

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**FABIANA MADDALENA DE GASPARI OQUENDO**

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO ESTRADIOL PRÉVIA À PROGESTERONA SOBRE  
A EXPRESSÃO GÊNICA UTERINA EM ÉGUAS RECEPTORAS ACÍCLICAS**

**UBERLÂNDIA**

**2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO ESTRADIOL PRÉVIA À PROGESTERONA SOBRE A EXPRESSÃO  
GÊNICA UTERINA EM ÉGUAS RECEPTORAS ACÍCLICAS**

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

Área de concentração: Reprodução Animal

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

**UBERLÂNDIA**

**2024**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

O62 Oquendo, Fabiana Maddalena de Gaspari, 1983-  
2024 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO ESTRADIOL PRÉVIA À  
PROGESTERONASOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA UTERINA EM  
ÉGUAS RECEPTORAS  
ACÍCLICAS [recurso eletrônico] / Fabiana  
Maddalena de Gaspari Oquendo. - 2024.

Orientadora: Elisa Sant'Anna Monteiro da  
Silva. Dissertação (Mestrado) - Universidade  
Federal de  
Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em:

<http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.303>

Inclui bibliografia.

1. Veterinária. I. Silva, Elisa Sant'Anna Monteiro da

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091 Nelson Marcos Ferreira  
- CRB6/3074



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

### Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902 Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



## ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências Veterinárias				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico PPGCVET Nº 07/2024				
Data:	28 de fevereiro de 2024	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:30
Matrícula do Discente:	12212MEV006				
Nome do Discente:	Fabiana Maddalena de Gaspari Oquendo				
Título do Trabalho:	Efeito da exposição ao estradiol prévia à progesterona sobre a expressão gênica uterina em éguas receptoras acíclicas				
Área de concentração:	Produção Animal				
Linha de pesquisa:	Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Técnicas laboratoriais e moleculares na reprodução animal				

Reuniu-se no Anfiteatro do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Ricarda Maria dos Santos (FAMEV/UFU); Guilherme Pugliesi (FMVZ/USP); Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva (FAMEV/UFU), orientador(a) do(a) candidato(a).

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

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

Aprovada.

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

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Elisa Sant'anna Monteiro da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/03/2024, às 13:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Pugliesi, Usuário Externo**, em 01/03/2024, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 02/03/2024, às 09:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5230319** e o código CRC **BDC08021**.

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO ESTRADIOL PRÉVIA À PROGESTERONA SOBRE  
A EXPRESSÃO GÊNICA UTERINA EM ÉGUAS RECEPTORAS ACÍCLICAS**

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

Uberlândia, 28 de fevereiro de 2024.

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva (orientadora) – FAMEV – UFU**

---

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

---

**Prof. Dr Guilherme Pugliesi – FMVZ – USP**

## DEDICATÓRIA

À Deus e a Nossa Senhora, por mais essa oportunidade em minha vida e por nunca me abandonarem. Ao meu marido Pedro que sempre me incentivou nessa jornada, sem o qual eu não teria conseguido; minha eterna gratidão. Aos meus pais, Milton e Ezilda que sempre me incentivaram aos estudos pois, segundo eles - 'podem tirar tudo de você, menos seu conhecimento'- obrigada pelo exemplo que vocês são para mim. À minha querida irmã Mariana, pela parceria de vida e por todos os momentos de apoio, força e risadas. Ao meu primo-irmão Daniel, por colecionarmos bons momentos da vida. Aos meus amigos, sem os quais a vida seria bem mais difícil e menos alegre, vocês são a família que escolhi. Aos meus animais que, sem perceber, aliviam o peso da jornada, me distraem e recarregam minhas energias sendo muito importantes no meu processo de melhorar como ser humano - sem vocês a vida não seria tão colorida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Professora e orientadora Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva por oferecer tamanha oportunidade, auxílio e paciência durante todo o processo. Admiro cada vez mais sua dedicação e incentivo à pesquisa.

Aos Professores Juan Cuervo-Arango e Tom Stout pelos pesquisadores exemplares e pela facilidade em transmitir o conhecimento.

A Tamires pela disposição e auxílio com os dados.

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



## RESUMO

Correlação positiva entre a duração do estro e a taxa de prenhez foi demonstrada em éguas receptoras de embriões cíclicas e, a nível molecular, foi relatada maior expressão endometrial da uterocalina (*P19*) e menor do fator de crescimento de fibroblasto 2 (*FGF-2*) após o tratamento com progesterona (P4) em éguas submetidas previamente a um longo tratamento com estradiol. Porém, ainda é incerto se, associado aos efeitos dos diferentes tratamentos hormonais sobre o endométrio, a presença ou ausência de um embrião no útero também afetaria a expressão de genes possivelmente envolvidos com a interação útero/concepto. Dessa forma, objetivou-se nesse estudo, avaliar a expressão endometrial dos genes *P19*, *FGF-2*, fator de crescimento semelhante a insulina-1 (*IGF-1*), receptor de fator de crescimento semelhante a insulina-1 (*IGFR-1*), receptor de estrógeno  $\alpha$  (*ESR1*) e receptor de progesterona (*PGR*) em 23 éguas receptoras em anestro submetidas a três protocolos hormonais com diferentes períodos de exposição ao estrógeno (Estro Longo, 7 dias no total de 8mg; Estro Curto, 2 dias na dose única de 2,5mg) ou ausência deste (Sem Estro), previa à administração da P4 de longa ação (P4 LA; dia 0). 28 embriões foram transferidos quatro dias após administração da P4 LA, sendo 7 para receptoras do grupo EL, 8 para o EC e 13 para o SE. Após 48h, ou seja, no dia 6, foi realizada a tentativa de recuperação embrionária, juntamente com a coleta de biópsias uterinas, independentemente de ter ou não recuperado o embrião. A avaliação da expressão dos genes foi realizada através de RT-qPCR. Os genes *P19* e *IGF-1* tiveram, respectivamente, 1,4 e 2,9 vezes maior expressão no grupo Estro Longo quando comparado ao grupo Sem Estro ( $P < 0,05$ ) e, para os genes *FGF-2*, *IGFR-1* e *PGR* foi observada menor expressão (pelo menos 2,9, 1,5 e 2,3 vezes respectivamente) nos grupos que receberam estrógeno versus o grupo que não recebeu ( $P < 0,05$ ). Com relação a tentativa de recuperação embrionária no D6, independente da presença ou ausência de embrião no lavado, não houve diferença ( $P < 0,05$ ) na expressão gênica entre grupos. Como conclusão, a exposição do útero ao estrógeno previamente a elevação da progesterona, com a presença ou ausência do embrião, parece proporcionar um melhor ambiente uterino, em termos do padrão de expressão dos genes *P19*, *FGF-2*, *IGF-1* e *PGR*, para a sobrevivência inicial e possivelmente desenvolvimento do concepto equino.

**Palavras-chave:** estrógeno; éguas acíclicas; expressão gênica; embrião; endométrio.

## ABSTRACT

Positive correlation between estrus duration and subsequent pregnancy rate has already been demonstrated in cyclic recipient mares, and at the molecular level, higher endometrial expression of uterocalin (*P19*) and lower expression of fibroblast growth factor 2 (*FGF-2*) have been reported after progesterone (P4) treatment in mares previously subjected to long period of estradiol treatment. However, it is still unclear whether, associated with the different effects of hormonal treatments on the endometrium, if the presence or absence of an embryo in the uterus, would also affect the expression of genes that are possibly involved in uterine/conceptus interaction. Therefore, the objective of this study was to evaluate the endometrial expression of genes *P19*, *FGF-2*, insulin-like growth factor 1 (*IGF-1*), insulin-like growth factor 1 receptor (*IGFR-1*), estrogen receptor  $\alpha$  (*ESR1*), and progesterone receptor (*PGR*) in 23 anestrous recipient mares subjected to three hormonal protocols with different periods of exposure to estrogen (Long Estrus, 7 days in a total of 8mg; Short Estrus, 2 days with a unique dose of 2,5mg) or absence of estrogen (No Estrus), prior to administration of long-acting P4 (P4 LA; day 0). 28 embryos were transferred four days after administration of P4 LA, with 7 been to the LE group, 8 for the SE and 13 to the NE group. After 48 hours, with means on day 6, the attempt to recover the embryo was performed, along with uterine biopsies collection, regardless of whether the recovery was positive or negative. Evaluation of gene expression was performed via RT-qPCR. *P19* and *IGF-1* was upregulated, 1,4 and 2,9 times respectively, in the Long Estrus group compared to No Estrus group ( $P<0.05$ ), and *FGF-2*, *IGFR-1*, and *PGR* showed lower expression (at least 2,9, 1,5 and 2,3 times respectively) in the estrogen groups versus the No Estrus group ( $P<0.05$ ). Regarding the attempt at embryonic recovery on D6, regardless of the presence or absence of an embryo, there was no difference ( $P<0.05$ ) in gene expression between groups. In conclusion, uterine exposure to estrogen prior to progesterone elevation, with or without an embryo, seems to provide a better uterine environment, in terms of *P19*, *FGF-2*, *IGF-1*, and *PGR* gene expression, for the initial survival and development of the equine conceptus.

**Keywords:** estrogen; acyclic mares; gene expression; embryo; endometrium.

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1** Sequência dos *primers* e temperatura de anelamento em graus Celsius..... 20

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1:** Representação esquemática das aplicações hormonais realizadas nos três diferentes grupos: A) Estro longo; B) Estro Curto e C) Sem estro .....19

**FIGURA 2:** Box plots da expressão dos genes *P19*, *IGF1*, *IGFR1*, *FGF2*, *PGR* e *ESR1* no dia 6 após administração da progesterona de longa ação (P4 LA) nos grupos: estro longo (EL), estro curto (EC) e sem estro (SE). Baixo delta CT ( $\Delta$ CT) representa maior expressão gênica. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) e asterisco indica tendência ( $0,05 \leq P \leq 0,1$ ) .....22

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	11
2.1 Sazonalidade reprodutiva .....	11
2.2 Ciclo estral .....	12
2.3 Uso de éguas receptoras em programas de transferência de embriões (TE) .....	13
2.4 Correlação duração do estro e fertilidade .....	15
2.5 Expressão gênica e endométrio receptivo .....	16
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
3.1 Animais e tratamentos hormonais .....	18
3.2 Coleta de biopsia endometrial .....	19
3.3 Análise da expressão gênica por RT-qPCR .....	19
3.4 Análise estatística .....	21
<b>4 RESULTADO</b> .....	21
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	22
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	25
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	26
<b>ANEXO I</b> – Certificado da comissão de ética no uso de animais .....	34

## 1. INTRODUÇÃO

Éguas são poliéstricas estacionais, apresentando crescimento folicular e ovulação nos períodos do ano com maior luminosidade diária (AURICH, 2011). O ciclo estral dura em média 21 dias (SANTOS et al., 2015) e divide-se em diestro e estro, sendo o primeiro caracterizado pela predominância do hormônio progesterona (P4) e o segundo, por apresentar níveis basais de P4 e altas concentrações de estradiol (E<sub>2</sub>). Enquanto o diestro apresenta duração relativamente mais constante (duração média estimada de 14,9 dias), o estro pode apresentar grande variação, se estendendo de 03 a 13 dias (GINTHER, 1992).

A variação e duração do estro, acompanhado pelo edema endometrial, aparenta ter relevância na fertilidade em éguas. Estudos têm demonstrado correlação positiva entre a duração do estro e as taxas de prenhez, seja após indução com prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ) (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2009; CUERVO-ARANGO et al., 2015; MATEU-SÁNCHEZ et al., 2016) ou luteólise espontânea (MATEU-SÁNCHEZ et al., 2016). Além disso, as taxas de recuperação embrionária em doadoras de embrião e as taxas de gestação em éguas Puro Sangue Inglês foram maiores quando o estro precedente apresentou maior duração, ou seja, o aumento na duração do estro parece ser benéfico para o processo de fertilização, possivelmente por favorecer a qualidade do oócito e o ambiente do oviduto (CUERVO-ARANGO et al., 2018a).

Para tentar entender um pouco mais sobre o possível benefício da exposição ao estrógeno antes da ação da P4, sobre a receptividade uterina, Silva et al. (2019) avaliaram a expressão de 17 genes possivelmente influenciados pelo estrógeno e envolvidos com o suporte e desenvolvimento embrionário inicial, e observaram que apenas dois exibiram associação clara com a duração de exposição ao estrógeno, previamente à P4 de longa ação (P4 LA): *P19* (uterocalina) que estava aumentada no grupo estro longo (maior exposição ao estrógeno) em relação ao grupo que não foi exposto ao estrógeno e *FGF-2* (fator de crescimento fibroblástico 2), diminuída no mesmo grupo EL também em comparação ao sem estrógeno. Acredita-se que a uterocalina esteja envolvida no transporte de lipídeos para o embrião nas fases iniciais do seu desenvolvimento (SUIRE et al., 2001). Em contrapartida, foi observada menor expressão do *FGF-2* quando o endométrio foi exposto a um maior período de tratamento com estrógeno. A expressão endometrial de *FGF-2*, *FGF-7* e *FGF-9* é conhecida por ser regulada pelo estrógeno e parece ter relação com a receptividade uterina em éguas (GEBHARDT et al., 2012; KLEIN et al., 2010; RUIJTER-VILLANI et al., 2013; 2014).

Oquendo Júnior et al., (2021) ao transferirem embriões saudáveis para receptoras acíclicas 4 dias após a administração de P4 LA posteriormente a tratamentos distintos com estrógeno e, ao realizar a tentativa de recuperação destes mesmos embriões 48h após a transferência, observaram tendência a maior recuperação embrionária, no grupo em que o útero foi exposto por mais tempo ao estrógeno (7 dias versus 2 ou nenhum dia de exposição) , com 85% de recuperação nas éguas do grupo em que foi mimetizado estro longo, 66% estro curto e 46% no grupo sem estro, em que apenas a P4 LA foi administrada. Neste contexto, foi sugerido que a maior exposição uterina ao estrógeno, previamente à P4, parece favorecer a sobrevivência embrionária.

Sendo assim, objetivou-se com esse trabalho determinar o efeito de três diferentes protocolos hormonais (longa, curta e sem exposição ao estrógeno antes do tratamento com P4 LA) em éguas receptoras acíclicas sobre a expressão gênica endometrial de moléculas possivelmente envolvidas nas interações endométrio/concepto, como a *P19*, fator de crescimento semelhante a insulina (*IGF-1*) e seu receptor (*IGFR-1*), fator de crescimento de fibroblastos 2 (*FGF-2*) e, receptores de estrógeno (*ERS1*) e progesterona (*PGR*), bem como avaliar se a expressão gênica teve associação com a presença ou ausência de embrião no lavado de recuperação.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Sazonalidade reprodutiva**

A atividade sazonal reprodutiva das éguas é estimulada pelo fotoperíodo juntamente com outros fatores exógenos, como idade, nutrição, condição corporal e temperatura do ambiente.

O período anovulatório pode ser diferenciado em 3 fases: uma fase transicional de outono, com a última ovulação da estação e diminuição da atividade no eixo hipotálamo-pituitária-ovário; seguindo para o anestro profundo; e uma terceira fase transicional de primavera, marcada pelo início da atividade hormonal (GINTHER, 1974). Enquanto a concentração plasmática de hormônio folículo estimulante (FSH) é relativamente constante durante o ano, a concentração plasmática do hormônio luteinizante (LH) é máxima durante o verão e baixa em éguas anovulatórias. Durante todo o ciclo estral, o endométrio equino

exibe alterações de características morfológicas e funcionais que são induzidas, principalmente, pelos hormônios ovarianos estrógeno e P4 (AURICH, 2011).

O aumento do fotoperíodo (natural ou artificial) induz mudanças na secreção pulsátil de GnRH por caminhos sensoriais envolvendo a glândula pineal e a retina. Melatonina é um hormônio proteico liberado durante as horas mais escuras do dia que inibe a secreção de GnRH pelo hipotálamo da égua (FREEDMAN et al., 1979). A regulação da melatonina e outros sinalizadores para liberação do GnRH, ocorre principalmente por interneurônios produtores de kisspeptina e do peptídeo relacionado à amida RF-3 (RFRP-3), em algumas outras espécies também nomeado de hormônio inibidor de gonadotrofinas (GnIH). A kisspeptina tem ação estimulatória enquanto o peptídeo RFRP-3 tem ação inibitória nos neurônios para secreção de GnRH. Localizados em regiões específicas do hipotálamo médio-basal e do núcleo arqueado, esses neurônios possuem seus axônios e terminações direcionados para os corpos celulares dos neurônios de GnRH. Devido à ausência de receptores para melatonina no neurônio de GnRH e, presença de receptores nos interneurônios RFRP-3, acredita-se que a melatonina age por esta via para regular a liberação de GnRH pelo hipotálamo. Sendo assim, em dias com maior fotoperíodo, há menor concentração de melatonina circulante, resultando em maior liberação de kisspeptina e menor liberação de RFRP-3 para agir nos neurônios de GnRH. Por outro lado, nas estações de outono e inverno onde observa-se menor fotoperíodo, há maior concentração de melatonina, estímulos dos neurônios RFRP-3 e consequente inibição na secreção dos neurônios de GnRH, resultando em menor estímulo na hipófise anterior e consequentemente, menor estímulo também para o desenvolvimento folicular (PUGLIESI et al., 2024).

## **2.2. Ciclo estral**

Durante os dias mais longos do ano, a maioria das éguas apresentam o ciclo estral de aproximadamente 21 dias de duração (AURICH, 2011). O ciclo estral estende-se entre duas ovulações e é frequentemente classificado em: fases luteal e folicular. A fase luteal inicia-se após a ovulação, com a elevação de P4 na concentração maior que 1ng/ml e termina no momento da luteólise (estrutural e funcional), quando o corpo lúteo (CL) regride e a concentração de P4 diminui abaixo de 1ng/ml. Essa fase também é conhecida como diestro e apresenta uma duração relativamente constante, com média de 14,9 dias podendo ir de 12 a 16 dias (GINTHER, 1992). A P4 atinge sua máxima concentração no dia 8 após ovulação



e a luteólise funcional ocorre ao redor do dia 15 e se inicia com a secreção endometrial de prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ) (AURICH, 2011). Em contraste, a fase folicular, que se estende da luteólise até a ovulação subsequente, tem sido reportada com média de duração de 7,3 dias tendo margem de 2 a 13 dias (SANTOS et al., 2015). Diferentemente de GINTHER (1992), a subdivisão do ciclo estral equino também pode ser feita em quatro diferentes fases: estro/fase ovulatória (Dia 16 ao Dia 0), fase luteal inicial (Dia 1 ao Dia 4), fase luteal média (por volta do Dia 8) e, fase luteal tardia (Dia 12 ao Dia 15), segundo AURICH (2011).

O intervalo interovulatório (IOI) em éguas varia de 16 a 25 dias (GINTHER, 1989). Essa grande variação em IOI parece ser mais atribuída a diferença de duração do estro do que o diestro, cuja constância é mais observada (TURNER et al., 1979). Em éguas no início da estação de monta, o IOI é mais longo do que durante o avançar da estação (meses de verão). No entanto, o principal fator envolvido na ampla variação no IOI parece estar relacionado a dinâmica folicular, cuja atividade influencia a duração do estro (GINTHER, 1992).

Durante o estágio de estro, o endométrio passa por algumas mudanças como edema endometrial e intensa atividade secretória que, juntamente com infiltrado de granulócitos e macrófagos no epitélio luminal, serão importantes para a limpeza uterina após cobertura (TUNON et al., 1995). No ovário, a atividade folicular é controlada pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) secretados pela hipófise anterior, cujo estímulo faz-se pelo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), um hormônio peptídico que é sintetizado e liberado por neurônios hipotalâmicos. Altas concentrações de LH estimula o desenvolvimento do folículo dominante, produzindo grande quantidade de E<sub>2</sub>, o qual promove um feedback positivo com o LH precedendo a ovulação (GINTHER, 2010). Após a ovulação, inicia-se o aumento dos níveis de P4 a medida em que ocorre a formação de um corpo lúteo, enquanto o estradiol (E<sub>2</sub>) diminui para níveis basais (DA COSTA, 2005).

Estro e diestro podem ser diferenciados por tônus uterino e cervical, ecotextura uterina e detecção ultrassonográfica de um corpo lúteo (GINTHER, 1995). Diestro é caracterizado pela ausência de edema endometrial e presença de um corpo lúteo visível. O desenvolvimento de edema endometrial é um fenômeno observado durante o estro e envolve ingurgitamento das dobras endometriais com fluido em resposta ao estrógeno folicular na ausência da P4 (PELEHACH et al., 2002). No entanto, a concentração da P4 parece não ser

o único fator a regular a presença de edema endometrial, haja visto que existe uma porcentagem pequena de éguas que demonstram pouco ou nenhum edema durante a fase folicular apesar da concentração basal de P4, chamado de ‘estro silencioso’ (GINTHER, 1989).

### **2.3. Uso de éguas receptoras em programas de transferência de embriões (TE)**

A recuperação embrionária realizada através de lavagem uterina, 7-9 dias após ovulação e seguida da transferência de embrião (TE) para uma égua receptora, tem sido a técnica reprodutiva assistida (TRA) mais comumente utilizada. Ela é utilizada no intuito de gerar mais de um produto anual de uma mesma égua e/ou evitar a necessidade da prenhez de doadoras que não são capazes de gestar, seja por problemas reprodutivos, clínicos ou porque estão participando de competições (CUERVO-ARANGO et al., 2019a).

Visto que éguas receptoras são a chave para o sucesso do programa de TE e que no início da estação de monta receptoras cíclicas nem sempre estão disponíveis, a utilização de éguas acíclicas como receptoras de embrião tem ganhado mais interesse (SILVA et al., 2014). No intuito de aumentar a oferta de éguas receptoras no programa de TE, tratamentos com estrógeno e P4 podem ser administrados em éguas receptoras acíclicas, sendo que o uso de receptoras durante a fase de anestro, permite prolongar o programa de TE, antecipando o início e terminando alguns meses depois (ROCHA FILHO et al., 2004).

Protocolos de sincronização envolvem o uso de  $PGF2\alpha$ , hormônios esteroides (estrógenos e progestágenos) e agentes indutores de ovulação como gonadotrofina coriônica humana (HcG) e agonistas de GnRH. A combinação entre estrógeno (p.e.  $17\beta$  estradiol, benzoato de estradiol ou cipionato de estradiol) e progestágenos (p.e. altrenogest ou progesterona) é utilizada na preparação de éguas acíclicas em anestro ou em transição, para sua sincronização com a doadora. Comumente usa-se  $PGF2\alpha$  sozinha na tentativa de retornar éguas cíclicas para o período de estro. (Rocha Filho, et al., 2004)

O embrião equino *in-vivo* é capaz de tolerar um amplo grau de assincronia negativa uterina (quando a égua receptora ovula dias após a doadora), com pequena diferença na probabilidade de prenhez para embriões transferidos em receptoras que ovularam numa janela entre 0 e 5 dias após a doadora (WILSHER et al., 2010; JACOB et al., 2012). Por outro lado, uma assincronia positiva (quando égua receptora ovula antes da doadora)

relativamente modesta (por exemplo, maior que 2 dias antes da ovulação da doadora), compromete significativamente a sobrevivência embrionária (WILSHER et al., 2012).

Hinrichis et al., (1987) demonstraram que a P4 sozinha pode ser utilizada como protocolo na preparação de receptoras ovariectomizadas; no entanto, Greco et al., (2012) tratou com cipionato de estradiol, éguas receptoras acíclicas antes da aplicação de P4 em comparação com receptoras cíclicas, e obtiveram maior taxa de gestação nas receptoras acíclicas.

Na tentativa de avaliar a influência de três diferentes protocolos com benzoato de estradiol (BE) anteriormente a aplicação de P4, em éguas receptoras acíclicas, Silva et al., (2016) utilizaram no primeiro grupo a dose única de 2,5mg; no segundo, 5mg totais em doses decrescentes e, no terceiro, 10 mg total em doses decrescentes e, observaram que os três protocolos de BE induziram pico similar de E<sub>2</sub> bem como edema uterino, concluindo que a dose de 2,5mg de BE seguida da aplicação de P4 seria a mais adequada para a preparação de receptoras acíclicas.

Cuervo-Arango et al., (2018a) demonstraram que a exposição prévia ao E<sub>2</sub> antes a dominância da P4, parece melhorar o ambiente uterino aumentando a sobrevivência embrionária.

#### **2.4. Associação entre duração do estro e fertilidade**

Mateu-Sánchez et al., (2016) demonstraram que um período de edema endometrial menor do que 4 dias durante a fase folicular, ou seja, IOI curto, está associado com menor taxa de prenhez em éguas Puro Sangue Inglês (PSI). Éguas com IOI menor (<5 dias) é esperado estro mais curto, devido ao período de P4 basal ser menor (entre a indução da luteólise e a próxima ovulação). Uma concentração de P4 periférica basal de (<1-2ng/mL) e alto nível de estrógeno circulante, são necessários para observação de ecotextura.

Segundo Cuervo-Arango et al., (2018a) otimizar a receptividade uterina não depende única e exclusivamente da duração da exposição a P4, já que demonstraram em receptoras cíclicas, uma correlação positiva entre a duração do período de estro imediatamente anterior a TE e a subsequente probabilidade de gestação. Esse trabalho confirma o relato de Canisso et al., (2013) em que éguas em estro com folículo > 35mm, foram tratadas com altrenogest por 2 dias consecutivos na tentativa de atrasar a ovulação, o que não ocorreu. Em

contrapartida, as éguas tratadas apresentaram redução na taxa de fertilidade, aparentemente pelo desaparecimento do edema endometrial e do comportamento de cio nos dias de tratamento, encurtando o período de estro.

Considerando que éguas receptoras são responsáveis por carregar a gestação a termo, e devido a característica de sazonalidade do ciclo estral, a utilização de receptoras acíclicas tem-se mostrado de grande valia. É importante proporcionar um ambiente uterino mais favorável ao desenvolvimento embrionário, mimetizando características do ciclo estral equino. Em relato prévio, Cuervo-Arango et al., (2018a) demonstraram que a duração do estro em éguas receptoras (duração do edema endometrial), antes da transferência de embrião *in vivo*, afeta a probabilidade de prenhez e a da mesma forma a possibilidade de continuidade da gestação. Aparentemente há um efeito positivo de probabilidade de prenhez após TE, com um estro precedente relativamente longo, devido a influência que o estrógeno promove no endométrio, criando um ambiente favorável a sobrevivência embrionária (CUERVO-ARANGO et al., 2019b).

Com o objetivo de avaliar se a maior exposição ao estrógeno antes da administração de P4 em éguas receptoras em anestro, alterariam o desenvolvimento e sobrevivência embrionária, receptoras foram submetidas a dois protocolos diferentes de BE – 2,5mg em dose única e 8mg totais em 5 dias de doses crescentes, ambos seguidos de uma aplicação de P4LA. As receptoras receberam um embrião viável, quatro dias após a P4 e, 48 horas após a transferência do embrião, procedeu-se a lavagem uterina na tentativa de recuperação embrionária. Apesar de não ter havido diferença no tamanho e morfologia nos embriões recuperados dos três grupos, houve tendência no grupo que recebeu BE por um período mais longo, em influenciar favoravelmente o ambiente uterino (OQUENDO JUNIOR et al., 2022).

A variação e duração da fase folicular caracterizada por baixa progesterona e alta concentração de estrógeno, pode afetar o padrão de transcrição endometrial de genes responsáveis pela receptividade uterina e desenvolvimento do concepto (CUERVO-ARANGO et al., 2018a).

## **2.5. Expressão gênica e endométrio receptivo**

A P4 secretada pelo corpo lúteo logo após a ovulação é o principal fator influenciador do estabelecimento da receptividade endometrial para a pré-implantação do concepto por estimular ou iniciar o complexo de alterações na expressão de genes envolvidos na secreção

de proteínas histotróficas ou codificando receptores endometriais (RUIJTER-VILLANI M. et al., 2015).

Na tentativa de estudar a dinâmica endometrial de expressão gênica no ciclo estral, Gebhardt, et al., (2012) analisaram amostras endometriais advindas de 5 diferentes períodos do ciclo estral, resultando em uma classificação de genes agrupados de acordo com sua expressão durante o ciclo estral. Nesse contexto, RNAm de *ESR1* e *FGF-9* expressaram-se aumentados na fase de estro; *PGR* teve maior expressão no dia da ovulação diminuindo na fase luteal inicial e, *P19* teve maior expressão na fase luteal média e tardia, sendo menor no dia da ovulação.

O estrógeno pode ligar-se e ativar dois tipos diferentes de receptores nucleares ( $ER_{\alpha}$  e  $ER_{\beta}$ ), codificados por diferentes genes, *ESR1* e *ESR2*, sendo o receptor de estrógeno  $\alpha$ , o receptor de estrógeno (ER) mais predominante no útero (SILVA et al., 2017). O estrógeno age via seus receptores mediando a proliferação celular e produzindo proteínas secretórias durante o período de estro. Além disso, é amplamente sabido que o estrógeno aumenta a expressão do seu próprio receptor e do receptor de progesterona (*PGR*) no endométrio durante o ciclo estral em éguas. A expressão de  $ER_{\alpha}$ ,  $ER_{\beta}$  e PR é inibida pela progesterona sendo, conseqüentemente, baixa no diestro médio e tardio bem como início de gestação (HARTT et al., 2005). Em equinos, a expressão endometrial do *PGR* diminui na fase luteal, particularmente no epitélio luminal e glandular e, a concentração de mRNA endometrial para *ESR1* revelou diferenças significativas durante o ciclo estral, aumentando no dia 16 e atingindo ponto máximo no dia 3 (GEBHARDT et al., 2012).

Na tentativa de elucidar como a duração a exposição ao estrógeno previamente a P4 afetaria a receptividade uterina, Silva et al., (2019) avaliou a expressão de 17 genes sabidamente envolvidos com a sobrevivência e desenvolvimento inicial do conceito através de biópsia endometrial no dia 4 após administração de P4 em receptoras acíclicas tratadas com protocolos diferentes de estrógeno. Dos genes avaliados, apenas *P19* (Uterocalina), *FGF-2* (Fator de Crescimento de Fibroblastos) e *IGF-1* (Fator de Crescimento semelhante a Insulina) expressaram-se diferentemente, tendo os dois primeiros (*P19* e *FGF-2*) demonstrado grande influência com relação a duração da exposição ao estrógeno. A proteína expressa pelo gene *P19* é membro da família das lipocalinas e é uma das principais proteínas progesterona-dependente. Ela é produzida no epitélio de glândulas endometriais, podendo ser detectada nessas células, 2 dias após a ovulação, sendo secretada durante a fase

luteal do ciclo estral e início da gestação. Sua secreção pode ser induzida por progesterona exógena. Apesar do mRNA da *P19* ter sido isolado somente nas células endometriais maternas, a uterocalina foi encontrada na cápsula do embrião, células do trofoblasto e no saco vitelínico. *P19* é uma proteína de transporte, podendo carrear moléculas pequenas e hidrofóbicas da mãe para o conceito através da capsula embrionária (CROSSETT et al., 1998).

A família dos Fatores de Crescimento de Fibroblastos (*FGF*) está envolvida em grandes eventos celulares, incluindo sobrevivência celular, proliferação, migração, diferenciação e angiogênese. Juntamente com fatores de crescimento vascular endotelial, *FGF-2* também é chave para regulação da angiogênese durante a placentação (ZHENG et al., 2008). *FGF-2* tem grande afinidade de ligação com quatro receptores de membrana tirosina quinases – FGFRs 1-4 (ORNITZ et al., 1996). *FGF-2*, *FGF-7* e *FGF-9* tem sido descrito com importantes fatores relacionados a receptividade uterina e implantação, e são conhecidos por serem regulados pelo estrógeno (RUIJTER-VILLANI et al., 2013).

Em comparação direta entre éguas dia 7 gestantes e éguas acíclicas que tiveram o útero exposto por período mais longo ao estrógeno antes da aplicação da P4, em trabalho realizado por Silva et al., (2019) a expressão do *FGF-2* foi similar, indicando redução na expressão desse gene durante uma gestação inicial. Durante a gestação, tanto o mRNA endometrial quanto a proteína para expressão de *FGF-2* aumentaram nos dias 21-28. Esse evento coincide com o período de perda da cápsula do blastocisto (dias 18-22), que até esse momento impediu o contato direto endométrio-concepto (GUPTA et al., 1997).

Os componentes do sistema IGF contribuem para a interação conceito-maternal durante a pré-implantação equina, tendo sido demonstrado a expressão de *IGF-1* e seu receptor *IGFR-1*, no endométrio de éguas cíclicas e gestantes, e nas membranas do conceito entre os dias 7 e 28 de gestação (GIBSON et al., 2022). Em éguas, o *IGF-1* tem origem tanto endometrial quanto embrionária no início da gestação, sendo que a secreção endometrial representa a maior fonte de *IGF-1*, o que significa grande contribuição para pré-implantação embrionária (WALTERS et al., 2001).

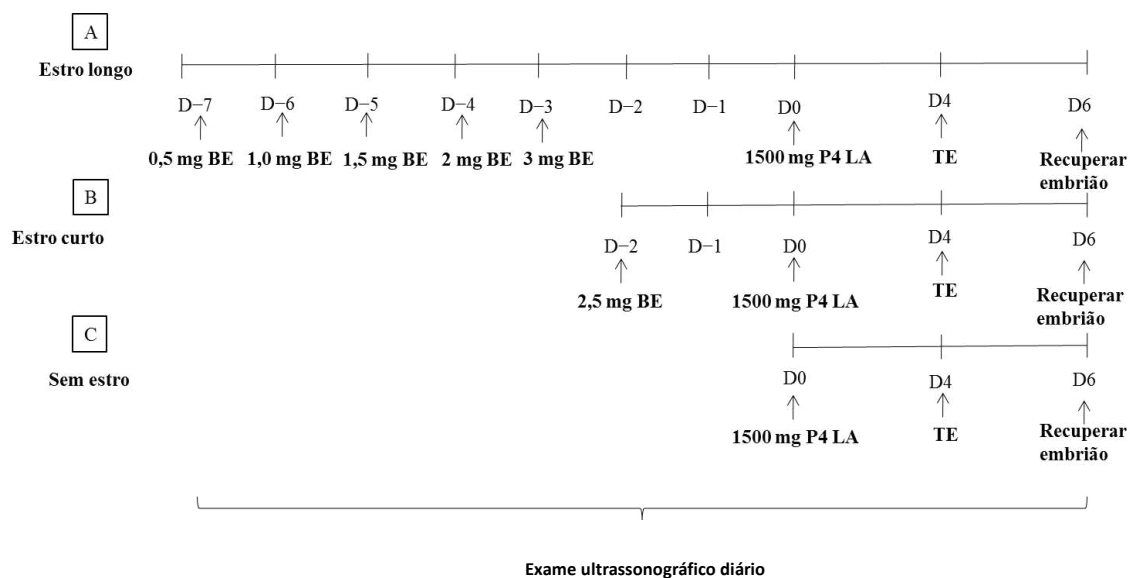
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Animais e tratamentos hormonais

Os fragmentos uterinos foram colhidos em pesquisa prévia realizada por Oquendo Júnior et al. (2021), em que 25 éguas receptoras mestiças (Lusitana, Mangalarga Marchador e sem raça definida) acíclicas, com idade entre cinco e 15 anos, pesando entre 350 e 400kg, foram submetidas a diferentes protocolos hormonais. As éguas foram mantidas em pastagem Tifton (*Cynodon dactylon*) com acesso à água e sal mineralizado. Todos os procedimentos relacionados aos animais foram realizados de acordo com a aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo 028/19).

As éguas acíclicas (todas em anestro) utilizadas como receptoras de embriões, em que as biópsias uterinas foram colhidas, foram divididas em três grupos de acordo com o protocolo hormonal recebido: I) 7 éguas no Grupo Estro Longo (EL), sendo expostas a sete dias de estrógeno anteriormente a aplicação de P4, por meio da aplicação de doses crescentes de benzoato de estradiol (BE) por cinco dias consecutivos, totalizando 8 mg e, três dias após a última dose de BE, receberam 1500 mg de P4 LA, chamado de dia zero (D0) - (Fig.1A); II) 5 éguas no Grupo Estro Curto (EC), em que foi administrado dose única de 2,5 mg de BE e 48 horas após, receberam 1500 mg de P4 LA (Fig.1B); III) 13 éguas no Grupo Sem Estro (SE), que receberam 1500 mg de P4 LA sem aplicação prévia de BE (Fig.1C). A transferência de embriões com 8 dias de idade foi realizada no quarto dia após a aplicação da P4 LA nas receptoras dos três grupos (Fig. 1).

Dois dias após a transferência dos embriões, ou seja, no dia seis (D6), lavados uterinos foram realizados nas éguas receptoras na tentativa de recuperar novamente os embriões transferidos. O grupo EL recebeu 7 embriões no D4 e recuperou 6 no D6; EC recebeu 8 embriões no D4 e recuperou 5 no D6 e, grupo SE recebeu 13 embriões e recuperou 6 no lavado do D6. Desta forma, das 25 éguas que receberam o embrião no D4, 15 tiveram recuperação positiva no D6 e 10 negativa. Após os lavados, independente da recuperação embrionária, biópsias uterinas foram colhidas de todas as receptoras, de acordo com o descrito no item 3.2.



**Figura 1:** Representação esquemática das aplicações hormonais realizadas nos três diferentes grupos: Estro longo; Estro Curto e Sem estro.

### 3.2 Coleta de biópsia endometrial

Foram colhidas biópsias endometriais da base de um dos cornos uterinos pelo método transcervical, utilizando pinça de biópsia (Botupharma®, Botucatu, SP, Brasil), após seis dias da administração de P4LA, imediatamente após o lavado uterino. Os fragmentos foram congelados, o mais rápido possível, em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para a realização da reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR). A técnica de RT-qPCR foi realizada no Laboratório de Genética do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

### 3.3 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

A extração de RNA total das amostras endometriais foi realizada pelo método TRIZOL (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento de RNA total, Sigma-Aldrich) seguindo as recomendações do fabricante. O RNA foi tratado com 1U/1 $\mu\text{g}$  de RNA de DNase I RNase free (Promega), seguindo as recomendações do fabricante e quantificado em Nanodrop (espectrofotômetro ND-1000) a 260 nm. Para a síntese do cDNA (RT), foram utilizadas as enzimas M-MLV transcriptase reversa (Promega) e Oligo dT (15) (Invitrogen), seguindo instruções dos fabricantes. Como controle, foi utilizada uma amostra



sem o cDNA. A qualidade do cDNA foi testada com os genes de controle endógeno *PGK1* e *SRP14*. Os primers dos genes avaliados neste estudo estão listados na Tabela 1 e sua eficiência foi demonstrada anteriormente (*ESR1*, *PGR*, *IGF1*, *FGF2*, *P19*, *SRP14* and *PGK1* - SILVA et al, 2019; SILVA et al., 2021; *IGF1R* - KALPOKAS et al., 2021). As reações de qPCR foram realizadas simultaneamente para os genes alvo (*ESR1*, *FGF2*, *IGF1*, *IGF1R*, *PGR* e *P19*) e os genes normalizadores (*PGK1* e *SRP14*) em placas de leitura óptica de 96 poços, com triplicata biológica e duplicata técnica. Nas reações para os genes *ESR1*, *FGF2*, *IGF1*, *IGF1R*, *PGR*, *P19*, *PGK1* e *SRP14*, foram utilizados 1X SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 5 pmol de cada primer, 1 µL de cDNA, completando com água ultrapura autoclavada (DirectQ Millipore) até o volume final de 10 µL. As reações de PCR foram processadas no 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 30 segundos.

O CT (Cycle Threshold) foi definido de acordo com o primeiro ciclo em que ocorre um aumento significativo na magnitude do sinal gerado, detectado na reação de PCR. Os valores de CT foram calculados pelo 7300 System Software (Applied Biosystems) e foram utilizados para calcular a expressão de mRNA dos genes de interesse (*ESR1*, *FGF2*, *IGF1*, *IGF1R*, *PGR* e *P19*) em relação ao mRNA dos genes normalizadores (*PGK1* e *SRP14*). A expressão genica relativa em cada grupo foi calculada obtendo a média do CT dos genes alvo, subtraída da média geométrica dos genes endógenos *PGK1* e *SRP14*, resultando nos valores do delta CT ( $\Delta$ CT).

Tabela 1: Sequência dos *primers* e temperatura de anelamento em graus Celsius.

Gene	T (°C)	Forward	Reverse
<i>ESR1</i>	60	TCCATGATCAGGTCCACCTTCT	GGTGTCTGTCATCTTGTCCA
<i>PGR</i>	60	GTCAGTGGACAGATGCTGTA	CGCCTTGATGAGCTCTCTAA
<i>IGF1</i>	60	ACGCTCTTCAGTTCGTGTGT	CAGCCTCCTCAGATCACAGC
<i>IGF1R</i>	60	TCCAGACAGGAGTACAGG AA	AGAAGAACACGGGATCCGTCCA
<i>FGF2</i>	60	GAACCGTTATCTTGCTATGAAGG	CCAACCTGGAGTATTTCTTGAC
<i>P19</i>	64	TGAGCCGAAATTCATAGCGA	CCTCTTACCTTTCTGTGGAAGTG
<i>PGK1</i>	54	CTGTGGGTGTATTTGAATGG	GACTTTATCCTCCGTGTTCC
<i>SRP14</i>	55	CTGAAGAAGTATGACGGTCCG	CCATCAGTAGCTCTCAACAG

### 3.4 Análise estatística

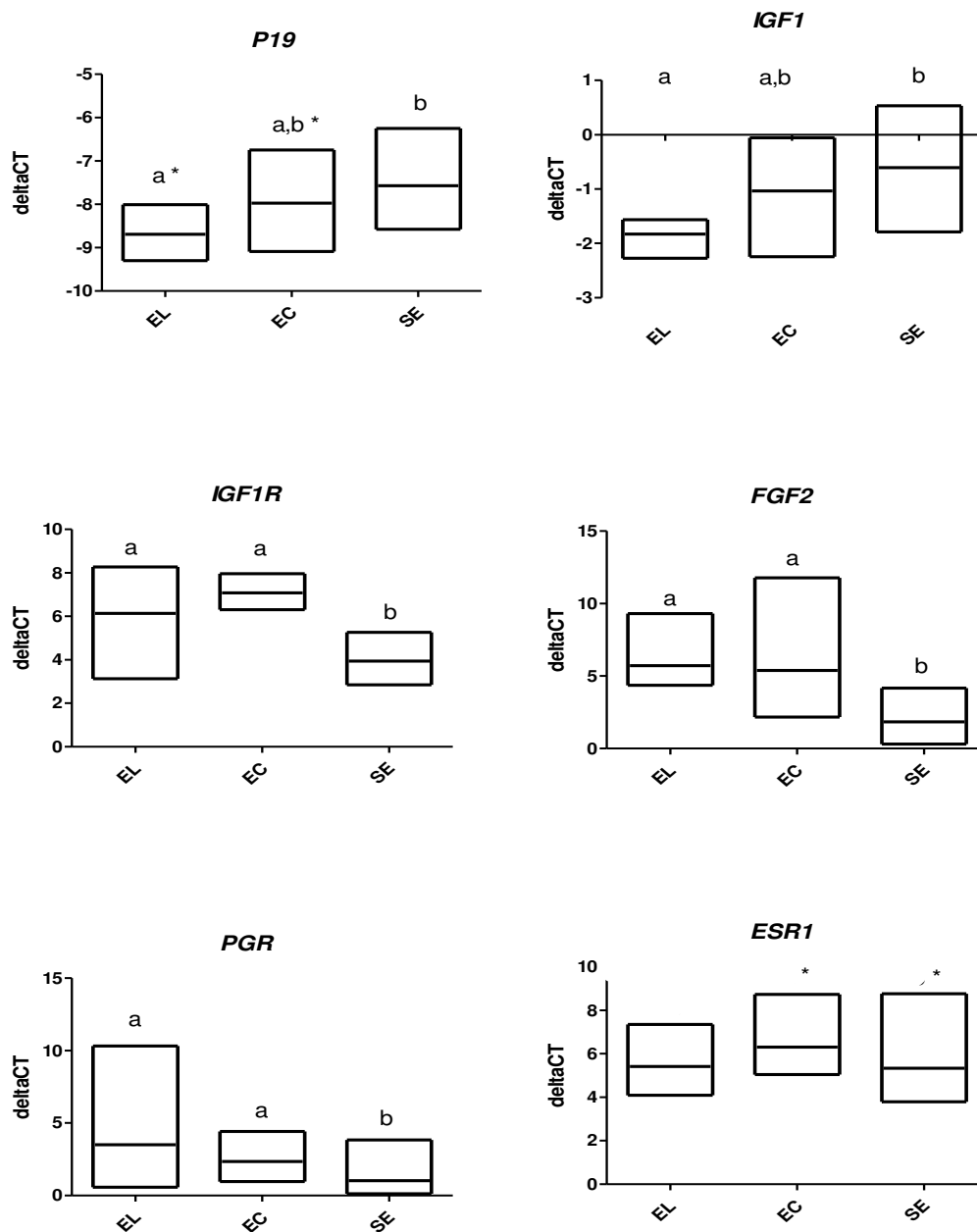
Inicialmente foi testada a distribuição das amostras (teste de Kolmogorov-Smirnov) e para os dados que apresentaram distribuição paramétrica foi utilizado teste ANOVA (T-student) (*P19*, *FGF-2* e *ESR-1*) e para distribuição não paramétrica foi utilizado o teste de Kruskal Wallis (*IGF-1*, *IGF1R* e *PGR*). Para comparação entre grupos com relação a presença ou ausência de embrião no lavado de recuperação embrionária no D6, foi usado o teste de regressão logística binária. Foi considerada diferença estatística quando  $P < 0,05$  e tendência quando  $0,05 \leq P \leq 0,1$ .

## 4. RESULTADOS

A expressão endometrial do gene *P19* mostrou-se 1,14 vezes mais aumentada ( $P < 0,05$ ) no grupo EL quando comparado ao grupo SE e, entre os grupos que receberam estrógeno houve tendência ( $0,05 \leq P \leq 0,1$ ) a maior expressão no grupo EL versus EC (Fig. 1). Porém não houve diferença na expressão da uterocalina entre os grupos estro curto e sem estro. Da mesma forma, foi observada maior expressão (2,9 vezes) do gene *IGF-1* no grupo EL em comparação ao grupo SE ( $P < 0,05$ ), porém não houve diferença entre os grupos EL e EC ou EC e SE ( $P > 0,05$ ; Fig.1)

Foi observado menor expressão ( $P < 0,05$ ) dos genes *FGF-2* e *IGF1R* e *PGR* em ambos os grupos que receberam estrógeno (EL e EC), de pelo menos 2,9, 1,5 e 2,3 vezes menor respectivamente, quando comparado ao grupo SE (pelo menos); (Fig 1). O gene *ESR1* demonstrou tendencia a maior expressão no grupo sem estro versus estro curto (Fig. 1)

Não houve diferença na expressão dos genes avaliados quando a recuperação embrionária, positiva ou negativa, foi levada em consideração ( $P > 0,05$ ).



**Figura 2.** Box plots da expressão dos genes *P19*, *IGF1*, *IGF1R*, *FGF2*, *PGR* e *ESR1* no dia 6 após administração da progesterona de longa ação (P4 LA) nos grupos: estro longo (EL) com 7 éguas, estro curto (EC), 8 éguas e, grupo sem estro (SE), 13 éguas. Baixo delta CT ( $\Delta$ CT) representa maior expressão gênica. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) e asterisco indica tendência ( $0,05 \leq P \leq 0,1$ ).

## 5 DISCUSSÃO

O resultado do atual estudo demonstrou que em éguas receptoras acíclicas, a exposição do útero por mais tempo ao tratamento com estrógeno previamente a exposição a P4, aumentou a expressão de genes previamente conhecidos por favorecer a sobrevivência embrionária bem como diminuiu os genes desfavoráveis a sobrevivência do embrião.

O gene *P19*, que apresentou maior expressão no grupo EL em comparação ao SE e mostrou tendência entre os grupos que receberam estrógeno, é uma lipocalina progesterona-dependente conhecida por seu envolvimento no transporte de ácidos graxos e lipídeos para o embrião (SUIRE et al., 2001). Na gestação inicial de equinos ocorre a formação de uma cápsula acelular glicoproteica em torno do embrião ao adentrar o lúmen uterino por volta do 6-7 dia de gestação (ALLEN, 2000). O concepto equino mantém-se cercado por essa capsula glicoproteica até aproximadamente 22 dias de gestação, não havendo contato direto célula-célula. A diferenciação dos órgãos está em processo antes que a cápsula se desfaça e a implantação ocorra, portanto, lipídeos essenciais a sinalização e aos eventos morfológicos devem ser captados intactos pelo embrião durante a fase de pré-implantação – sendo o endométrio uterino a única fonte provedora por si só (SUIRE et al., 2001). Dessa forma, a gestação dos equinos é caracterizada por um longo período de pré-implantação e, diferentemente dos primatas e roedores em que o embrião se implanta no estágio de blastocelo, o concepto equino passa pela gastrulação e organogênese inicial antes da interdigitação entre membranas do concepto e do endométrio que ocorre por volta dos 40 dias após ovulação (ALLEN, 2000). A cápsula do embrião equino é relativamente permeável, permitindo a difusão de moléculas até o tamanho 200kDa; sendo a *P19* uma lipocalina de 19kDa, seria possível que ela atravessasse a cápsula embrionária explicando sua presença na membrana do concepto (CROSSETT et al., 1998). O resultado deste estudo corrobora com Silva et al. (2019), em que demonstraram elevada expressão endometrial de *P19* no dia 4 após aplicação de P4, em éguas receptoras acíclicas tratadas 7 dias com estrógeno previamente a progesterona quando comparado a 2 ou nenhum dia de tratamento.

Outro gene que resultou em maior expressão endometrial no grupo LE quando comparado ao SE foi o *IGF-1*. O sistema fator de crescimento de insulina (*IGF*) é conhecido por participar no endométrio de forma importante para o sucesso da implantação bem como no concepto para o desenvolvimento e crescimento placentário sendo o RNAm encontrado já no dia 8 de gestação, tanto no endométrio quanto no concepto. Eles regulam crescimento,

diferenciação, migração e proliferação celular e, inibem apoptose via caminhos parácrinos e autócrinos (GIBSON ET AL., 2022). Ainda no mesmo estudo, Gibson et al., (2022) relatam que o *IGF1* é produzido pelo endométrio e pelo concepto entre os dias 7 e 28 de prenhez. No entanto, no equino a expressão endometrial do *IGF1* parece não ser regulada pela P4 ou fatores relacionados ao concepto, já que os níveis de mRNA mostraram-se estáveis tanto no ciclo estral quanto na gestação inicial. A sua ação é mediada via receptor tipo 1 (IGFR-1) e receptor de insulina (INSR). Silva et al., (2019) demonstraram que a expressão do *IGF-1* em receptoras acíclicas também tratadas previamente com estrógeno, foi menor no grupo que teve menor exposição ao estrógeno em comparação aos grupos de longa ou nenhuma exposição, indicando não haver associação com a duração da exposição ao estradiol. No entanto, no presente estudo, as coletas de amostras endometriais foram realizadas no dia 6 após aplicação da P4LA, podendo ser esse um dos motivos do aumento na expressão do *IGF-1* e/ou pela adicional presença do embrião no útero. Em contraste, o *IGFR-1*, diferentemente do *IGF-1*, teve menor expressão nos grupos que receberam estrógeno quando comparado ao grupo sem estro. Mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar a influência dos hormônios ovarianos sobre a expressão desses genes no endométrio equino.

Fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) regulam diversas funções biológicas, incluindo proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação celular (YUN et al., 2010). Alguns foram inclusive sugeridos de participar de forma importante na implantação (POWERS et al., 2007). A expressão do RNAm *FGF-2* no endométrio equino é constante durante a fase da progesterona e aumenta durante o estro (RUIJTER-VILLANI et al., 2013) sugerindo ser regulado por estrógenos. Durante a prenhez, tanto o mRNA endometrial quanto a expressão proteica de *FGF-2* aumentam aproximadamente nos dias 21 e 28 que condiz com a perda da capsula do blastocisto (18-22). No presente estudo, *FGF-2* apresentou menor expressão nos grupos tratados com estrógeno quando comparado ao grupo que não recebeu o hormônio, o que corrobora com o trabalho de Silva et al., (2019) cujas éguas tratadas com estrógeno também apresentaram menor expressão gênica, ainda que o dia da biópsia uterina tenha sido diferente e não houvesse a possibilidade da presença do embrião. Em estudo em ratos, LI et al., (2011) demonstraram que a expressão do fator *Hand2* no estroma uterino, induzido pela P4, suprime a produção de vários FGFs, dentre eles o *FGF-2*, os quais agem como mediadores parácrinos dos efeitos do estrógeno no epitélio. Em útero de ratos com ausência do fator *Hand2*, a contínua produção dos FGFs no

estroma manteve a proliferação epitelial e estimulou caminhos de indução do estrógeno, resultando em falha na implantação, já que a receptividade uterina é marcada pelo cessar da proliferação de células epiteliais antes da implantação. Sendo assim, é possível que uma diminuição na expressão de *FGF-2* no início da gestação seja benéfico para o desenvolvimento embrionário.

No endométrio equino, o estrógeno é responsável por aumentar a expressão do seu próprio receptor e dos receptores de P4 (*PGR*) durante o estro (GEBHARDT et al., 2012). Em contrapartida, a expressão endometrial de *PGR* diminui durante a fase luteal, particularmente no epitélio luminal e glandular (HARTT et al., 2005). Tem-se como pré-requisito para o estabelecimento da receptividade uterina, a contínua exposição do endométrio a P4, responsável por suprimir a expressão do *PGR* no epitélio uterino (RUIJTER-VILLANI et al., 2015). Diferentemente do estudo de Silva et al., (2019) cuja diferença na duração a exposição ao estrógeno em éguas receptoras acíclicas, não interferiu na expressão dos receptores *ESR1* e *PGR* quatro dias após a administração de P4; no atual estudo, em que amostras foram coletadas no dia 6 após a P4, foi observado menor expressão de *PGR* nos grupos tratados previamente com estrógeno, quando comparado ao grupo que não recebeu o hormônio. Esse resultado pode ter sido influenciado tanto pelo fato do embrião ter sido transferido 48h antes da biópsia, quanto por mais dias de exposição a P4. Em contraste, não houve efeito significativo na expressão de *ESR1* quando comparado entre os grupos tratados ou não com estrógeno previamente a exposição a P4.

O fato de não ter sido observado diferença na expressão gênica com relação a recuperação embrionária positiva ou negativa, pode dar-se devido a união de fatores como: seleção de apenas alguns genes; número relativamente pequeno de amostras, tanto de éguas quanto embriões; tempo de exposição do embrião ao útero da receptora.

## 6 CONCLUSÃO

Como conclusão, a longa exposição do útero ao estrógeno previamente a administração de P4, parece favorecer o ambiente uterino através da expressão dos genes *P19*, *IGF-1*, *FGF-2* e *PGR*.

## 7 REFERÊNCIAS

ALLEN, W. R. The physiology of early pregnancy in the mare. **Proceedings of American Association of Equine Practitioners**, v. 46, p. 338–54, 2000. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=e7666708de74fe3bd0937880ecb1e30d8f4782de

AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, p. 220-228, 2011. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2011.02.005.

CANISSO I. F.; GALLACHER K.; GILBERT M. A.; KORN A.; SCHWEIZER C. M.; BEDFORD-GUAUS S. J.; GILBERT R. O. Preovulatory progestagen treatment in mares fails to delay ovulation. **Veterinary Journal**, n. 197 p. 324-328, 2013. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.12.028.

CROSSETT B.; SUIRE S.; HERRLER A.; ALLEN W. R.; STEWART F. Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the development equine conceptus. **Biology of reproduction**, New York, v. 59 p. 483–490, 1998. DOI: 10.1095/biolreprod59.3.483.

CUERVO-ARANGO J.; NEWCOMBE J. R. Cloprostenol in equine reproductive practice: Something more than a luteolytic drug. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v.45(5), p.8–11, 2009. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01508.

CUERVO-ARANGO J.; et al. The effect of the interval from PGF treatment to ovulation on embryo recovery and pregnancy rate in the mare. **Theriogenology**, Stoneham v. 83(8), p. 1272–1278, 2015. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.01.010.

CUERVO-ARANGO J.; et al. Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 50 (3), p. 386-90, 2018. [DOI: 10.1111/evj.12739](https://doi.org/10.1111/evj.12739).

CUERVO-ARANGO J.; CLAES A. N.; STOUT T. A. E. Small day 8 equine embryos cannot be rescued by a less advanced recipient mare uterus. **Theriogenology**, Stoneham v. 126, p. 36-40, 2019. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.11.02.

DA COSTA R. P.; BRANCO V.; PESSA P.; SILVA J. R.; FERREIRA-DIAS G. Progesterone receptors and proliferating cell nuclear antigen expression in equine luteal tissue. **Reproduction, Fertility and Development**, Clayton, n. 17, p. 659–666, 2005. DOI: 10.1071/RD05024.

DE RUIJTER-VILLANI M.; VAN BOXTEL P. R.; STOUT T. A. Fibroblast growth factor-2 expression in the preimplantation equine conceptus and endometrium of pregnant and cyclic mares. **Theriogenology**, Stoneham v. 80, p. 979-89, 2013. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.07.024.

DE RUIJTER-VILLANI M.; VAN BOXTEL P. R.; STOUT T. A. Fibroblast growth factor 7 stimulates trophoblast proliferation during early equine pregnancy. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v. 34, p. 170, 2014. DOI: 10.1016/j.jevs.2013.10.125.

DE RUIJTER-VILLANI M.; STOUT T. A. E. The role of conceptus-maternal signalling in the acquisition of uterine receptivity to implantation in mammals. **Reproduction in domestic animals**, Germany, v.50(3), p.7–14, 2015. DOI: 10.1111/rda.12527.

FREEDMAN L.J.; GARCIA M.C.; GINTHER O.J. Influence of photoperiod and ovaries on seasonal reproductive activity in mares. **Biology of Reproduction**, Wisconsin, v.20, p.567-574, 1979.

GEBHARDT S.; MERKL M.; HERBACH N.; WANKE R.; HANDLER J.; BAUERSACHS S. Exploration of global gene expression changes during the estrous cycle in equine endometrium. **Biology of Reproduction**, New York, v. 87 (6), p. 1-13, 2012. DOI: 10.1095/biolreprod.112.103226

GIBSON C.; DE RUIJTER-VILLANI M.; STOUT T. A. E. Insuline-like growth factor system components expressed at the conceptus-maternal interface during the establishment



of equine pregnancy. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 1-15, 2022. DOI: 10.3389/fvets.2022.912721.

GINTHER O. J. Occurrence of anestrus estrus, diestrus and ovulation over a 12-month period in mares. **American Journal of veterinary research**, v. 35 (9), p. 1173-1179, 1974.

GINTHER O. J.; PIERSON R. A. Regular and irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v. 9, p. 4–12, 1989.

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

GINTHER O. J. (ed.). Uterus (Chapter 6). *In: Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Book 2 (horses)*: Equiservices Publishing, Cross Plains, Wisconsin, USA, 1995. Cap 6.

GINTHER O. J.; ALMAMUN M.; SHAHIDUZZAMAN A. K.; BEG M. A. Disruption of the periovulatory LH surge by a transient increase in circulating 17betaestradiol at the time of ovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 117, p. 178–182, 2010. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2009.04.003](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.04.003).

GRECO M. G.; BURLAMAQUI F. L. G.; PINNA A. E.; QUEIROZ F. J. R.; CUNHA M. P. S.; BRANDÃO F. Z. **Revista brasileira de zootecnia**, Viçosa, v. 41(3), p. 607-611, 2012. DOI: 10.1590/S1516-3598201000300019.

GUPTA S. K.; JETHANANDANI P.; AFZALPURKAR A.; KAUL R.; SANTHANAM R. Prospects of zona pellucida glycoproteins as immunogens for contraceptive vaccine. **Human Reproduction Update**, v. 3, p. 311-324, 1997. DOI: 10.1093/humupd/3.4.311.

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. 241-50, 2005. DOI: 10.1530/rep.1.00596.

JACOB, J. C. F.; HAAG K. T.; SANTOS G. O.; OLIVEIRA J. P.; GASTAL M. O.; GASTAL E. L. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, Stoneham v. 77, p. 1159-1166, 2012. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.10.022.

KLEIN C.; SCOGGIN K. E.; EALY A. D.; TROEDSSON M. H. T. Transcriptional profiling of equine endometrium during the time of maternal recognition of Pregnancy1. **Biology of Reproduction**, New York, v. 83, p. 102-13, 2010. DOI: 10.1095/biolreprod.109.081612.

LI Q.; KANNAN A.; DEMAYO F. J.; LYNDON J. P.; COOKE P. S.; YAMAGISHI H.; SRIVASTAVA D.; BAGCHI M. K.; BAGCHI I. C. The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. **Science**, v. 331, p. 912-916, 2011. DOI: 10.1126/science.1197454.

MATEU-SÁNCHEZ; et al. The period of the follicular phase during which the uterus of mares shows estrus-like echotexture influences the subsequent pregnancy rate. **Theriogenology**, Stoneham v.86, p.1506-15, 2016. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.009.

OQUENDO JUNIOR P. S.; SILVA E. S. M.; OQUENDO F. M. G.; CUERVO-ARANGO J.; BELETTI M. E. 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**, Germany, v. 00 , p. 1-4, 2022. DOI: 10.1111/rda.14220.

ORNITZ D. M.; XU J.; COLVIN J. S.; MCEWEN D. G.; MACARTHUR C. A.; COULIER F.; et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 271, p. 15292–7, 1996. DOI: 10.1074/jbc.271.25.15292.

PELEHACH L. M.; GREAVES H. E.; PORTER M. B.; DESVOUSGES A.; SHARP D. C. The role of estrogen and progesterone in the induction and dissipation of uterine edema in mares. **Theriogenology**, Stoneham v. 58, p. 441-444, 2002. DOI: 10.1016/S0093-691(02)00765-3.

POWERS C. J.; MCLESKEY S. W.; WELLSTEIN A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. **Endocrine-related cancer**, Bristol, v. 7, p. 165–97, 2007. DOI: 10.1677/erc.0.0070165.

PUGLIESI G.; NETO A. L.; BISINOTTO D. Z. Anatomy, endocrinology and reproductive seasonality of the mare. In: LUZ M. R.; CELEGHINI E. C. C.; BRANDÃO F. Z. **Animal Reproduction - equine**. 1.ed. São Paulo: Manole, 2024. cap. 1, p. 7-8.

SANTOS V. G.; BETTENCOURT E. M. V.; GINTHER O. J. Long-term characteristics of idiopathic persistent corpus luteum in the mare. **Theriogenology**, Stoneham v. 84, p.242–51, 2015. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.03.015.

SILVA E. S.; SCOGGIN K. E.; CANISSO I. F.; TROEDSSON M. H.; SQUIRES E. L.; BALL B. A. Expression of receptors for ovarian steroids and prostaglandin E2 in the endometrium and myometrium of mares during estrus, diestrus and early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 151(3-4), p. 169-81, 2014. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.11.001.

SILVA E. S. M.; ROSER J. F.; GOMES A. R. C.; FRITSCH S. C.; PANTOJA J. C. F.; OLIVEIRA-FILHO J. P.; MEIRA C. Comparison of different regimens of estradiol benzoate treatments followed by long-acting progesterone to prepare noncycling mares as embryo recipients. **Theriogenology**, Stoneham v. 86, p. 1749-1756, 2016. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.04.

SILVA E. S. M.; IGNACIO F. S.; FRITSCH S. C.; ZANONI D. S.; 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**, Stoneham v. 97, p. 159-69, 2017. [DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.04.031](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.031)

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**, Stoneham v. 131, p. 96-105, 2019. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.03.025.

SUIRE S.; STEWART F.; BEAUCHAMP J.; KENNEDY M. W. Uterocalin, a lipocalin provisioning the preattachment equine conceptus: fatty acid and retinol binding properties, and structural characterization. **Biochemical Journal**, London, v. 356, p. 369-76, 2001. [DOI:10.1042/bj3560369](https://doi.org/10.1042/bj3560369)

TUNON A. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H.; HAGLUND A.; ALBIHN A.; MAGNUSSON U.; EINARSSON S. Ultrastructure of the secretory endometrium during estrus in young maiden and foaled mares. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 27, p. 382–388, 1995. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1995.tb04074.

TURNER D. D.; GARCIA M. C.; GINTHER O. J. Follicular and gonadotropic changes throughout the year in pony mares. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, p. 1694–700, 1979.

WALTERS K. W.; ROSER J. F.; ANDERSON G. B. Maternal-conceptus signaling during early pregnancy in mares: oestrogen and insulin-like growth factor I. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, p. 331-338, 2001. DOI: 10.1530/rep.0.1210331.

WILSHER S.; CLUTTON-BROCK A.; ALLEN W. R. Successful transfer of day 10 horse embryos: influence of donor-recipient asynchrony on embryo development. **Reproduction research**, v.139, p. 575-585, 2010. DOI: 10.1530/REP-09-0306

YUN Y. R.; WON J. E.; JEON E.; LEE S.; KANG W.; JO H.; JANG J. H.; SHIN U. S.; KIM H. W. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue

regeneration. **Journal of Tissue Engineering**, London, v. 1, 2010. DOI: 10.4061/2010/218142

ZHENG J.; WEN Y.; SONG Y.; WANG K.; CHEN D. B.; MAGNESS R. R. Activation of multiple signaling pathways is critical for fibroblast growth factor 2- and vascular endothelial growth factor-stimulated ovine fetoplacental endothelial cell proliferation. **Biology of Reproduction**, New York, v. 78 p. 143–50, 2008.



Universidade Federal de Uberlândia



## CERTIFICADO

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

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

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

Uberlândia, 18 de Julho de 2019.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU Coordenador da CEUA

Portaria Nº 542 DE 10 DE MAIO DE 2019