa entre este e D-3. Já em D-6, dia de aplicação do ECP, os valores de edema foram mínimos, com diferença significativa entre este dia e os demais dias do protocolo. Os dados de edema endometrial do grupo EL estão dispostos na figura 2.

Assim como no grupo EL, observou-se aumento de edema endometrial já no primeiro dia após o tratamento com 20 mg de ECP no grupo Estro Curto (n=5). Tal pico manteve-se até D0, a partir do qual nota-se redução do edema. Os dias D-2, D-1 e D0 foram superiores e estatisticamente diferentes dos demais dias de tratamento. D1 a D4 foram iguais estatisticamente, porém diferiram de D5 e D-3. Este último, por sua vez, foi quando se observaram os menores valores de edema e, portanto, mostrou-se estatisticamente diferente de todos os demais dias em que houve avaliação. Os dados de edema endometrial do grupo EC estão também dispostos na figura 2.

Ao comparar estatisticamente os dados de edema endometrial de D-3 a D5 entre os grupos de tratamento, foi possível determinar que houve diferença significativa entre os grupos nos dias D-3 e D-1 (Figura 2).

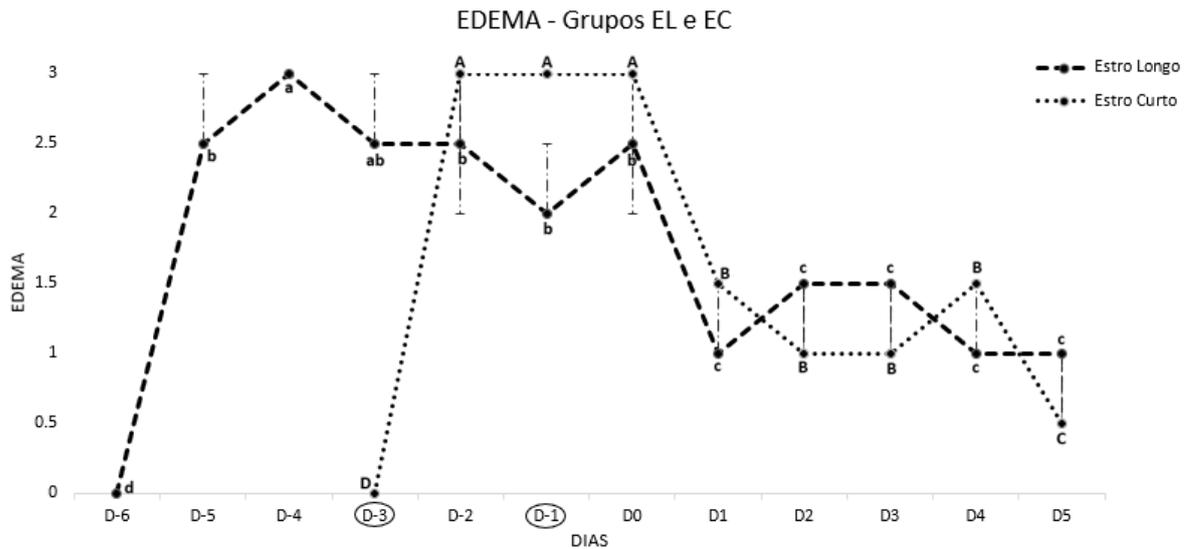


Figura 2: Gráfico de curvas de edema para os grupos EL (Estro Longo) e EC (Estro Curto), elaborado a partir das medianas e quartis superiores e inferiores, obtidos para cada dia de tratamento. As diferentes letras minúsculas atribuídas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os dias de tratamento do grupo EL. Da mesma forma, as diferentes letras maiúsculas atribuídas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dias de tratamento do grupo EC. Os dias circulados são aqueles em que houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos de tratamento. Foram realizados o Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Dunn. Fonte: próprio autor.

4.2 Tônus Uterino

O escore de tônus, no grupo Estro Longo, após a administração de 1500 mg de progesterona de longa ação (P4 300®, Botupharma), manteve mediana 1,5 de D1 a D3. Em D4, a mediana observada foi 2. Contudo, observou-se redução desse parâmetro já em D5, como demonstrado pelo gráfico da figura 3. Não houve diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os dias de avaliação do tônus no grupo Estro Longo.

No grupo Estro Curto, após a administração de 1500 mg de progesterona de longa ação (P4 300®, Botupharma), realizada em D0, a mediana dos escores de tônus atingiu valor 2 em D3, mantendo-se 1,5 em todos os demais dias avaliados. O gráfico da figura 3 demonstra esta curva obtida a partir das medianas de tônus. Assim como no grupo EL, não foi observada diferença estatística entre os dias de tratamento.

Ao se realizar a comparação dos escores de tônus entre os grupos EL e EC, foi possível constatar que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Kruskal-Wallis, seguido do Teste de Dunn, entre os grupos em nenhum dos dias em que foram realizadas as avaliações (Figura 3).

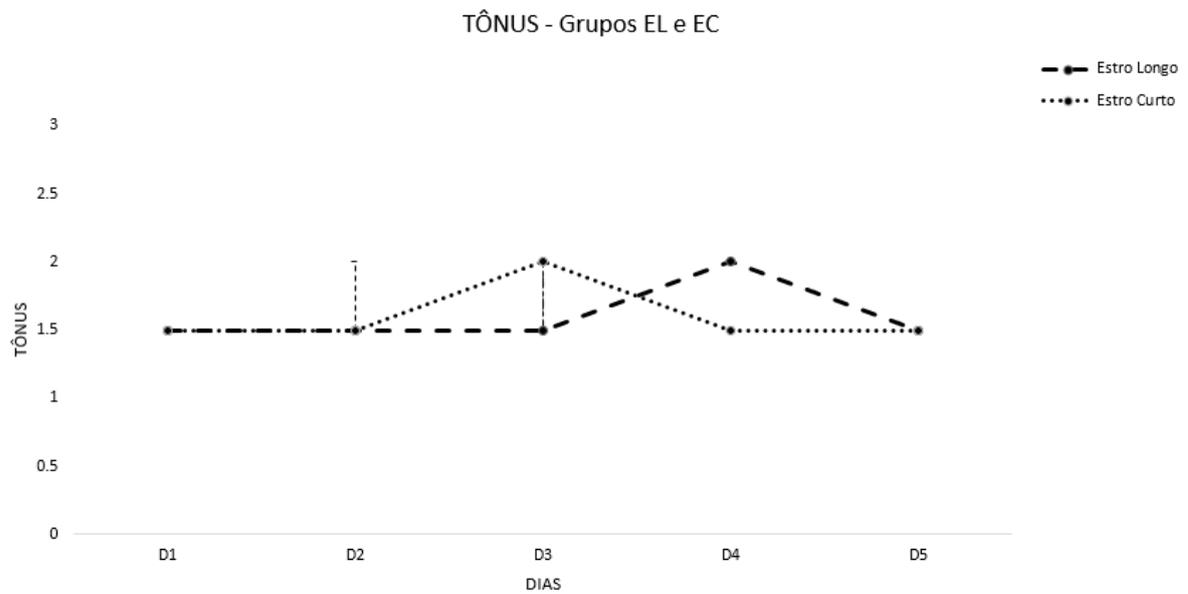


Figura 3: Gráfico de curvas das medianas (e quartis superiores e inferiores) dos escores de tônus dos grupos Estro Longo (EL) e Estro Curto (EC), obtidos para cada dia de tratamento, após a administração de 1500 mg de P4 LA (P4 300®, Botupharma). Não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os dias em cada grupo, nem entre os grupos comparados dia a dia. Para tal, realizou-se o Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Dunn. Fonte: próprio autor.

5. DISCUSSÃO

Em síntese, os resultados previamente apresentados neste trabalho mostram que não houve diferença entre os tónus dos grupos, tratados com a mesma dose de P4 LA, que haviam sido previamente expostos ao cipionato de estradiol por diferentes períodos. Em ambos os grupos, o edema demonstrou aumento significativo 24 horas após a primeira aplicação, mantendo-se elevado (escore maior ou igual a 2) até o dia de administração da progesterona. No caso do grupo Estro Longo (EL), observou-se gradual redução dos escores de edema antes da aplicação de progesterona. De forma distinta, tal redução não foi observada no grupo Estro Curto (EC).

Segundo Setoguchi *et al.* (2023), que administraram o total de 20 mg de cipionato de estradiol em três doses decrescentes (10 mg, 6 mg e 4 mg), o edema endometrial teve aumento nas 24 horas seguintes à primeira aplicação e permaneceu com escore acima de 2, considerado alto, até o sétimo dia de avaliação. Constatou-se, ainda, nesse modelo experimental, que o pico da concentração plasmática de estradiol frente a administração de ECP ocorreu 48 horas após a primeira aplicação. Tal concentração manteve-se alta até o quarto dia de análises, exibindo, embora com magnitude moderada, correlação positiva em relação à expressão de edema endometrial neste grupo. Esses resultados corroboram com os escores obtidos no presente trabalho, já que em ambos os grupos houve aumento do edema endometrial desde o primeiro dia pós aplicação do cipionato de estradiol, mantendo escore igual ou superior a 2 até o dia de administração da progesterona exógena. No grupo EL deste trabalho, o aumento no escore de edema fora estatisticamente diferente nas avaliações 24 e 48 horas após a aplicação, enquanto no grupo EC, o aumento foi considerado igual no mesmo intervalo de observação. Acredita-se que tal fato se deva ao n amostral limitado e ao modelo adotado para padronização dos dados.

Em estudo anterior, Pelehach *et al.* (2002), avaliaram e inferiram a possível participação da progesterona na dissipação do edema uterino em éguas. A partir dos resultados, concluiu-se que a administração de estradiol exógeno leva à expressão de edema endometrial característico de estro, enquanto a administração conjunta de estradiol e progesterona exógenos também culmina com aumento de edema, porém, exibindo escores mais baixos (PELEHACH *et al.*, 2002). Considerando estes resultados, e dada a disposição temporal dos eventos observados neste trabalho, é plausível admitir que a redução do edema endometrial a partir de D1 deveu-se à aplicação de P4 LA em D0.

Noutro experimento utilizando éguas cíclicas, conduzido como parte do mesmo estudo, Pelehach *et al.* (2002), concluíram que o pico de edema ocorreu quatro dias antes da ovulação,

e que mostrou perfil similar em éguas prenhes e não prenhes até quatorze dias após a liberação do oócito. Passado esse período, as éguas não prenhes demonstraram aumento de edema uterino, associado a aumento da concentração plasmática de estradiol. Já as éguas prenhes mantiveram-se com edema uterino abaixo do escore 1,5, apesar da alta concentração de estrógeno intraluminal característica (PELEHACH *et al.*, 2002). Estes achados permitem sugerir que o protocolo proposto para o grupo Estro Longo (EL), neste trabalho, promoveu comportamento uterino similar àquele demonstrado por éguas em ciclicidade.

Com relação às observações de tônus, embora Hayes e Ginther (1986) afirmem que a administração de estradiol isolada não é capaz de promover aumento do tônus uterino, notou-se neste estudo diferença entre o tônus uterino de éguas em anestro em relação ao tônus posterior à administração do cipionato de estradiol. Ainda, confirmou-se que a progesterona, isoladamente, causa a expressão de tônus característica de diestro (BERG; GINTHER, 1978; HAYES; GINTHER, 1986). Segundo Hayes e Ginther (1986), a máxima expressão de tônus uterino, característica de úteros gravídicos, poderia ser obtida pela administração prévia de progesterona, seguida por uma baixa dose de estradiol e continuidade no tratamento com o progestágeno. Sendo assim, e como não houve novas administrações de estradiol, ou continuação do tratamento com P4 LA, a expectativa do trabalho fora detectar tônus uterino análogo ao de éguas em diestro, comparando-os entre os grupos.

Um estudo prévio do mesmo grupo de pesquisas envolvido neste projeto, também concluiu que não houve diferença entre os escores de tônus após diferentes tempos de exposição ao estradiol exógeno. Em dois grupos utilizou-se benzoato de estradiol seguido de P4 LA, enquanto em outros dois utilizou-se 17β estradiol seguido de implante intravaginal de progesterona. A diferença mais demarcada foi o edema endometrial de maior escore exibido pelos grupos que utilizaram implante de progesterona, em relação aos que receberam o hormônio injetável (SIQUEIRA *et al.*, 2023).

Em concordância com este trabalho, Oquendo Junior (2021), que também dispunha de grupos de tratamento intitulados Estro Longo (EL) e Estro Curto (EC), além de um grupo sem estro (SE), ao qual não foi fornecido estradiol previamente à aplicação da progesterona, demonstrou que não houve diferença estatística de tônus entre os dois primeiros grupos, durante os dias de avaliação. Contudo, ambos diferiram do grupo SE, com valores de tônus estatisticamente superiores. Diante disso, esperava-se obter, no presente experimento, valores de tônus superiores aos que foram observados. Os referidos valores atingiram mediana 2 em apenas um dos cinco dias de avaliação, para ambos os grupos. Possivelmente, isso tenha sido uma consequência das características da progesterona de longa ação utilizada, do baixo número

de animais avaliados, possibilitando que variações individuais interferissem nos resultados, da experiência do avaliador ou, ainda, de uma combinação destes fatores.

6. CONCLUSÃO

Embora a expressão do tônus tenha sido menor que a esperada, não se obteve diferença estatística deste parâmetro entre os grupos de tratamento propostos. Já no que diz respeito ao edema endometrial, o comportamento das curvas obtidas ficou dentro das expectativas, sendo o perfil do grupo Estro Longo (EL) o que mais se aproximou do fisiológico descrito para éguas cíclicas. O fato de utilizar uma única aplicação de estradiol, diferencial deste trabalho, busca refinar e tornar cada vez mais facilmente exequíveis os protocolos para preparo de receptoras acíclicas. Todavia, as avaliações de edema endometrial e tônus uterino, isoladamente, não são suficientes para afirmar que este protocolo seja aplicável e eficiente. Portanto, faz-se necessário que mais estudos acerca deste modelo sejam conduzidos, inicialmente, visando mensurar as taxas de implantação e desenvolvimento embrionário e a expressão gênica associada à receptividade do útero ao embrião.

REFERÊNCIAS

ALONSO, M. A.; FLEURY, P.; ALVARENGA, M. A. Use of day 3 postovulation embryo transfer recipient mares. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 98-98, 2008.

ARISTIZABAL, V. H. V.; GARCIA, H. D. M.; JUNIOR, J. A. D. Influence of Injection Altrenogest in Uterine Tone and Embryonic Vesicle Growth in Recipient Mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 1, p. 157-157, 2017.

AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 3-4, p. 220-228, 2011.

BERG, S. L.; GINTHER, O. J. Effect of estrogens on uterine tone and life span of the corpus luteum in mares. **Journal of Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 203-208, 1978.

CARNEVALE, E. M. *et al.* Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 965-979, 2000.

CREPALDI, G. A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CROSSETT, B. *et al.* Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 3, p. 483-490, 1998.

CROWELL-DAVIS, S. L. Sexual behavior of mares. **Hormones and behavior**, v. 52, n. 1, p. 12-17, 2007.

CUERVO-ARANGO, J. *et al.* Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. **Equine veterinary journal**, v. 50, n. 3, p. 386-390, 2018.

DE ARAÚJO, J. M.; DE OLIVEIRA, R. A. A influência da nutrição e a atuação da leptina e kisspeptina no ciclo reprodutivo da égua. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.42, n.1, p.9-14, 2018.

FITZGERALD, B. P.; McMANUS, C. J. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 1, p. 335-340, 2000.

GINTHER, O. J. *et al.* Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 2, p. 315-323, 2005.

GINTHER, O. J. *et al.* Seasonal influence on equine follicle dynamics. **Animal Reproduction (AR)**, v. 1, n. 1, p. 31-44, 2004.

GINTHER, O. J.; PIERSON, R. A. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. **Theriogenology**, v. 21, n. 3, p. 505-516, 1984.

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

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

HAYES, K. E. N.; GINTHER, O. J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology**, v. 25, n. 4, p. 581-590, 1986.

HINRICHS, K. Assisted reproductive techniques in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 4-13, 2018.

HINRICHS, K.; KENNEY, R. M. Effect of timing of progesterone administration on pregnancy rate after embryo transfer in ovariectomized mares. **Journal of Reproduction and fertility. Supplement**, v. 35, p. 439-443, 1987.

HINRICHS, K.; SERTICH, P. L.; KENNEY, R. M. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v. 26, n. 4, p. 455-460, 1986.

LINO, D. C.; SILVA, E. S. M.; DE OLIVEIRA, R. A. Uso de éguas receptoras acíclicas em programas de transferência de embrião Anovulatory recipient mares in embryo transfer programs. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 46, n. 3, p. 298-307, 2022.

MAPLETOFT, R. J. *et al.* Estrogen esters to synchronize follicular wave emergence and ovulation in CIDR-treated cattle. *In: Proceedings of the Annual Convention of the American Embryo Transfer Association*. 2002. p. 27-38.

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

OQUENDO JUNIOR, P. S., **Influência Do Tratamento Com Estrógeno Previamente a Progesterona Sobre A Sobrevivência E Desenvolvimento Embrionário Em Éguas Receptoras Acíclicas**. 2021. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/32242>. Acesso em: 03 nov. 2023.

ORTEGA-FERRUSOLA, C. *et al.* Advances in the ultrasound diagnosis in equine reproductive medicine: New approaches. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 57, p. 34-44, 2022.

PELEHACH, L. M. *et al.* The role of estrogen and progesterone in the induction and dissipation of uterine edema in mares. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4, p. 441-444, 2002.

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

SALES, J. N. S. *et al.* Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*, v. 78, n. 3, p. 510-516, 2012.

SETOGUCHI, L. S. *et al.* Plasma Estradiol Profile After Administration of Different Types of Estradiol Esters in Acyclic Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 127, p. 104824, 2023.

SILVA, E. S. M. *et al.* Administration of 2.5 mg of estradiol followed by 1,500 mg of progesterone to anovulatory mares promote similar uterine morphology, hormone concentrations and molecular dynamics to those observed in cyclic mares. *Theriogenology*, v. 97, p. 159-169, 2017.

SILVA, E. S. M. *et al.* Artificial long estrus protocols administered prior to progesterone increase endometrial uterocalin expression in anestrus mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 103, p. 103669, 2021.

SILVA, E. S. M. *et al.* Comparison of different regimens of estradiol benzoate treatments followed by long-acting progesterone to prepare noncycling mares as embryo recipients. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1749-1756, 2016.

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

SIQUEIRA, L. M. *et al.* Avaliação do Edema e Tônus uterino após a administração de duas fontes de progesterona em éguas acíclicas previamente expostas a diferentes regimes de tratamento com estrógenos. *In: XXIII CONFERÊNCIA ANUAL ABRAVEQ*, 23., 2023, Campinas. **Anais [...]**. Campinas: Associação Brasileira dos Médicos Veterinários de Equídeos, 2023. No prelo.

SQUIRES, E. L. Current reproductive technologies impacting equine embryo production. **Journal of equine veterinary science**, v. 89, p. 102981, 2020.

SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O.; SHIDELER, R. K. Use of ultrasonography in reproductive management of mares. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 55-70, 1988.

VYNCKIER, L. *et al.* Plasma estradiol-17 β concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 β benzoate and estradiol-17 β cypionate - a preliminary study. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 13, n. 1, p. 36-42, 1990.

WILLIAMS, G. L. *et al.* Reproductive seasonality in the mare: neuroendocrine basis and pharmacologic control. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 43, n. 2, p. 103-115, 2012.