

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE ESTRADIOL  
SEGUIDO DE PROGESTERONA SOBRE A EXPRESSÃO DE RECEPTORES  
ENDOMETRIAIS DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM  
ÉGUAS RECEPTORAS ACÍCLICAS**

SAMUEL CATUCI FRITSCH

Botucatu – SP

MAIO/2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE ESTRADIOL  
SEGUIDO DE PROGESTERONA SOBRE A EXPRESSÃO DE RECEPTORES  
ENDOMETRIAIS DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM  
ÉGUAS RECEPTORAS ACÍCLICAS**

SAMUEL CATUCI FRITSCH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Cezinande de Meira

Co-orientador: Prof. Dr. José Paes de  
Oliveira Filho

Botucatu – SP

MAIO/2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Fritsch, Samuel Catuci.

Efeito da administração de diferentes doses de estradiol seguido de progesterona sobre a expressão gênica e proteica dos receptores endometriais de estrógeno e progesterona em éguas receptoras acíclicas / Samuel Catuci Fritsch. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Cezinande de Meira

Coorientador: José Paes de Oliveira Filho

Capes: 50504002

1. Equino - Transferência de embriões. 2. Reprodução animal. 3. Hormônios. 4. Protocolos hormonais. 5. Progesterona. 6. Expressão gênica. 7. Estrógenos - Receptores. 8. Estradiol.

Palavras-chave: Equinos; Protocolos hormonais; Transferência de embriões.

**Nome do Autor:** Samuel Catuci Fritsch

**Título:** EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE ESTRADIOL SEGUIDO DE PROGESTERONA SOBRE A EXPRESSÃO DE RECEPTORES ENDOMETRIAIS DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM ÉGUAS RECEPTORAS ACÍCLICAS

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Prof. Dr. Cezinande de Meira**

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP – Botucatu/SP

**Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza**

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu/SP

**Profa. Dra. Fernanda Saules Ignácio**

Membro

Área de Reprodução Animal

Faculdades Integradas de Ourinhos – Ourinhos/SP

Data da Defesa: 03 de maio de 2016.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos animais, que me estimulam a aprender cada vez mais  
para que possa conseguir aliviar a sua dor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Enio Fritsch e Lucia Catuci, e aos meus dois irmãos, Tiago e David, pelo amor incondicional e por sempre me incentivarem a lutar e trabalhar em busca dos meus sonhos.

Ao Prof. Cezinande de Meira, pela grande oportunidade de orientação a mim concedida, por todos os ensinamentos ao longo destes dois anos e meio, pelo companheirismo, prontidão, confiança e amizade.

À colega Elisa Sant' Anna Monteiro da Silva, pelo companheirismo, amizade e principalmente pela inestimável ajuda durante todo o projeto.

Aos pós-graduandos: Priscila Emiko Kobayashi e Diogo Souza Zanoni, pela ajuda e prontidão com a técnica de imunohistoquímica e avaliação das lâminas.

Agradeço também à professora Renée Laufer Amorim por disponibilizar gentilmente o Laboratório de Imunohistoquímica do Setor de Patologia Veterinária, para que pudesse realizar a técnica.

Agradeço ao professor José Paes de Oliveira Filho, por sua orientação, pelos conhecimentos e por ceder o Laboratório de Biologia Molecular da Clínica Veterinária para que pudesse realizar a técnica de RT-qPCR.

A minha amada esposa Izadora Bittencourt e ao nosso primogênito Matheus José Bittencourt Fritsch, por todos os momentos compartilhados de sabedoria, amizade e amor; por compreender e sempre me incentivar nos meus estudos e investidas profissionais.

A todos os amigos de Botucatu e principalmente da república Ilha Quadrada (Raíssa Karolliny Salgueiro Cruz, João Alexandre Matos Carneiro e Gustavo Viana) os quais foram fundamentais para que eu atingisse meus objetivos.

A FMVZ – Unesp/Botucatu, pela oportunidade de cursar a Pós-graduação, por ceder suas instalações e serviços para que esse trabalho pudesse ser realizado e a CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro e a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) por todo apoio ao grupo de pesquisa.

Por fim, agradeço a todos os colegas, professores e servidores do Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP/Botucatu, por todos os ensinamentos transmitidos e agradável convivência neste período.

## LISTA DE ABREVIATÖES

B2M – Beta-2-microglobulina  
BE – Benzoato de estradiol  
cDNA – Ácido Desoxirribonucléico complementar  
CL – Corpo Lúteo  
E2 – Estradiol  
ER – Receptor de Estrógeno  
ER $\alpha$  - Receptor de Estrógeno Alfa  
ER $\beta$  - Receptor de Estrógeno Beta  
ESR1 – Transcritos para o Receptor de Estrógeno Alfa  
ESR2 - Transcritos para o Receptor de Estrógeno Beta  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio  
hCG – Gonadotrofina Coriônica Humana  
HE – Hematoxilina-Eosina  
IHQ – Imunohistoquímica  
kg – Quilograma  
mg – Miligrama  
MHz – Megahertz  
min – Minuto (s)  
mL – Mililitro  
mm – Milímetro  
ng - Nanograma  
P4 – Progesterona  
P4 LA – Progesterona de Longa Ação  
PGR – Transcritos para o Receptor de Progesterona  
PGF<sub>2</sub> $\alpha$  – Prostaglandina 2 $\alpha$   
pH – Potencial Hidrogeniônico  
RNA – Ácido Ribonucléico  
RNAm – Ácido Ribonucléico Mensageiro  
RT-qPCR – Transcriptidase Reversa Quantitativa PCR  
UI – Unidade Internacional  
 $\mu$ L – Microlitro  
 $\mu$ m – Micrômetro

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

- Tabela 1** - Sequências dos primers e número de acesso ao gene utilizado para a transcrição dos receptores para estrógeno  $\alpha$  (ESR1), estrógeno  $\beta$  (ESR2), progesterona (PGR) e  $\beta$ -2-microglobulina (B2M)..... 38
- Tabela 2** - Medianas dos escores de edema e tônus uterinos de éguas acíclicas tratadas com Benzoato de Estradiol (BE) seguido da administração de 1500 mg de P4 LA no D0, bem como as medianas dos escores de edema e tônus uterinos de éguas cíclicas nos correspondentes dias de tratamento..... 40



## LISTA DE FIGURA

### CAPÍTULO II

- Figura 1** - Esquema representativo dos momentos de administração do benzoato de estradiol (BE) seguido da progesterona de longa ação (P4 LA) nos grupos tratados: (A) 10 mg de BE + P4 LA, (B) Priming Hormonal, (C) 5 mg de BE + P4 LA e seus momentos equivalentes nas éguas cíclicas (D)..... 36
- Figura 2** – Mudanças na expressão relativa dos transcritos para receptor de progesterona – PGR, 24 horas após a última aplicação do BE ( a; M2/M1), cinco dias após a aplicação de P4 LA em relação a última aplicação do BE ( b; M3/M2) e cinco dias após a aplicação de P4 LA em relação à imediatamente antes do início do tratamento com BE (b; M3/M1), nos grupos tratados ou nas cíclicas 48 horas após a aplicação de prostaglandina (M1), a segunda amostra (M2) foi colhida no estro, e a terceira amostra (M3) foi obtida no diestro quando a égua apresentava tônus uterino, cinco dias após a ovulação 1D). Os dados são expressos como média ( $\pm$  EPM) para a expressão relativa de cada transcrição. .... 41
- Figura 3** – Mudanças na expressão relativa dos transcritos para receptor de Estrógeno alfa – ESR1, 24 horas após a última aplicação do BE ( a; M2/M1), cinco dias após a aplicação de P4 LA em relação a última aplicação do BE ( b; M3/M2) e cinco dias após a aplicação de P4 LA em relação à imediatamente antes do início do tratamento com BE (b; M3/M1), nos grupos tratados ou nas cíclicas 48 horas após a aplicação de prostaglandina (M1), a segunda amostra (M2) foi colhida no estro, e a terceira amostra (M3) foi obtida no diestro quando a égua apresentava tônus uterino, cinco dias após a ovulação 1D). Os dados são expressos como média ( $\pm$  EPM) para a expressão relativa de cada transcrição. .... 42
- Figura 4** - Mudanças na expressão relativa dos transcritos para receptor de Estrógeno beta – ESR2, 24 horas após a última aplicação do BE ( a; M2/M1), cinco dias após a aplicação de P4 LA em relação a última aplicação do BE ( b; M3/M2) e cinco dias após a aplicação de P4 LA em relação à imediatamente antes do início do tratamento com BE (b; M3/M1), nos grupos tratados ou nas cíclicas 48 horas após a aplicação de prostaglandina (M1), a segunda amostra (M2) foi colhida no estro, e a terceira amostra (M3) foi obtida no diestro quando a égua apresentava tônus uterino, cinco dias após a ovulação 1D). Os dados são expressos como média ( $\pm$  EPM) para a expressão relativa de cada transcrição. .... 43

**Figura 5** - Imagem representativa de endométrio equino imunomarcado para receptor de progesterona (PR). O painel de figuras mostra imunomarcagem imediatamente antes do tratamento com Benzoato de Estradiol (BE) na figura **a** (grupo 5 mg + P4 LA), na figura **d** (grupo 10 mg + P4 LA) e na figura **g** (grupo Priming Hormonal); 24 horas após última administração de BE na figura **b** (grupo 5 mg + P4 LA), na figura **e** (grupo 10 mg + P4 LA) e na figura **h** (grupo Priming Hormonal) e cinco dias após administração da progesterona de longa ação na figura **c** (grupo 5 mg + P4 LA) na figura **f** (grupo 10 mg + P4 LA) e na figura **i** (grupo Priming Hormonal). Figuras **k** e **l** mostram expressão proteica no período de estro e em cinco dias após ovulação, respectivamente, em éguas naturalmente cíclicas. A figura **j** consiste no controle negativo. Barras = 50  $\mu$ m e 10  $\mu$ m. .... 45

**Figura 6** - Imagem representativa de endométrio equino imunomarcado para receptor de estrógeno  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). O painel de figuras mostra imunomarcagem imediatamente antes do tratamento com Benzoato de Estradiol (BE) na figura **a** (grupo 5 mg + P4 LA), na figura **d** (grupo 10 mg + P4 LA) e na figura **g** (grupo Priming Hormonal); 24 horas após última administração de BE na figura **b** (grupo 5 mg + P4 LA), na figura **e** (grupo 10 mg + P4 LA) e na figura **h** (grupo Priming Hormonal) e cinco dias após administração da progesterona de longa ação na figura **c** (grupo 5 mg + P4 LA) na figura **f** (grupo 10 mg + P4 LA) e na figura **i** (grupo Priming Hormonal). Figuras **k** e **l** mostram expressão proteica no período de estro e em cinco dias após ovulação, respectivamente, em éguas naturalmente cíclicas. A figura **j** consiste no controle negativo. Barras = 50  $\mu$ m e 10  $\mu$ m. .... 46

**Figura 7** - Imagem representativa de endométrio equino imunomarcado para receptor de estrógeno  $\beta$  (ER $\beta$ ). O painel de figuras mostra imunomarcagem imediatamente antes do tratamento com Benzoato de Estradiol (BE) na figura **a** (grupo 5 mg + P4 LA), na figura **d** (grupo 10 mg + P4 LA) e na figura **g** (grupo Priming Hormonal); 24 horas após última administração de BE na figura **b** (grupo 5 mg + P4 LA), na figura **e** (grupo 10 mg + P4 LA) e na figura **h** (grupo Priming Hormonal) e cinco dias após administração da progesterona de longa ação na figura **c** (grupo 5 mg + P4 LA) na figura **f** (grupo 10 mg + P4 LA) e na figura **i** (grupo Priming Hormonal). Figuras **k** e **l** mostram expressão proteica no período de estro e em cinco dias após ovulação, respectivamente, em éguas naturalmente cíclicas. A figura **j** consiste no controle negativo. Barras = 50  $\mu$ m e 10  $\mu$ m. .... 47

## SUMÁRIO

### Sumário

RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	11
CAPÍTULO 1.....	102
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Fisiologia do ciclo estral .....	14
2.2. Transferência de embriões em equinos.....	15
2.3 Tratamentos hormonais em éguas receptoras acíclicas .....	16
2.4 Mecanismos de ação dos estrógenos e progesterona.....	18
3. REFERÊNCIAS .....	22
4. HIPÓTESES E OBJETIVOS .....	29
4.1. Hipóteses .....	29
4.3. Objetivos .....	29
CAPÍTULO 2.....	10
ABSTRACT .....	32
RESUMO.....	31
1. Introdução.....	32
2. Materiais e métodos.....	33
2.1. <i>Animais e Grupos Experimentais</i> .....	33
2.2. <i>Palpação retal, exame ultrassonográfico e colheita de sangue.</i> .....	34
2.3. <i>Tratamentos hormonais.</i> .....	34
2.4 <i>Biópsias.</i> .....	35
2.5 <i>Imunohistoquímica</i> .....	36
2.6 <i>Extração de RNA, confecção de cDNA e RT-qPCR</i> .....	37
2.7 <i>Análises Estatísticas</i> .....	38
3. Resultados.....	39
3.1 <i>Tônus e edema uterinos.</i> .....	39
3.2 <i>Alterações na abundância relativa dos transcritos para PGR, ESR1 e ESR2</i> .....	40
3.3 <i>Imunolocalização de PR, ER<math>\alpha</math> e ER<math>\beta</math></i> .....	44
4. Discussão .....	48
5. Referências.....	51

FRITSCH, S.C. **Efeito da administração de diferentes doses de estradiol seguido de progesterona sobre a expressão de receptores endometriais de estrógeno e progesterona em éguas receptoras acíclicas.** Botucatu – SP. 2016. p. 54. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **RESUMO**

Diferentes tratamentos hormonais com a utilização de estrógenos e progestágenos são comumente utilizados para aumentar a oferta de receptoras nos programas de TE. Porém, pouco se sabe sobre a ação destes hormônios na expressão gênica e proteica dos receptores endometriais de estrógeno e progesterona em éguas acíclicas. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de três tratamentos hormonais utilizados durante a preparação de éguas acíclicas sobre o edema, tônus uterino e expressão gênica e proteica de receptores de estrógeno e progesterona endometriais. Éguas em anestro foram divididas em três grupos: Dose Total 10 mg BE+P4, (n=7), Dose Total 5 mg BE+P4 (n=7), Priming Hormonal (n=7) e comparadas com o grupo de éguas cíclicas (n=7). Foram avaliados: a expressão proteica e gênica relativa dos transcritos para os receptores de estrógeno e progesterona presentes no endométrio por meio das técnicas de imunohistoquímica e RT-qPCR; e as características morfológicas do útero por palpação retal e ultrassonografia em modo B. Os tratamentos hormonais utilizados no presente estudo foram eficazes em promover edema e tônus uterinos semelhante ao que ocorre em éguas cíclicas. Adicionalmente, o grupo Priming Hormonal demonstrou induzir características uterinas similares as observadas nos grupos 5 mg BE+P4 e no grupo controle, após 14 dias de intervalo. O tratamento hormonal com dose total de 10 mg de BE+P4 LA utilizando para o preparo de éguas acíclicas, demonstrou ser similar no tônus e edema uterinos, expressão proteica e expressão gênica relativa dos transcritos, para os receptores endometriais de E2 e P4 quando comparado as éguas cíclicas.

**Palavras-chave:** Equinos, benzoato de estradiol, progesterona, expressão de receptores.

FRITSCH, S.C. **Effect of administration of different doses of estradiol followed by progesterone on gene expression of endometrial receptors of estrogen and progesterone in non-cyclic recipient mares.** Botucatu – SP. 2015. p. 54. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

Different hormonal treatments with the use of estrogen and progestogen are commonly used to increase the supply of receiving the TE programs. However, little is known about the effect of these hormones on gene and protein expression of endometrial receptors for estrogen and progesterone in non-cyclic mares. This study aimed to evaluate the effects of three hormonal treatments used for the preparation of non-cyclic mares on the edema and uterine tone and gene and protein expression of estrogen and endometrial progesterone receptors. Mares anestrus were divided into three groups: total dose 10 mg EB + P4 (n = 7) total dose 5 mg EB + P4 (n = 7) Hormonal Priming (n = 7) and compared with the group of cyclic mares (n = 7). Were evaluated: protein expression and gene transcripts related to the estrogen and progesterone receptors present in the endometrium by the techniques of immunohistochemistry and RT-qPCR; and the morphological characteristics of the uterus by rectal palpation and ultrasound in B mode. Hormonal treatments used in this study were effective in promoting edema and uterine tone similar to what occurs in cyclic mares. Additionally, the Hormonal Priming group demonstrated induce uterine similar characteristics observed in the groups 5 mg EB + P4 and control group, after 14 days apart. Hormonal treatment with a total dose of 10 mg EB + P4 LA using for the preparation of non-cyclic mares, was shown to be similar in tone and uterine edema, protein expression and relative gene expression on the transcript for endometrial receptors E2 and P4 as compared cyclic mares.

**Key-words:** Equine, oestradiol benzoate, progesterone, receptor expression.

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A transferência de embriões (TE) é uma das biotecnologias mais utilizadas na criação de equinos em todo o mundo e o Brasil está entre os dois países com maior número de embriões transferidos, junto da Argentina (IETS Statistics and Data Retrieval Committee Report, 2013). Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2015), o Brasil tem hoje o maior rebanho da América Latina e o terceiro em âmbito mundial, movimentando cerca de R\$ 7,5 bilhões pelo Complexo do Agronegócio Cavalos.

Portanto as atenções para o melhor resultado desta biotecnologia aplicada a campo crescem dia-a-dia. No entanto, um dos principais fatores limitantes nos programas de TE é a oferta e qualidade de receptoras durante toda a estação reprodutiva e, principalmente, no início desta, uma vez que existe pressão econômica em algumas raças, para que os potros nasçam o mais próximo possível do início do ano hípico (NAGY et al., 2000).

A fim de aumentar a oferta de receptoras nos programas de TE, tratamentos hormonais com estrógenos e progestágenos, são comumente realizados em éguas receptoras acíclicas (HINRICHS et al, 1985, 1986; MCKINNON et al, 1988; CARNEVALE et al., 2000; ROCHA FILHO et al, 2004; SILVA 2014a, 2015). Estes hormônios (naturais ou sintéticos) induzem alterações uterinas semelhantes às que ocorrem em éguas cíclicas (PINTO, 2011), como, a formação do edema endometrial provocado pelo estradiol e, posteriormente, aumento do tônus uterino e estímulo à secreção histotrófica, provocadas pelo tratamento com progestágenos (VANDERWALL, 2011).

Apesar de existirem protocolos para a administração de progesterona ou altrenogest que produzem concentrações plasmáticas adequadas para a manutenção da gestação, há poucos estudos determinando a dose e/ou frequência de aplicação de estrógenos que promovem edema endometrial e fornecem concentrações plasmáticas semelhante a endógenas de estrógeno após os tratamentos.

O estradiol e a progesterona exercem sua ação sobre o útero pela ligação à receptores localizados no núcleo da célula, regulando a expressão gênica e a síntese de proteínas (BEATO; KLUG, 2000). Além disso, estes hormônios regulam a expressão dos seus próprios receptores, alterando o padrão de

expressão durante o ciclo estral e início da gestação (HARTT et al., 2005). A modulação da expressão gênica é importante para o estabelecimento e manutenção da prenhez (SPENCER; BAZER, 2002). Existem poucas descrições sobre a dose e/ou frequência de aplicação de estrógenos que, além de provocar edema endometrial, produzam perfil hormonal similar ao encontrado em éguas cíclicas durante o ciclo estral (SILVA et al., 2015) e, no que se refere ao efeito de diferentes doses de estradiol sobre o tônus, edema e principalmente sobre o padrão de expressão molecular e proteica dos receptores de estrógeno e progesterona no útero e sobre as características do tônus e edemas uterinos e a dinâmica molecular uterina em éguas acíclicas.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração de diferentes tratamentos hormonais, com estradiol e progesterona na expressão gênica e proteica dos receptores endometriais de estrógeno e progesterona durante o preparo de receptoras acíclicas; e comparar com o que ocorre naturalmente nas éguas cíclicas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Fisiologia do ciclo estral**

A égua é considerada uma espécie poliéstrica estacional e o início da estação reprodutiva na primavera depende de diversos fatores fisiológico-ambientais como idade, raça, nutrição e condição corporal, temperatura e principalmente o fotoperíodo (NAGY et al., 2000). No entanto, segundo estudo publicado por Aurich (2011), aproximadamente, 30% das éguas continuam a apresentar ciclos ovulatórios mesmo durante os períodos do ano que possuem menor luminosidade diária.

A sazonalidade reprodutiva equina é dividida em quatro fases, baseada na dinâmica folicular: anestro com inatividade ovariana, na transição de primavera ocorre aumento gradual do crescimento folicular, na ovulatória apresenta ciclos estrais regulares com folículos ovulatórios) e na transição de outono ocorre diminuição gradual da atividade ovariana (GINTHER et al. 2004).

O ciclo estral, estro e diestro nos equinos apresentam duração média de 21,7 (19,1 a 23,7), 6,5 (4,5 a 8,9), 14,9 (12,1 a 16,3) dias, respectivamente, o que



pode ser definido como o intervalo entre o início de um estro e o início de um subsequente, período este que se repete de forma cíclica (GINTHER, 1992).

A fase de estro, em éguas, é caracterizada pela presença de um folículo com mais de 25 mm de diâmetro no ovário, onde é produzido elevados níveis de estrógenos pelas células da granulosa (GINTHER, 1992), que por sua vez são responsáveis pelo comportamento de estro e elevação dos níveis de LH, pela ativação dos seus receptores na célula da granulosa, conseqüentemente a ovulação e a formação do corpo lúteo (HAFEZ, 1995).

Na fase do diestro ou fase luteal, o corpo lúteo produz progesterona em quantidades crescentes, do segundo ao décimo dia pós-ovulação. Esta secreção se mantém estável até o 12º dia, quando por volta do 14º e 16º dia do ciclo estral, ocorre a liberação da prostaglandina que causa a luteólise e conseqüentemente a queda acentuada nas concentrações plasmáticas de progesterona (GINTHER, 1992).

## **2.2. Transferência de embriões em equinos**

Inicialmente, a transferência de embriões em equinos foi realizada cirurgicamente e tinha como objetivo promover a gestação de éguas que não conseguiam levar a gestação a termo (HINRICHS et al., 1985). Nos últimos anos, com o avanço das biotecnologias, a TE se tornou um meio para obtenção de múltiplos potros por ano de doadoras valiosas e geneticamente superiores, que estão em competição (SQUIRES, 2013).

A transferência de embriões em equinos é influenciada por diversos fatores que afetam sua eficiência, como idade e histórico reprodutivo da doadora, experiência do técnico, qualidade do embrião, sêmen, e sincronia entre éguas doadoras e receptoras (CARNEVALE et al., 2000). Outro fator, considerado importante, segundo Mckinnon e Squires (2007), é a seleção adequada e manejo das éguas receptoras, que serão responsáveis por levar a gestação do embrião transferido a termo.

O temperamento da égua receptora é um fator fundamental a se considerar, pois um animal estressado pode representar risco para os profissionais e para o embrião transferido (ALONSO, 2008). As éguas receptoras ideais são aquelas livres de enfermidades infecto-contagiosas, principalmente anemia infecciosa equina, babesiose, leptospirose e adenite equina (LOSINNO e ALVARENGA,

2006). Ademais devem possuir conformação perineal adequada (SQUIRES, 2003), cérvix íntegra, útero com ausência de líquido, cistos ou ar, bem como ausência de anormalidades ovarianas (SQUIRES et al., 1999).

Indica-se ainda a aquisição de animais mais novos com idade entre 3 e 10 anos, uma vez que éguas mais velhas apresentam predisposição à degeneração do endométrio, o que pode comprometer a manutenção da gestação (RICKETS; ALONSO, 1991; SQUIRES et al., 1999). Além disso, éguas mais jovens podem permanecer por mais tempo nos programas de TE, diluindo seu custo (LOSINNO; ALVARENGA, 2006). Preconiza-se também, a utilização de receptoras com tamanho e peso semelhantes ao da doadora e garanhão (STOUT, 2006), uma vez que o tamanho do útero da receptora interfere no peso ao nascer do potro (ALLEN et al., 2002).

Durante o período de transição (inverno-primavera), a dieta alimentar diferenciada ofertada às doadoras em relação as receptoras faz com que as doadoras iniciem a atividade cíclica mais cedo no ano, enquanto as receptoras permanecem em anestro ou transição de primavera (LOSINNO; ALVARENGA, 2006; SILVA et al., 2014a).

Para algumas associações de criadores de equinos, o uso de receptoras em anestro ou transição de primavera é extremamente desejável, uma vez que existe uma pressão econômica para que os potros nasçam o mais próximo possível do início do ano hípico (1° de janeiro no hemisfério norte e 1° de julho no hemisfério sul). Este fato tem estimulado pesquisadores a desenvolverem métodos que antecipem a primeira ovulação do ano (NAGY, 2000) ou que permitam a utilização das receptoras acíclicas (anestro e transição) nos programas de TE, pela administração de protocolos hormonais (BOTELHO et al., 2015; GRECO et al., 2012; ROCHA FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2014a, 2015).

### **2.3 Tratamentos hormonais em éguas receptoras acíclicas**

Com o objetivo de se estabelecer a gestação em éguas receptoras acíclicas, estrógenos e progestágenos são comumente utilizados nos programas de TE em equinos (HINRICHS et al., 1985, 1986; HINRICHS; KENNEY, 1987; McKINNON et al., 1988; LAGNEAUX; PALMER, 1993; CARNEVALE et al., 2000; ROCHA FILHO et al., 2004; GRECO et al., 2008, 2015; SILVA et al., 2014a, 2015). Estes hormônios (naturais ou sintéticos) possibilitam a indução de mudanças

endometriais similares às que ocorrem em éguas cíclicas (PINTO, 2011), como a formação do edema uterino, causado pelo estrógeno e posteriormente o aumento do tônus e o estímulo à secreção histotrófica, provocados pelos progestágenos (VANDERWALL, 2011).

Pesquisas envolvendo a administração de protocolos hormonais em éguas receptoras são descritas desde a década de 80. Alguns autores utilizaram apenas progesterona (P4) ou altrenogest para o preparo de receptoras ovariectomizadas (HINRICHS et al., 1985, 1986). A administração de 300 mg diários de P4, por cinco dias antes da TE, resultou em 75% (três gestações de quatro transferências) de gestação (HINRICHS et al., 1985). Ao comparar dois protocolos utilizando o altrenogest (22 mg diários por cinco dias ou 66 mg diários por seis dias antes da TE), com o protocolo utilizando 300 mg diários P4, Hinrichs et al. (1986) obtiveram 16% (1/6), 33% (2/6) e 40% (2/5) de prenhez. Em outra pesquisa observaram que nas receptoras em que o tratamento hormonal com progesterona foi iniciado dois dias após a ovulação da doadora, as taxas de gestação foram superiores (6/8) quando comparadas com as éguas em que o início do tratamento hormonal ocorreu pelo menos quatro dias antes da ovulação da doadora (1/12), demonstrando assim a necessidade de sincronia, entre a administração de P4 na receptora e ovulação da doadora (HINRICHS; KENNEY, 1987).

Sabendo que o estrógeno estimula o aumento dos receptores uterinos para progesterona e que o embrião equino secreta principalmente o estradiol na fase inicial da gestação (ZAVY et al., 1979), McKinnon et al. (1988) utilizaram o estradiol, previamente e em conjunto com a administração de progesterona ou altrenogest em três diferentes tratamentos. No primeiro protocolo foi administrado 17 $\beta$ -estradiol de três a cinco dias seguido da administração de 300 mg de P4 diários após a ovulação da doadora. O segundo protocolo foi similar ao primeiro, no entanto, a aplicação do E2 continuou após a administração da P4. O terceiro tratamento também foi similar ao primeiro, porém foi utilizado o altrenogest, na dose diária de 0,044 mg/kg, como substituto da P4. As taxas de gestação foram similares entre os trabalhos de Hinrichs et al. (1985) e McKinnon et al. (1988), que obtiveram de 70 a 80% entre os protocolos testados, respectivamente (7/10, 8/10, 14/20). McKinnon et al. (1988) concluíram que, independente do período de

administração do estradiol, o requisito primário para o preparo e a manutenção da gestação é uma concentração adequada de progesterona ou progestágenos.

A partir da década de 90, éguas receptoras acíclicas (anestro ou transição) foram introduzidas nos programas de TE, uma vez que o uso desta categoria dispensa a realização de cirurgia e que tanto éguas ovariectomizadas quanto em anestro podem ser utilizadas com sucesso como receptoras de embriões (LAGNEAUX; PALMER, 1993).

A fim de testar a eficácia durante a manutenção da gestação, após induzir a luteólise aos 18 dias de prenhez, Mckinnon et al. (2000) testaram diferentes progestágenos disponíveis comercialmente, como a medroxiprogesterona, hidroxiprogesterona, altrenogest, norgestomet e megestrol, e apenas o altrenogest apresentou-se eficaz na manutenção da gestação. Além disso, Bringel et al. (2003) avaliaram uma preparação de progesterona de longa ação (P4 LA) em éguas sem o corpo lúteo primário, obtendo após a administração de 1500 mg a cada sete dias, concentrações de progesterona compatíveis com a fase luteal. Rocha Filho et al. (2004) administraram cipionato de estradiol (10 mg/dia, por dois dias), seguido de P4 de curta (200mg/dia ou 400 mg a cada dois dias) ou longa ação (1500 mg a cada sete dias), com o objetivo de comparar as taxas de gestação em éguas acíclicas utilizando P4 de curta ou longa ação, observaram taxas similares entre os diferentes tratamentos (em média 75,9%).

#### **2.4 Mecanismos de ação dos estrógenos e progesterona**

Na fêmea, os hormônios esteroides sexuais (estrógeno e progesterona) são derivados do colesterol e sintetizados principalmente pelos ovários e placenta (BEATO; KLUG, 2000). Exercem sua ação sobre o útero por receptores localizados no núcleo das células, regulando a expressão gênica, ou seja, a síntese de proteínas (DeFRANCO, 2002). Na espécie equina, a progesterona (P4) e o estradiol (E2) são os principais hormônios esteroides de origem ovariana (GINTHER, 1992).

No folículo ovariano, o colesterol atravessa a membrana plasmática ligando-se a lipoproteínas, onde é armazenado em vacúolos citoplasmáticos e transportado para a membrana externa da mitocôndria. O LH que é liberado pela adeno-hipófise liga-se a seus receptores, localizados na membrana das células da teca, mobilizando o colesterol para a via esteroidogênica. A proteína StAR

(*steroid acute regulatory protein*) auxilia na transferência do colesterol para a membrana interna da mitocôndria, onde a enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (P450<sub>scc</sub>) quebra a molécula de colesterol, convertendo-o a em pregnenolona (STOCKO; CLARK, 1996). A pregnenolona é convertida a androstenediona, sendo então transportada através da membrana basal para as células da granulosa. Nas células da granulosa, o hormônio FSH estimula a conversão da androstenediona em estrona, via enzima aromatase que sofre ação do 17  $\beta$ -HSP, transformando-se em estradiol (CHRISTENSEN, 2011).

A síntese de progesterona ocorre principalmente nas células do corpo lúteo, localizadas no ovário. O colesterol é convertido a pregnenolona na mitocôndria, assim como ocorre na síntese dos estrógenos. A pregnenolona, presente no retículo endoplasmático liso é convertida em progesterona pela ação da enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (VANDERWALL, 2011).

Ao contrário do modelo clássico onde a ação genômica dos esteróides é geralmente detectada em horas ou dias, a não-genômica pode ser detectada em segundos, demonstrando assim, a necessidade de estudos adicionais para elucidar o significado biológico destas ações não-genômicas do estrógeno e progesterona nos animais domésticos (REVELLI et al., 1998; BISHOP; STORMSHAK, 2008).

A via de ação clássica, conhecida como nuclear ou genômica dos hormônios esteroides, descreve o mecanismo de ação do E2 e P4 através da ligação com seus receptores nucleares específicos (BEATO; KLUG, 2000). O complexo hormônio-receptor sofre ativação (mudando de conformação), permitindo que o receptor se ligue a sítios específicos na cromatina. O complexo hormônio-receptor ativado interage com as sequências específicas do DNA ("*Steroid response elements*" – SREs). A partir de então, o complexo atua como um fator de transcrição, modulando a síntese de RNAm e de proteínas, responsáveis pelos efeitos finais do E2 ou P4 (BAGCHI et al., 1992; DeFRANCO et al., 2002).

O estrógeno media suas funções pelas formas  $\alpha$  e  $\beta$  de seus receptores, que são expressos por diferentes genes (OKUMU et al., 2010). Estudos realizados em ratos, relatam que receptores do estrógeno  $\alpha$  são expressos na glândula pituitária, ovários, útero, testículos, epidídimos e glândulas adrenais (KUIPER et al., 1997), enquanto os receptores do estrógeno  $\beta$  são expressos principalmente nos ovários e próstata (KUIPER et al., 1996, 1997; ENMARK et al., 1997). Apesar disso,

ambas as formas dos receptores, foram caracterizadas no útero de éguas (HONNENS et al., 2011; SILVA et al., 2014b).

As funções genômicas da progesterona são mediadas, principalmente, por meio de dois tipos de receptores nucleares, isoforma A e isoforma B do receptor de progesterona. Ambas isoformas são codificados pelo mesmo gene, mas são reguladas por promotores diferentes (MOTE et al., 2006). A isoforma A, atua principalmente inibindo ou modulando a transcrição de outros receptores no útero e ovários, enquanto a isoforma B é mais importante nos efeitos progesteronais típicos tal como, o desenvolvimento da glândula mamária (GIANGRANDE; McDONNELL, 1999; MULAC-JERICEVIC et al. 2000, 2003).

Éguas cíclicas, durante o estro, apresentam aumento da expressão dos receptores para estrógeno e progesterona no endométrio, sendo encontrados no epitélio luminal, glandular e estroma (HARTT et al., 2005; SILVA et al., 2014b), seguido de uma diminuição dos mesmos receptores, principalmente no epitélio luminal e glandular, no diestro, pela ação da progesterona (McDOWELL et al., 1999; AUPPERLE et al., 2000). De acordo com Spencer e Bazer (2002), não somente as concentrações circulantes de E2 e P4 influenciam na dinâmica da expressão dos seus receptores, os fatores parácrinos, podem também estar envolvidos na regulação da expressão dos receptores de estrógeno e progesterona.

A suplementação com altrenogest em éguas no início da gestação (5° ao 11° dia pós-ovulação), acelera o *down-regulation* dos receptores de progesterona em éguas tratadas (WILLMANN et al., 2011a). Segundo estes autores, essa diminuição é vantajosa, já que os trabalhos realizados em éguas (WILMANN et al., 2011b), ovinos (SPENCER E BAZER, 2002; BAZER et al., 2009) e bovinos (BAZER et al., 2009; OKUMU et al., 2010), sugerem que a *down-regulation* dos receptores de progesterona está associada com a receptividade uterina necessária para o desenvolvimento do conceito, reconhecimento materno da gestação e posterior implantação.

O estudo da expressão e detecção dos receptores endometriais de estrógeno e progesterona também foram relatados em ovelhas ovariectomizadas (WU et al., 1996), em porcas (KARVELIENÉ et al., 2007), em bovinos (MARTIN et al., 2008) e em éguas cíclicas, transição e em anestro (McDOWELL et al., 1999; SILVA et al., 2014b). O efeito da suplementação com estrógeno e progesterona

foi avaliado sobre a abundância relativa dos transcritos que codificam os receptores esteroidais. Foi observado que o tratamento com estrógeno exógeno aumentou a abundância relativa dos transcritos para receptores de estrógeno, logo após a sua administração. No entanto, a quantidade dos mesmos receptores esteroidais encontrava-se relativamente alta no endométrio de éguas em anestro que não receberam o tratamento, explicado pela abundância de um nível constitutivo de genes transcritos para estes receptores, sendo possível também que outros fatores regulem as concentrações circulantes de estradiol e de progesterona (McDOWELL et al., 1999).

Com o intuito de induzir as características uterinas necessárias a gestação, profissionais da área, atualmente, utilizam o benzoato de estradiol (BOTELHO et al., 2015; GRECO et al., 2008; KAERCHER et al., 2013; SILVA et al., 2014a, 2015), que é um éster do  $17\beta$ -estradiol, com meia vida de aproximadamente três dias (BÓ et al., 2006). Variadas doses e frequências de aplicação do benzoato de estradiol são descritas nas éguas receptoras acíclicas, como 2,5 mg em dose única (SILVA et al., 2014a, 2015), 5 mg em doses decrescentes (GRECO et al., 2008) e 10 mg em doses decrescentes (KAERCHER et al., 2013; BOTELHO, 2015), todos com o objetivo de promover edema uterino e após a observação do mesmo, são tratadas com 1500 mg de P4 LA, de três a oito dias, antes de receberem o embrião (BOTELHO et al., 2015; GRECO et al., 2012) ou altrenogest (0,044 mg/kg para Regumate® ou 22 a 44 ml para Progestal®) por um período de quatro a seis dias antes da transferência (SILVA et al., 2014a, 2015).

Apesar de existirem protocolos para a administração de progesterona ou altrenogest, que produzam concentrações plasmáticas de progesterona conhecidas e adequadas para a manutenção da gestação em éguas receptoras, existem poucos estudos determinando a dose e/ou frequência de aplicação de estrógenos que, além de provocar edema endometrial, produzam perfil hormonal similar ao encontrado em éguas cíclicas durante o ciclo estral (SILVA et al., 2015).

### 3. REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ALLEN, W.R. et al. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in the uterus. **Reproduction**, v. 123; pg. 445-453, 2002.

ALONSO, M.A. Seleção, manejo e fatores que influenciam as taxas de prenhez em éguas receptoras de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, Supl. 2, v. 36, pg. s207-s214, 2008.

AUPPERLE, H. et al. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 3, pg. 228-232, 2000.

AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, pg. 220–228, 2011.

BAGCHI, M.K. et al. Analysis of the mechanism of steroid hormone receptor-dependent gene activation in cell-free systems. **Endocrine Reviews**, v. 13, n. 3, pg. 525-535, 1992.

BAZER, F.W. et al. Comparative aspects of implantation. **Reproduction**, v. 138, pg. 195-209, 2009.

BEATO, M.; KLUG, J. Steroid hormone receptors: an update. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 3, pg. 225–236, 2000.

BISHOP, C.V.; STORMSHAK, F. Non-genomic actions of progesterone and estrogens in regulating reproductive events in domestic animals. **Veterinary Journal**, v. 176, pg. 270–80, 2008

BÓ, G.A.; COLAZO, M.G.; MARTÍNEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestágenos y diferentes ésteres de estradiol. In: 2º Simposio Internacional de Reprodução Animal Aplicada - **Biotecnologia da reprodução em bovinos**, pg. 71-84, 2006.

---

<sup>1</sup>Referências organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, NBR 6023, 2002).



BOTELHO, J. H. V. et al. Hormone supplementation protocol using estradiol benzoate and long-acting progesterone is efficient in maintaining pregnancy of anovulatory recipient mares during autumn transitional phase. **Animal Reproduction Science**, v. 153, pg. 39–43, 2015.

BRINGEL, B.A. et al. Biorelease progesterone LA 150 and its application to overcome effects of premature luteolysis on progesterone levels in mares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, pg. 498-500, 2003.

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

CHRISTENSEN, B.W. Estrogens. In: MC KINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2 ed. Ames:Blackwell Publishing, 2011, vol.2, cap.169, pg. 1631-1636.

DeFRANCO, D.B. Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. **Molecular Endocrinology**, v.16, pg.1449–1455, 2002.

ENMARK, E. et al. Human estrogen receptor b-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, pg. 4258-4265, 1997.

GEISERT RD, BRENNER RM, MOFFATT RJ, HARNEY JP, YELLIN T, BAZER FW. Changes in oestrogen receptor protein, mRNA expression and localization in the endometrium of cyclic and pregnant gilts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, pg. 247–260, 1993.

GEISERT RD, PRATT TN, BAZER FW, MAYES JS, WATSON GH. Immunocytochemical localization and changes in endometrial progestin receptor protein during the porcine oestrous cycle and early pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, pg. 749–760, 1994.

GIANGRANDE, P.H.; McDONNELL, D.P. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 54, pg. 291–313, 1999.

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

GINTHER, O. et al. Seasonal influence on equine follicle dynamics. **Animal Reproduction**, pg. 31–44, 2004.

GRECO, G.M. et al. Effect of interrupting the progesterone treatment in pregnant acyclic recipient mares showing supplementary corpora lutea formation. **Acta Scientiae Veterinariae**, Supl. 2, v. 36, pg. 590, 2008.

GRECO, G. M. et al. Use of long-acting progesterone to acyclic embryo recipient mares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 3, pg. 607–611, 2012.

GRECO, G. M. et al. Novel long-acting progesterone protocols used to successfully synchronize donor and recipient mares with satisfactory pregnancy and pregnancy loss rates. **Journal of Equine Veterinary Science**, ago. 2015.

HAFEZ, E.S.E. Ciclos reprodutivos. In: **Reprodução Animal**. 6ª ed. São Paulo: Manole, 1995. Cap.4, pg. 95-114.

HARTT, L.S. et al. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. **Reproduction**, v. 130, pg. 241-250, 2005.

HINRICHS K, SERTICH PL, CUMMINGS MR, KENNEY MR. Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer. **Equine Veterinary Journal**, Suppl 3, pg. 74-75, 1985.

HINRICHS K, SERTICH PL, KENNEY RM. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v.26, pg. 455-60, 1986.

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

HOLTAN, D.W.; SQUIRES, E.L.; LAPIN, D.R.; GINTHER, O.J. Effect of ovariectomy on pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. 27, pg.457-463, 1979.

HONNENS, A. et al. Relationships between uterine blood flow, peripheral sex steroids, expression of endometrial estrogen receptors and nitric oxide synthases during the estrous cycle in mares. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n.1, pg. 43-48, 2011

IETS. Disponível em: < [http://www.iets.org/pdf/comm\\_data/December2014](http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2014) >. Acesso em: 09 set. 2015.

KAERCHER, F. et al. Embryo transfer in anovulatory recipient mares treated with estradiol benzoate and long-acting progesterone. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 3, pg. 205-209, 2013.

KARVELIENĖ B., ŽILINSKAS H., JANUŠKAUSKAS A., RIŠKEVIČIENĖ V. Immunohistochemical studies on distribution of ER $\alpha$  in the uterus of sows with reproductive disturbances. **Biologija**. n. 1. pg. 39–44, 2007.

KUIPER, G.G. et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, pg. 5925–5930, 1996.

KUIPER, G.G. et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . **Endocrinology**, v. 138, pg. 863-870, 1997.

LAGNEAUX D, PALMER E. Embryo transfer in anoestrous recipient mares: attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. **Equine Veterinary Journal**, Suppl 15, pg. 107-110, 1993.

LOSINNO, L; ALVARENGA, M.A. Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2006, Araxá. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, pg. 39-49, 2006.

MAPA. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos> >. Acesso em: 09 set. 2015.

MARTIN I, TORRES NETO R, OBA E, BURATINI JR E, BINELLI M, LAUFER-AMORIM R, FERREIRA JCP. Immunohistochemical detection of receptors for oestrogen and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrous cycle in nelore (*Bos Taurus indicus*) cows. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 43, pg. 415-421, 2008.

McDOWELL, K.J. et al. Changes in equine endometrial oestrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptor mRNAs during the oestrous cycle, early pregnancy and

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

McKINNON AO, SQUIRES EL, CARNEVALE EM, HERMENET MJ. Ovariectomized steroidtreated mares as embryo transfer recipient and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. **Theriogenology**, v. 29, pg. 1055-63, 1988.

McKINNON, A.O. et al. The inability of some synthetic progestogens to maintain pregnancy in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, pg. 83-85, 2000.

McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Embryo transfer and related technologies. In: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. **Current therapy in equine reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007, pg. 319-334.

MOTE, P.A. et al. Overlapping and distinct expression of progesterone receptors A and B in mouse uterus and mammary gland during the estrous cycle. **Endocrinology**, v. 147, pg. 5503-5512, 2006.

MULAC-JERICEVIC B, MULLINAX RA, DEMAYO FJ, LYDON JP, CONNEELY OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. **Science**, v. 289, pg. 1751–1754, 2000.

MULAC-JERICEVIC B, LYDON JP, DEMAYO FJ, CONNEELY OM. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. **PNAS**, v. 100, pg. 9744–9749, 2003.

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, 60-61, pg. 245-62, 2000.

OKUMU, L.A. et al. Expression and localization of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. **Reproduction**, v. 140, pg. 143-153, 2010.

OTT TL, MIRANDO MA, STEVENS C, HARNEY JP, OGLE TF, BAZER FW. Changes in progesterone and oestrogen receptor mRNA and protein during maternal recognition of pregnancy and luteolysis in ewes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 10, pg. 171–183, 1993.

PINTO, C.R.F. Progestagens and Progesterone. In: MC KINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2 Ed. Ames:Blackwell Publishing, 2011, vol.2, cap.189, pg. 1811-1817.

REVELLI, A.; MASSOBRIO, M., TESARIK, J. Nongenomic actions of steroid hormones in reproduction tissues. **Endocrine Reviews**, v. 19, pg. 3-17, 1998.

RICKETS, S.W.; ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 3, pg. 189-192, 1991.

ROCHA FILHO, A N. et al. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. **Animal reproduction**, v. 1, n. 1, pg. 91–95, 2004.

SILVA, E. S. M. et al. Supplementary corpora lutea monitoring allows progestin treatment interruption on day 70 of pregnancy in non-cyclic recipient mares. **Animal Reproduction Science**, v. 144, n. 3-4, pg. 122–128, 2014a.

SILVA, E.S.M. et al. 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**, v. 151, pg. 169-181, 2014b.

SILVA, E.S.M. et al. Ultrasonography of the conceptus development from days 15 to 60 of pregnancy in non-cyclic recipient mares. **Ciência Rural**, v. 45, n. 3, pg. 512-518, 2015.

SPENCER T.E.; BAZER, F.W. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 53, pg.1527–1543, 1995.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, pg. 1879-1898, 2002.

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

SQUIRES, E.L. Management of the embryo donor and recipient mare. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine**. Philadelphia: Saunders, 2003, pg. 277-279.

SQUIRES, E.L. Embryo transfer challenges and perspectives. **Brazilian Journal of Animal Reproduction**, v. 37, n. 2, pg. 105-107, 2013.

STOCCO, D.M.; CLARK, B.J. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, pg. 197–205, 1996.

STOUT, T. A. E. Equine embryo transfer: review of developing potential. **Equine veterinary journal**, v. 38, n. 5, pg. 467–478, 5 jan. 2006.

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

WILLMANN C, S. BUDIK, I. WALTER, C. AURICH. Influences of treatment of early pregnant mares with the progestin altrenogest on embryonic development and gene expression in the endometrium and conceptus. **Theriogenology**, v.76, pg. 61-73, 2011a.

WILLMANN C, SCHULER G, HOFFMANN B, PARVIZI N, AURICH C. Effects of age and altrenogest treatment on conceptus development and secretion of LH, progesterone and eCG in earlypregnant mares. **Theriogenology**, v.75, pg. 421–8, 2011b.

WU WX, OWINY J, ZHANG Q, MA XH, NATHANIELSZ PW. Regulation of the estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid in the ovariectomized sheep myometrium and endometrium: the role of estradiol and progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 55, pg. 762-768, 1996.

VANDERWALL, D.K. Progesterone. In: MC KINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2 Ed. Ames:Blackwell Publishing, 2011, vol.2, cap.170, pg. 1637-1641.

ZAVY, M.T et al. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 27, pg. 403-11, 1979.

## **4. HIPÓTESES E OBJETIVOS**

### **4.1. Hipóteses**

- 1) O tratamento de receptoras acíclicas com estrógeno e progesterona promove alterações no edema e tônus uterinos, semelhantes às que ocorrem em éguas cíclicas.
  
- 2) A aplicação de estrógeno e progesterona regula a expressão gênica e proteica dos receptores endometriais de estrógeno e progesterona em éguas acíclicas.

### **4.3. Objetivos**

Avaliar os edemas e tônus uterinos de éguas acíclicas tratadas com diferentes doses de BE seguido de P4 LA, por meio de palpação retal e ultrassonografia em modo B e compara com éguas cíclicas;

Verificar a influência do tratamento sobre a expressão gênica e proteica dos receptores endometriais de estrógeno alfa ( $ER\alpha$ ), estrógeno beta ( $ER\beta$ ) e progesterona (PR), pela técnica de RT-qPCR e imunohistoquímica, respectivamente; e comparar com o que ocorrenas éguas cíclicas..

## CAPÍTULO 2



1 O artigo a seguir foi redigido de acordo com as normas do periódico científico Ciência Animal Brasileira.  
2 Disponível em (<https://revistas.ufg.br/REF/about/submissions#authorGuidelines>)

3  
4 **EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE**  
5 **ESTRADIOL SEGUIDO DE PROGESTERONA SOBRE A**  
6 **EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DOS RECEPTORES**  
7 **ENDOMETRIAIS DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM ÉGUAS**  
8 **RECEPTORAS ACÍCLICAS**

9  
10 FRITSCH, S.C.<sup>1</sup>; SILVA, E.S.M.<sup>1</sup>; GOMES, A.R.C.<sup>1</sup>; PANTOJA, J.C.F.<sup>1</sup>; OLIVEIRA-  
11 FILHO, J.P.<sup>1</sup>; MEIRA, C.<sup>1</sup>

12  
13  
14 <sup>1</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
15 Filho” Unesp - Botucatu, SP. E-mail: samuelcfritsch@yahoo.com

16  
17 **RESUMO**

18 Diferentes tratamentos hormonais com a utilização de estrógenos e progestágenos  
19 são comumente utilizados nos programas de TE. Porém, pouco se sabe sobre a ação destes  
20 hormônios na expressão gênica e proteica dos receptores endometriais de estrógeno e  
21 progesterona em éguas acíclicas. Objetivou-se avaliar os efeitos de três tratamentos  
22 hormonais utilizados durante a preparação de éguas acíclicas sobre as expressões gênica e  
23 proteica dos receptores de estrógeno e progesterona. Éguas em anestro foram divididas em  
24 três grupos: Dose Total 10 mg BE+P4, (n=7), Dose Total 5 mg BE+P4 (n=7), Priming  
25 Hormonal (n=7) e comparadas com o grupo de éguas cíclicas (n=7). Foram avaliados: a  
26 expressão proteica e gênica relativa dos transcritos para os receptores de estrógeno e  
27 progesterona pelas técnicas de imunohistoquímica e RT-qPCR; e tônus e edema uterinos  
28 por palpação retal e ultrassonografia em modo B. Adicionalmente, o grupo Priming  
29 Hormonal induziu características similares as observadas nos grupos 5 mg BE+P4 e no  
30 grupo controle, após 14 dias de intervalo. O tratamento hormonal de 10 mg de BE+P4 LA  
31 em éguas acíclicas, demonstrou ser similar no tônus e edema uterinos, expressão proteica e  
32 gênica relativa dos transcritos, para os receptores endometriais de E2 e P4 quando  
33 comparado as éguas cíclicas.

34  
35 **Palavras-chave:** Equinos, benzoato de estradiol, progesterona, expressão de receptores.

36  
37  
38  
39  
40

41 FRITSCH, S.C. **Effect of administration of different doses of estradiol followed by**  
42 **progesterone on gene expression of endometrial receptors of estrogen and**  
43 **progesterone in non-cyclic recipient mares.** Botucatu – SP. 2015. p. 54. Dissertação  
44 (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu,  
45 Universidade Estadual Paulista.

46

#### 47 **ABSTRACT**

48 Different hormone treatments with the use of progestogens and estrogens are  
49 commonly employed in TE programs. However, little is known about the effect of these  
50 hormones on gene and protein expression of endometrial receptors for estrogen and  
51 progesterone in non-cyclic mares. This study aimed to evaluate the effects of three  
52 hormonal treatments used for the preparation of non-cyclic mares on the gene and protein  
53 expression of estrogen and endometrial progesterone receptors. Mares anestrus were  
54 divided into three groups: total dose 10 mg EB + P4 (n = 7) total dose 5 mg EB + P4 (n =  
55 7) Hormonal Priming (n = 7) and compared with the group of cyclic mares (n = 7). Were  
56 evaluated: protein expression and gene transcripts related to the estrogen and progesterone  
57 receptors by the techniques of immunohistochemistry and RT-qPCR; and edema and  
58 uterine tone of the uterus by rectal palpation and ultrasound in B mode. Additionally, the  
59 Hormonal Priming group induce similar characteristics observed in the groups 5 mg EB +  
60 P4 and control group, after 14 days apart. Hormonal treatment with a total dose of 10 mg  
61 EB + P4 LA on non-cyclic mares, shown to be similar in tone and uterine edema, protein  
62 expression and relative gene transcript for endometrial receptors E2 and P4 as compared  
63 cyclic mares.

64

65 **Key-words:** Equine, oestradiol benzoate, progesterone, receptor expression.

66

#### 67 **1. Introdução**

68 A transferência de embriões (TE) é uma das biotecnologias mais utilizadas na  
69 criação de equinos em todo o mundo. Um dos principais fatores limitantes nos programas  
70 de TE é a oferta e qualidade de receptoras durante a transição de primavera, desta forma,  
71 resultados superiores são obtidos quando se encontra um maior número de receptoras  
72 disponíveis durante toda a estação (GRECO et al., 2015).

73 Diferentes tratamentos hormonais com a utilização de estrógenos e progestágenos  
74 vêm sendo utilizados, a fim de aumentar a oferta de receptoras nos programas de TE, com  
75 o intuito de promover a gestação em receptoras acíclicas (HINRICHS et ai, 1985, 1986;  
76 MCKINNON et ai, 1988; CARNEVALE et al., 2000; ROCHA FILHO et al, 2004; SILVA  
77 2014, 2015). Estes hormônios naturais ou sintéticos induzem alterações uterinas  
78 semelhantes às que ocorrem em éguas cíclicas (PINTO, 2011). A administração do  
79 estradiol estimula a formação de edema endometrial e, posteriormente, aumento do tônus

80 uterino e estímulo à secreção histotrófica pela aplicação de progestágenos  
81 (VANDERWALL, 2011). Entretanto, existem poucos estudos determinando a dose e/ou  
82 frequência de aplicação do benzoato de estradiol, que forneça concentrações plasmáticas  
83 endógenas de estrógeno após os tratamentos (SILVA et al., 2015).

84 Variados protocolos foram descritos em éguas receptoras acíclicas, como 2,5 mg em  
85 dose única (SILVA et al., 2014, 2015), 5 mg em doses decrescentes (GRECO et al., 2008)  
86 e 10 mg em doses decrescentes (KAERCHER et al., 2013; BOTELHO, 2015). Após  
87 observação do edema, Greco et al. (2012) e Botelho et al. (2015), utilizaram a dose de  
88 1500 mg de progesterona de longa ação (P4 LA), por um período de três a oito dias antes  
89 de receberem o embrião. Outros autores utilizaram estradiol previamente ao altrenogest  
90 (0,044 mg/kg para Regumate® ou 22 a 44 ml para Progestal®) por quatro a seis dias antes  
91 da transferência do embrião, o que foi suficiente para propiciar um ambiente uterino  
92 favorável à manutenção da gestação (SILVA et al., 2014).  
93 Entretanto, os estudos relacionados à avaliação das diferentes doses, hormônios ou  
94 protocolos comumente utilizados em éguas receptoras acíclicas são limitados,  
95 principalmente quanto a descrição de um padrão de expressão gênica e proteica dos  
96 receptores de estrógeno e progesterona. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o  
97 efeito da aplicação de diferentes doses de benzoato de estradiol seguido da progesterona de  
98 longa ação sobre a expressão gênica e proteica dos receptores de estrógeno alfa e beta, e  
99 progesterona em éguas acíclicas e comparar com o observado nas éguas cíclicas, tendo  
100 como hipótese a possibilidade de promover alterações, após os tratamentos hormonais,  
101 similares as que ocorrem durante a fase estral em éguas cíclicas.

102

## 103 **2. Materiais e métodos**

### 104 *2.1. Animais e Grupos Experimentais*

105 Foram utilizadas 21 éguas mestiças com idade entre cinco e 15 anos, com peso de  
106 350 a 450 kg e alimentadas com feno de *coast-cross* (*Cynodon dactylon*), sal mineralizado  
107 e água à vontade.

108 Éguas em anestro e cíclicas foram utilizadas. As éguas em anestro, foram  
109 distribuídas em três grupos de acordo com o tratamento hormonal: grupo 5 mg de BE+P4  
110 (Figura 1C), grupo 10 mg de BE+P4 (Figura 1A) e o grupo Priming Hormonal, que  
111 também recebeu a dose total de 10 mg de BE+P4 que teve como objetivo mimetizar a  
112 reutilização de receptoras acíclicas 14 dias após o primeiro tratamento hormonal com P4

113 LA (Figura 1B). Grupo Controle, sete éguas cíclicas foram selecionadas de forma aleatória  
114 na estação ovulatória e não receberam tratamento hormonal (Figura 1D).

115 Os mesmos animais foram avaliados no período de anestro e em atividade cíclica.  
116 Foram consideradas éguas em anestro aquelas que apresentaram folículos com diâmetro  
117 menor que 20 mm, ausência de corpo lúteo (CL) e concentração de P4 menor que 1 ng/mL  
118 em três avaliações com intervalo de sete dias. Éguas cíclicas foram aquelas que  
119 apresentaram ciclos estrais regulares com presença de folículo ovulatório.

120

## 121 *2.2. Palpação retal, exame ultrassonográfico e colheita de sangue.*

122 As éguas foram examinadas pela ultrassonografia modo B (transdutor linear 5 MHz;  
123 Mindray® DP-3300Vet, Shenzhen, China) para monitorar a fase reprodutiva (anestro e  
124 cíclica). Os exames foram realizados diariamente, iniciando-se imediatamente antes da  
125 primeira administração de BE até o quinto dia (D5) após a aplicação da P4 LA nos grupos  
126 tratados. No grupo das éguas cíclicas, a ultrassonografia também foi diária, iniciando-se a  
127 partir da segunda ovulação da estação até cinco dias após a ovulação seguinte.

128 Foi realizada palpação retal imediatamente antes e durante os tratamentos hormonais  
129 para avaliar o tônus uterino, que foi classificado de 0 a 3 (0 = ausência de tônus uterino; 1  
130 = tônus uterino mínimo; 2 = tônus uterino intermediário; 3 = tônus uterino máximo; Hayes  
131 e Ginther, 1986). Os exames ultrassonográficos foram realizados para avaliar o edema  
132 uterino, que também foi classificado de 0 a 3 (0 = ausência de edema uterino; 1 = edema  
133 uterino mínimo; 2 = edema uterino intermediário; 3 = edema uterino máximo; McCue et  
134 al., 2011). O tônus, edema uterino e colheita de sangue foram obtidos imediatamente antes  
135 do tratamento com BE nos grupos tratados, continuando-se a cada 24 horas até o quinto dia  
136 após aplicação de P4LA e no grupo controle os mesmos parâmetros foram obtidos a partir  
137 da detecção de um folículo  $\leq 35$  mm até cinco dias após a ovulação.

138 As amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do plasma e  
139 posteriormente armazenadas a -20°C até a dosagem de P4 por radioimunoensaio (RIA).

140

## 141 *2.3. Tratamentos hormonais*

142 As éguas do grupo 10mg BE+P4 receberam três doses decrescentes 5 mg, 3 mg, 2  
143 mg de BE (Estrogin® – Farmavet, SP, Brasil) em dias consecutivos, seguida da  
144 administração de 1500 mg de P4 de longa ação (Sincrogest® - Ourofino, SP, Brasil), por  
145 via intramuscular, 24 horas após a última dose de BE (Figura 1 - A).

146 Para o grupo 5 mg BE+P4 os animais receberam duas doses decrescentes de 3 mg e 2  
147 mg de BE, em dias consecutivos, seguida da administração de 1500 mg de P4 de longa  
148 ação 24 horas após a última dose de BE (Figura 1 - C). No animais do grupo Priming  
149 Hormonal foi realizado um primeiro tratamento de 10 mg de BE em doses decrescentes (5,  
150 3 e 2 mg) e 24 horas após 1500 de P4. Catorze dias após o mesmo tratamento foi repetido e  
151 então os dados foram obtidos. (Figura 1 - B).

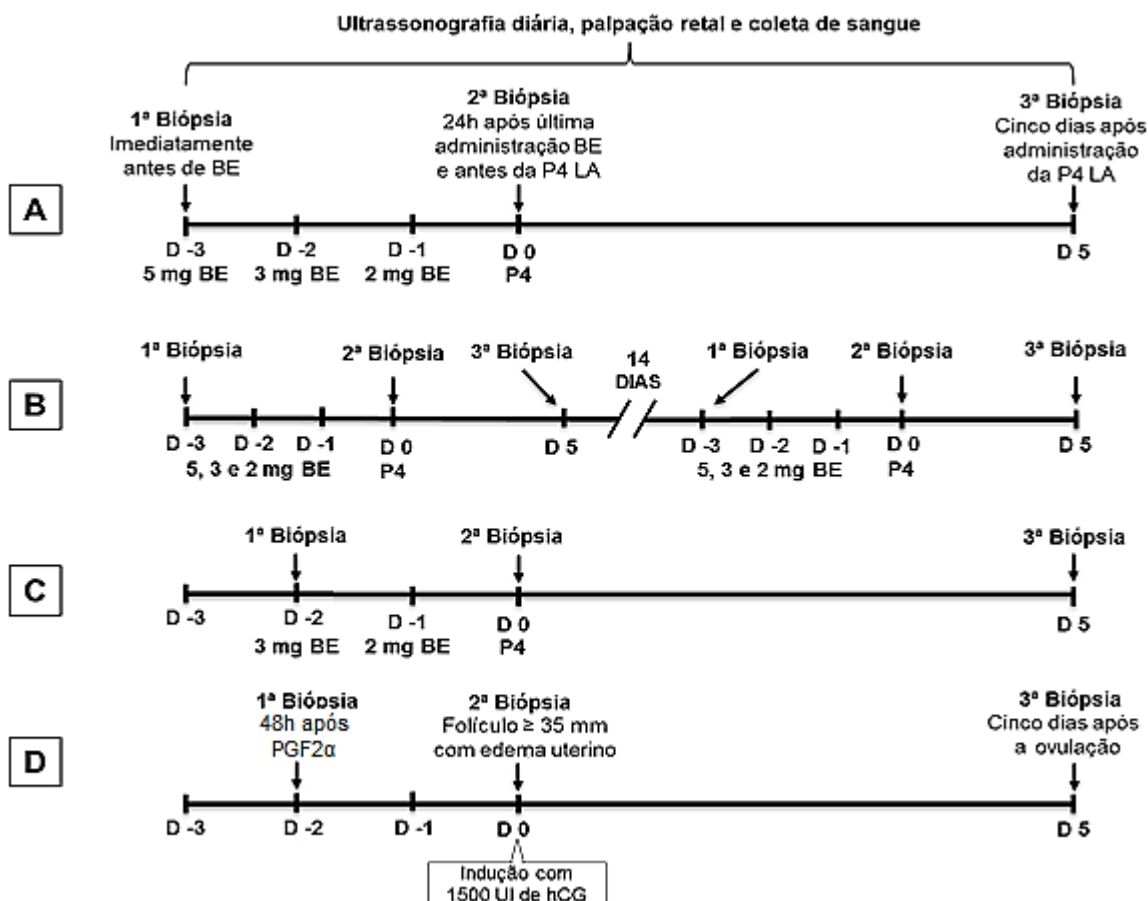
152 Dentre as 21 éguas utilizadas no período de anestro, sete foram selecionadas de  
153 forma aleatória no período ovulatório para compor o grupo controle. As sete éguas cíclicas  
154 foram avaliadas a partir da terceira ovulação da estação (D=0) até cinco dias após (D5), e  
155 não foram tratadas com BE e P4 LA. A indução da terceira ovulação do ano nas éguas  
156 cíclicas foi realizada utilizando 1500 UI de hCG (Vetecor®, Hertape Calier, MG, Brasil)  
157 após a detecção de um folículo que foi acompanhado até atingir  $\geq 35$  mm e edema uterino  
158 favorável a indução (Figura 1 - D).

159

#### 160 *2.4 Biópsias*

161 As amostras de tecido endometrial foram colhidas imediatamente antes do início do  
162 tratamento com BE (M1), 24 horas após a última aplicação do BE (M2) e cinco dias após a  
163 aplicação de P4 LA (M3). No grupo cíclicas, a primeira amostra de tecido (M1) foi  
164 colhida 48 horas após a aplicação de prostaglandina (Lutalyse®) realizada no quinto dia  
165 após a terceira ovulação da estação em éguas com presença de folículos menores que 20  
166 mm de diâmetro, considerando o tempo para ocorrência de luteólise induzida (NEELY et  
167 al. 1979). A segunda amostra (M2) foi colhida no estro, no momento em que a égua  
168 apresentou edema, escore 2 ou 3 e presença de folículo  $\geq 35$  mm de diâmetro. A terceira  
169 amostra (M3) foi obtida no cinco dias após a ovulação (Figura 1D).

170 As amostras de endométrio foram obtidas por via transcervical, na base de um dos  
171 cornos uterinos, com o auxílio de pinça de biópsia (Botupharma®, Botucatu, SP, Brasil).  
172 As biópsias, logo após a colheita, foram divididas em duas partes, sendo uma parte fixada  
173 durante 24 horas em solução formol tamponado 10% e, posteriormente, armazenada em  
174 álcool 70% até o momento da inclusão em parafina, para posterior avaliação histológica e  
175 imunohistoquímica (IHQ); e a outra, congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -  
176 80°C para RT-qPCR.



177

178 **Figura 1** - Esquema representativo dos momentos de administração do benzoato de  
 179 estradiol (BE) seguido da progesterona de longa ação (P4 LA) nos grupos tratados: (A) 10  
 180 mg de BE + P4 LA, (B) Priming Hormonal, (C) 5 mg de BE + P4 LA e seus momentos  
 181 equivalentes nas éguas cíclicas (D).

182

### 183 2.5 Imunohistoquímica

184 Os fragmentos uterinos foram emblocados em parafina e cortados na espessura de 3  
 185  $\mu$ m. As lâminas foram montadas e coradas inicialmente em hematoxilina-eosina (HE) para  
 186 avaliar a qualidade do material. Os cortes selecionados foram desparafinizados com xilol e  
 187 rehidratados em sete diluições em série de etanol. A recuperação antigênica foi realizada  
 188 por aquecimento das lâminas por 30 min em solução tampão de citrato, pH 6. Após o  
 189 tratamento térmico, as lâminas foram resfriadas por 20 min. A inibição das peroxidases  
 190 endógenas foi realizada com 8% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em metanol por 20 min. Em seguida, incubadas  
 191 com 12% de leite em pó desnatado, durante uma hora a 27 °C, para minimizar as ligações  
 192 não específicas do anticorpo.

193 As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários ER $\alpha$  (1:100, mouse  
194 monoclonal SC-311, Santa Cruz Biotechnology), PR (1:100, mouse monoclonal PR-2C5,  
195 Invitrogen) e ER $\beta$  (1:100, mouse monoclonal PPG5/10, Abcam) por 18 horas (overnight).  
196 No outro dia, as lâminas foram lavadas com solução tampão de tris pH 7,4 e tratadas com  
197 anticorpo secundário (N-Histofine Simple Stain® - Nichirei Biosciences Inc.) por 30 min a  
198 27 °C. As lâminas foram lavadas e reveladas com substrato diaminobenzidina (Liquid  
199 DAB Cromogen® – Dako) por 3 min em temperatura ambiente. Subsequentemente, as  
200 lâminas foram lavadas e contra-coradas com hematoxilina de Mayer por 90 segundos,  
201 lavadas com água corrente, desidratadas e montadas para análise. O controle negativo foi  
202 preparado usando solução tampão de tris ao invés do anticorpo primário.

203 As lâminas foram observadas em aumento de 100x, 200x e 400x com microscópio  
204 óptico. A intensidade da imunomarcagem e sua localização na células do epitélio luminal,  
205 epitélio glandular e estroma foram classificada de forma independente por três  
206 observadores que desconheciam quanto as fases reprodutivas e tratamentos hormonais.

207

#### 208 *2.6 Extração de RNA, confecção de cDNA e RT-qPCR*

209 O RNA celular total foi extraído usando-se o Trizol (Trizol® Reagent, Life  
210 Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O  
211 RNA extraído foi diluído em 40  $\mu$ L de água livre de RNase. O RNA (1  $\mu$ L) foi  
212 quantificado pela nanoespectrofotometria (NanoDrop ND1000®) e somente as amostras  
213 com razão 260/280 nm acima de 1.90 foram usadas para análise. As amostras de RNA (2  
214  $\mu$ g/reação) foram tratadas com DNase I livre de RNase (Ambion®, Life Technologies,  
215 Carlsbad, CA, USA) por 30 min à 37 °C, seguido pelo tratamento com o reagente  
216 inativador da DNase (temperatura ambiente por 2 min). Posteriormente, as amostras foram  
217 novamente quantificadas pela espectrofotometria e normalizadas para uma concentração  
218 final de 2.400 ng, pela adição de água livre de endonucleases. A síntese do cDNA foi  
219 realizado com 2.400 ng de RNA total em 40  $\mu$ L de reação utilizando hexâmeros aleatórios  
220 e o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA,  
221 USA).

222 Os primers específicos para o receptor de estrógeno  $\alpha$  (*ESR1*), receptor de estrógeno  
223  $\beta$  (*ESR2*), progesterona (*PGR*) e  $\beta$ -2-microglobulina (*B2M*) foram selecionados baseados  
224 nos primers previamente validados para endométrio de éguas (Klein et al., 2011; Silva et  
225 al., 2014; Tabela 1). A eficiência dos primers variou de 93,8% para 99,3%.

**Tabela 1-** Sequências dos primers e número de acesso ao gene utilizado para a transcrição dos receptores para estrógeno  $\alpha$  (ESR1), estrógeno  $\beta$  (ESR2), progesterona (PGR) e  $\beta$ -2-microglobulina (B2M).

Gene	Número de acesso	Sequência do primer (5' - 3')	Tamanho do produto (bp)
<i>ESR1</i>	NM 001081772	Forward: TCCATGGAGCACCCAGGAAAGC Reverse: CGGAGCCGAGATGACGTAGCC	125
<i>ESR2</i>	XM 001915519	Forward: TCCTGAATGCTGTGACCGAC Reverse: GTGCCTGACGTGAGAAAGGA	116
<i>PGR</i>	XM 001498494	Forward: CTTCCCCGACTGCGCGTACC Reverse: TTGTGTGGCTGGAAGTCGCCG	81
<i>B2M</i>	NM_001082502	Forward: GTGTTCCGAAGGTTTCAGGTT Reverse: ATTTCAATCTCAGGCGGATG	102

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

As reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicatas, utilizando volume final de 20  $\mu$ L: 2  $\mu$ L de cDNA; 10  $\mu$ L de SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen); 1  $\mu$ L de cada primer (*forward e reverse*); e água livre de endonuclease q.s.p. A RT-qPCR foi realizada no 7500 fast Real Time PCR systems (Applied Biosystems<sup>®</sup>), com as seguintes condições de termociclagem: 10 min a 95°C (denaturação inicial) seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C (denaturação) e 1 min a 60°C (anelamento/extensa).

A amplificação dos transcritos específicos foi confirmada pela sobreposição das curvas geradas no final de cada ensaio. A curva padrão foi confeccionada usando a diluição em série de 10 vezes de um “pool” de cDNAs de endométrio equino, utilizado como curva padrão nas reações de RT-qPCR. Alterações nas expressões dos genes foram calculadas pela quantificação média do ciclo (Ct) e normalizadas para o gene endógeno de referência *B2M* para gerar os valores de delta Ct. Os valores da expressão relativa (*R*) dos transcritos foram determinados a partir do modelo matemático de (Pfaffl 2001). Os dados foram obtidos e analisados no software SDS 7500 v.2.05 (Applied Biosystems<sup>®</sup>).

### 2.7 Análises Estatísticas

244

245

Os dados referentes ao tônus e edema uterinos foram representados a partir de medianas e analisados através da forma descritiva.



246 A distribuição das variáveis nos resultados de expressão proteica foram analisadas de  
247 forma não paramétrica. Os resultados de expressão gênica não se desviaram de um padrão  
248 normal (paramétrica). Um modelo misto para médias repetidas (PROC MIXED; Instituto  
249 SAS, 2011) foi utilizado para comparar a média das expressões gênicas relativas dos  
250 transcritos encontradas para ESR1, ESR2 e PGR entre os grupos tratados 5 mg BE+P4, 10  
251 mg BE+P4, Priming Hormonal e grupo de éguas cíclicas bem como entre os momentos.  
252 Para ajustar os valores de P que resultaram em comparações múltiplas foi utilizado o Teste  
253 de Tukey. A estrutura de covariância regressiva resultou no melhor ajuste dos dados e foi  
254 usada para modelar a correlação entre as observações repetidas dentro da mesma égua. A  
255 diferença estatística foi determinada como  $P < 0,05$ .

256

### 257 **3. Resultados**

#### 258 *3.1 Tônus e edema uterinos*

259 As medianas dos edemas e tônus uterinos das éguas cíclicas e tratadas em anestro  
260 estão representadas na Tabela 2. Nos grupos Dose total 5 mg BE+P4 e Dose total 10 mg  
261 BE+P4, a ausência de edema foi observada imediatamente antes do início dos tratamentos  
262 hormonais com BE e atingiu o escore grau três, 24 horas após a aplicação de BE  
263 mantendo-se até o momento da administração de P4 LA no D0. Após a administração de  
264 P4 LA o grau de edema foi reduzindo gradativamente do D1 até o D5. O aumento do tônus  
265 uterino foi observado 24 horas após a administração de P4 LA e alcançando seu escore  
266 grau 2 em D4.

267 O edema uterino grau três nas éguas cíclicas foi observado nos dias D-3 e D-2,  
268 atingindo grau dois 24h antes da ovulação. O menor edema foi observado entre o D1 e D4  
269 após a ovulação, com um ligeiro aumento observado em D5.

270

271

272

273

274

275 **Tabela 2-** Medianas dos escores de edema e tónus uterinos de éguas acíclicas tratadas com  
 276 Benzoato de Estradiol (BE) seguido da administração de 1500 mg de P4 LA no D0, bem  
 277 como as medianas dos escores de edema e tónus uterinos de éguas cíclicas nos  
 278 correspondentes dias de tratamento.

Grupos	Dias relativos a administração de progesterona ou ovulação (D0)														
	Edema uterino									Tónus uterino					
	D-3	D-2	D-1	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D0*	D1	D2	D3	D4	D5
5 mg + LA P4	-	0	3	3	2,5	2	1,5	1,5	1,5	1	1,5	1,5	1,5	2	2
10 mg + LA P4	0	3	3	3	2,5	2	2	2	2	1	1,5	1,5	1,5	2	2
Priming Hormonal	1,5	3	2,5	3	3	2	2	2	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	2
Cíclica	3	3	2	1,5	1	1	1	1	1,5	1	1,5	2	2	2	2

279 \* Tónus e edema uterinos observados imediatamente antes da administração de progesterona.

280

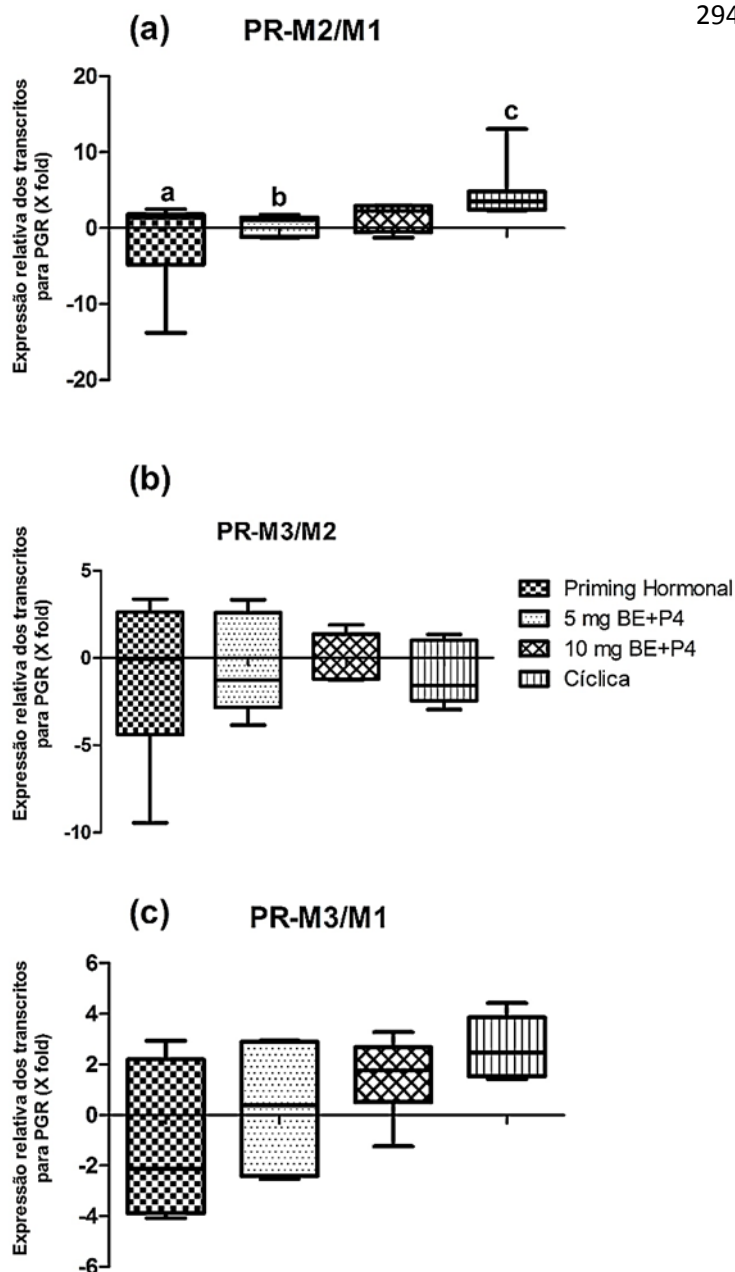
### 281 3.2 Alterações na abundância relativa dos transcritos para PGR, ESR1 e ESR2

282 As alterações na expressão gênica relativa dos transcritos para receptor de  
 283 progesterona – PGR, receptor de estrógeno  $\alpha$  - ESR1, receptor de estrógeno  $\beta$  - ESR2, das  
 284 éguas cíclicas e acíclicas tratadas com diferentes tratamentos hormonais com BE seguido  
 285 de P4 LA, estão apresentadas nas Figuras 2, 3 e 4, respectivamente.

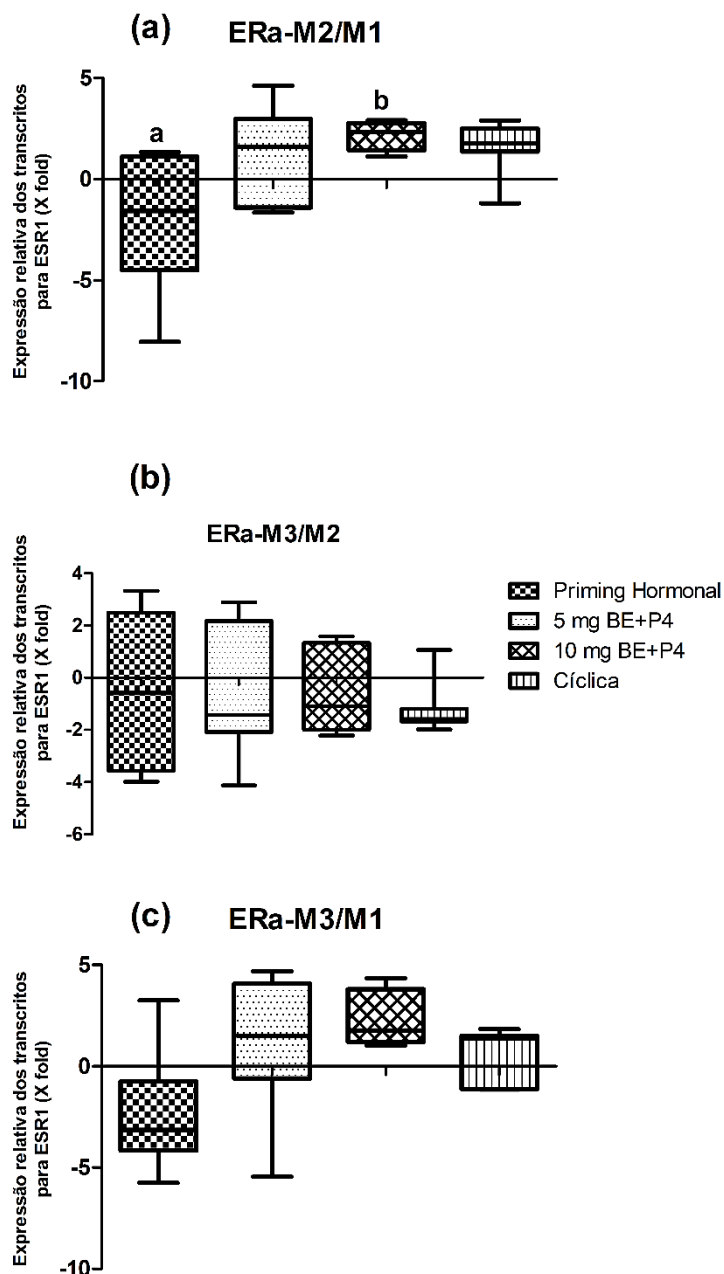
286 Quando os resultados da expressão gênica relativa dos transcritos para PGR foram  
 287 comparadas entre os grupos, foi observada diferença estatística (Figura 1a;  $P < 0,05$ )  
 288 quando a expressão no M2 foi comparada ao M1 nos grupos Priming Hormonal (+1,36  
 289 vezes) e 5 mg BE+P4 (+1,06 vezes) em relação ao grupo das cíclicas (+3,49 vezes).

290 A expressão gênica relativa dos transcritos para ESR1 apresentou diferença (Figura  
 291 2a;  $P < 0,05$ ) quando M2 foi comparado com M1 no grupo de 10 mg BE+P4 (+2,33 vezes)  
 292 em relação ao grupo Priming Hormonal (-1,56 vezes).

293



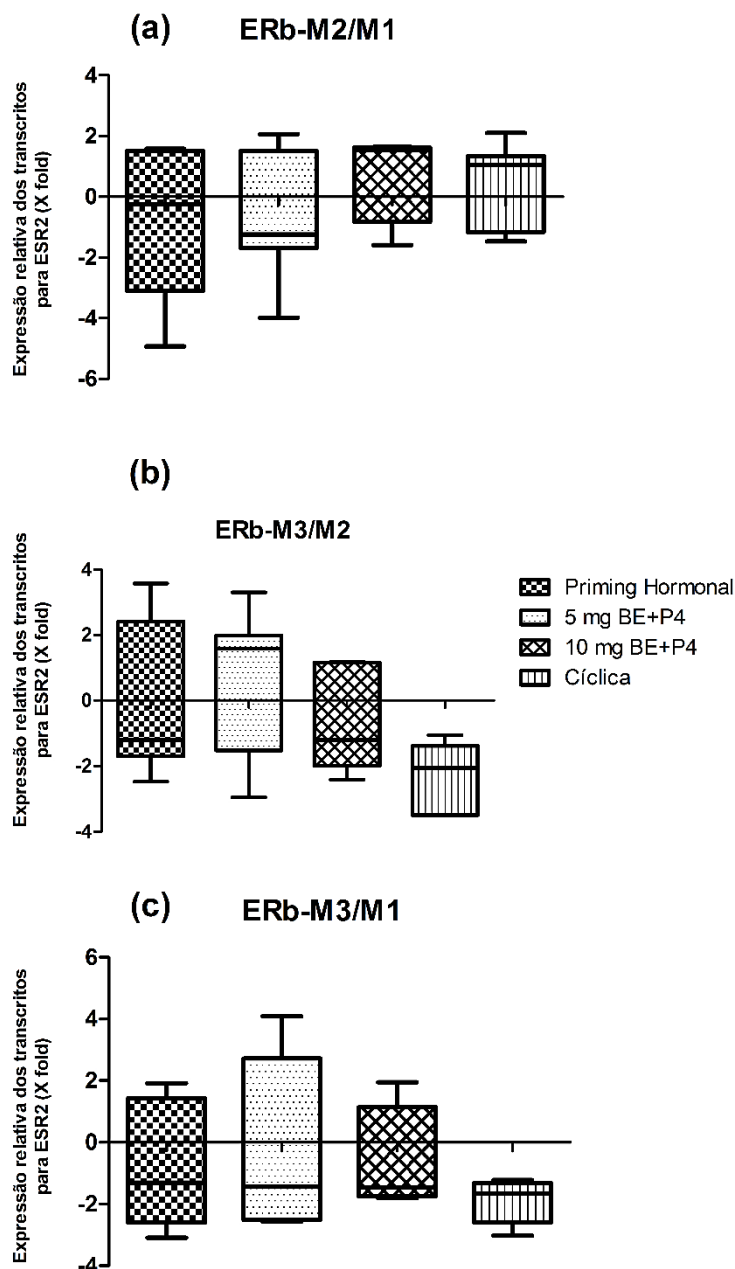
**Figura 2** – Mudanças na expressão relativa dos transcritos para receptor de progesterona – PGR, 24 horas após a última aplicação do BE ( a; M2/M1), cinco dias após a aplicação de P4 LA em relação a última aplicação do BE ( b; M3/M2) e cinco dias após a aplicação de P4 LA em relação à imediatamente antes do início do tratamento com BE (b; M3/M1), nos grupos tratados ou nas cíclicas 48 horas após a aplicação de prostaglandina (M1), a segunda amostra (M2) foi colhida no estro, e a terceira amostra (M3) foi obtida no diestro quando a égua apresentava tônus uterino, cinco dias após a ovulação 1D). Os dados são expressos como média ( $\pm$  EPM) para a expressão relativa de cada transcrição.



295

296

297 **Figura 3** – Mudanças na expressão relativa dos transcritos para receptor de Estrógeno alfa  
 298 – ESR1, 24 horas após a última aplicação do BE ( a; M2/M1), cinco dias após a aplicação  
 299 de P4 LA em relação a última aplicação do BE ( b; M3/M2) e cinco dias após a aplicação  
 300 de P4 LA em relação à imediatamente antes do início do tratamento com BE (b; M3/M1),  
 301 nos grupos tratados ou nas cíclicas 48 horas após a aplicação de prostaglandina (M1), a  
 302 segunda amostra (M2) foi colhida no estro, e a terceira amostra (M3) foi obtida no diestro  
 303 quando a égua apresentava tônus uterino, cinco dias após a ovulação 1D). Os dados são  
 304 expressos como média ( $\pm$  EPM) para a expressão relativa de cada transcrição.



305

306

307 **Figura 4** - Mudanças na expressão relativa dos transcritos para receptor de Estrógeno beta  
 308 – ESR2, 24 horas após a última aplicação do BE ( a; M2/M1), cinco dias após a aplicação  
 309 de P4 LA em relação a última aplicação do BE ( b; M3/M2) e cinco dias após a aplicação  
 310 de P4 LA em relação à imediatamente antes do início do tratamento com BE (b; M3/M1),  
 311 nos grupos tratados ou nas cíclicas 48 horas após a aplicação de prostaglandina (M1), a  
 312 segunda amostra (M2) foi colhida no estro, e a terceira amostra (M3) foi obtida no diestro  
 313 quando a égua apresentava tônus uterino, cinco dias após a ovulação 1D). Os dados são  
 314 expressos como média ( $\pm$  EPM) para a expressão relativa de cada transcrição.

### 315 3.3 Imunolocalização de PR, ER $\alpha$ e ER $\beta$

316 A expressão proteica para PR nos grupos tratados foi detectada tanto nos núcleos  
317 quanto nos citoplasmas do estroma, epitélio luminal e epitélio glandular, antes do  
318 tratamento com BE (Figura 5a, d). Após tratamento com BE (Figura 5b, e) e após  
319 tratamento com P4 LA (Figura 5c, f), a imunolocalização para PR foi observada tanto nos  
320 núcleos quanto nos citoplasmas do estroma, epitélio luminal e principalmente do epitélio  
321 glandular.

322 Nos grupos 5 mg BE+P4 e 10 mg BE+P4, a imunolocalização para ER $\alpha$  foi  
323 evidenciada nos núcleos do estroma, epitélio luminal e do epitélio glandular antes (Figura  
324 6a, d) e após (Figura 6b, e) a aplicação de BE. Porém, após a administração de P4 LA  
325 (Figura 6c, f), a imunolocalização de ER $\alpha$  foi evidenciada no citoplasma do epitélio  
326 glandular em todos os grupos tratados. Já o grupo Priming Hormonal manteve a  
327 imunolocalização de ER $\alpha$  evidenciada tanto no núcleo quanto no citoplasma do epitélio  
328 glandular durante todo o período (Figura 6g, h, i).

329 A imunolocalização para ER $\beta$  foi igualmente observada nos grupos 5 mg BE+P4, 10  
330 mg BE+P4 e Priming Hormonal, detectada nos núcleos do estroma, epitélio luminal e  
331 principalmente nos núcleos do epitélio glandular, antes (Figura 7a, d, g), após tratamento  
332 com BE (Figura 7b, e, h) e evidenciada no citoplasma após tratamento com P4 LA (Figura  
333 7c, f, i).

334 No grupo das éguas cíclicas a imunolocalização para PR, ER $\alpha$  e ER $\beta$  foi evidenciada  
335 nos núcleos do estroma e epitélio luminal, bem como no citoplasma e núcleo do epitélio  
336 glandular durante o estro o que não foi evidenciado no citoplasma cinco dias após a  
337 ovulação (Figura 3k, l; 4k, l; 5k, l). As figuras das lâminas 5j, 6j e 7j consistem no controle  
338 negativo que recebeu solução tampão ao invés do anticorpo primário.

339

340

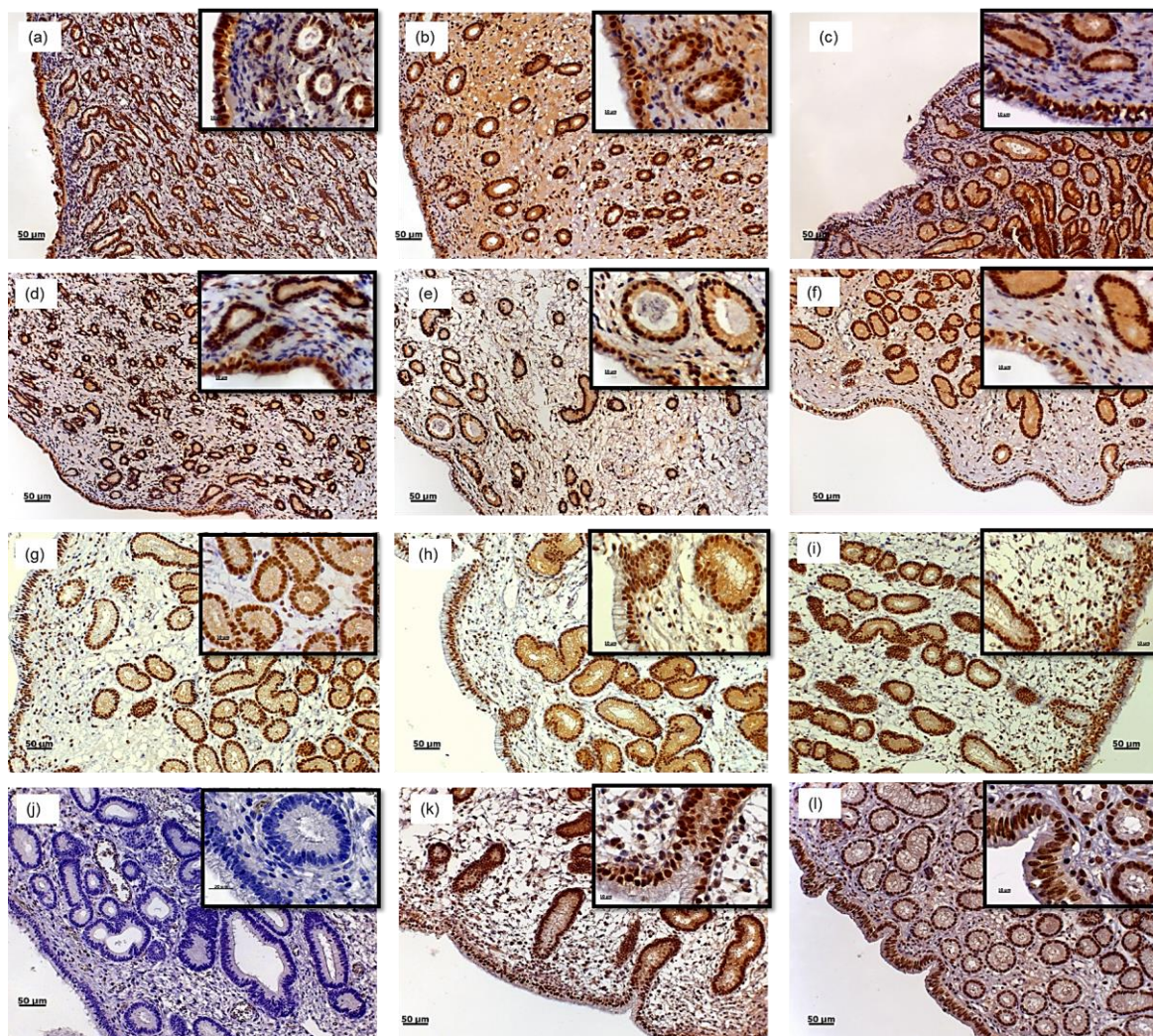
341

342

343

344





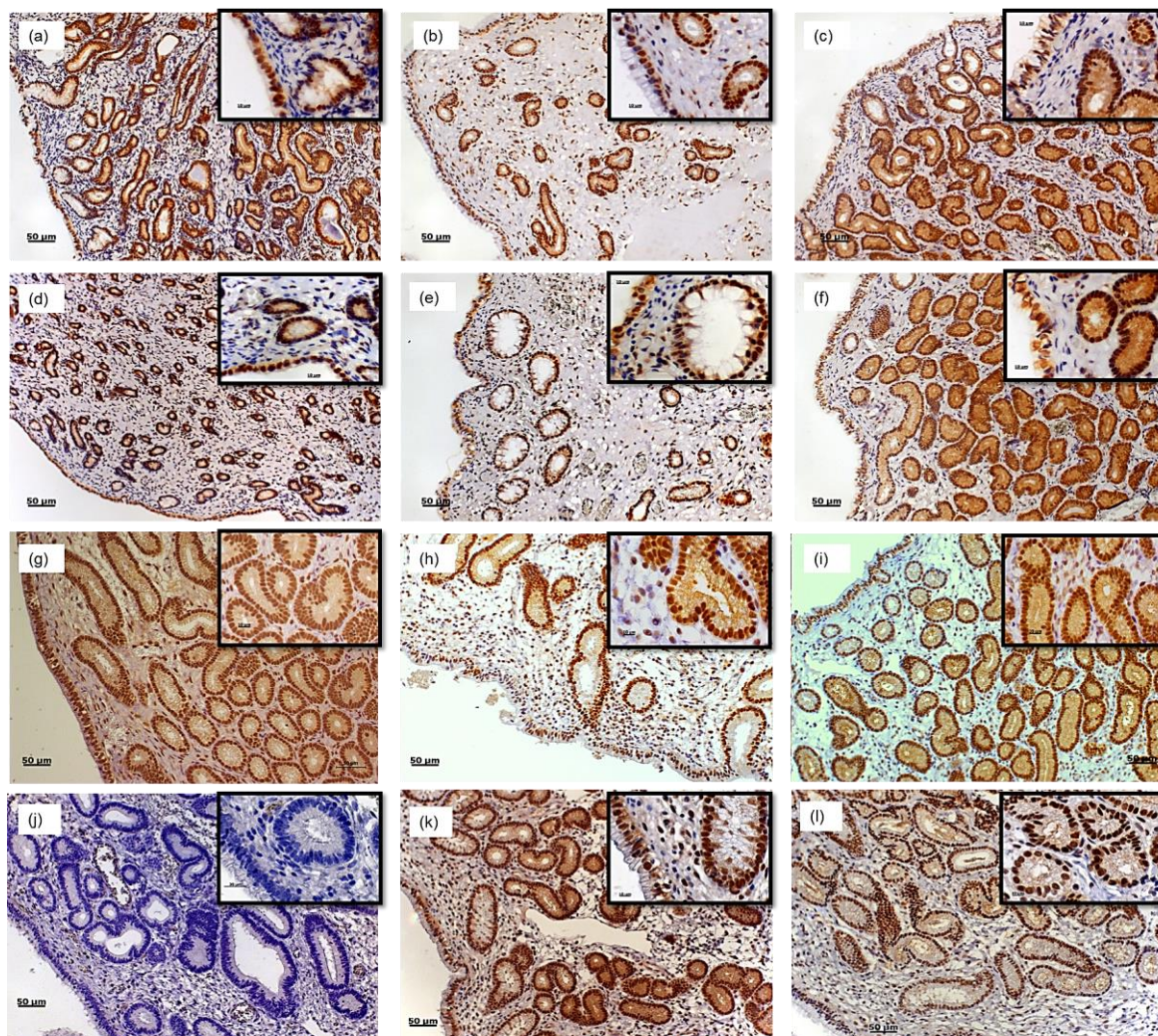
345

346

347 **Figura 5** - Imagem representativa de endométrio equino imunomarcado para receptor de  
 348 progesterona (PR). O painel de figuras mostra imunomarcção imediatamente antes do  
 349 tratamento com Benzoato de Estradiol (BE) na figura *a* (grupo 5 mg + P4 LA), na figura *d*  
 350 (grupo 10 mg + P4 LA) e na figura *g* (grupo Priming Hormonal); 24 horas após última  
 351 administração de BE na figura *b* (grupo 5 mg + P4 LA), na figura *e* (grupo 10 mg + P4  
 352 LA) e na figura *h* (grupo Priming Hormonal) e cinco dias após administração da  
 353 progesterona de longa ação na figura *c* (grupo 5 mg + P4 LA) na figura *f* (grupo 10 mg +  
 354 P4 LA) e na figura *i* (grupo Priming Hormonal). Figuras *k* e *l* mostram expressão proteica  
 355 no período de estro e em cinco dias após ovulação, respectivamente, em éguas  
 356 naturalmente cíclicas. A figura *j* consiste no controle negativo. Barras = 50 µm e 10 µm.

357



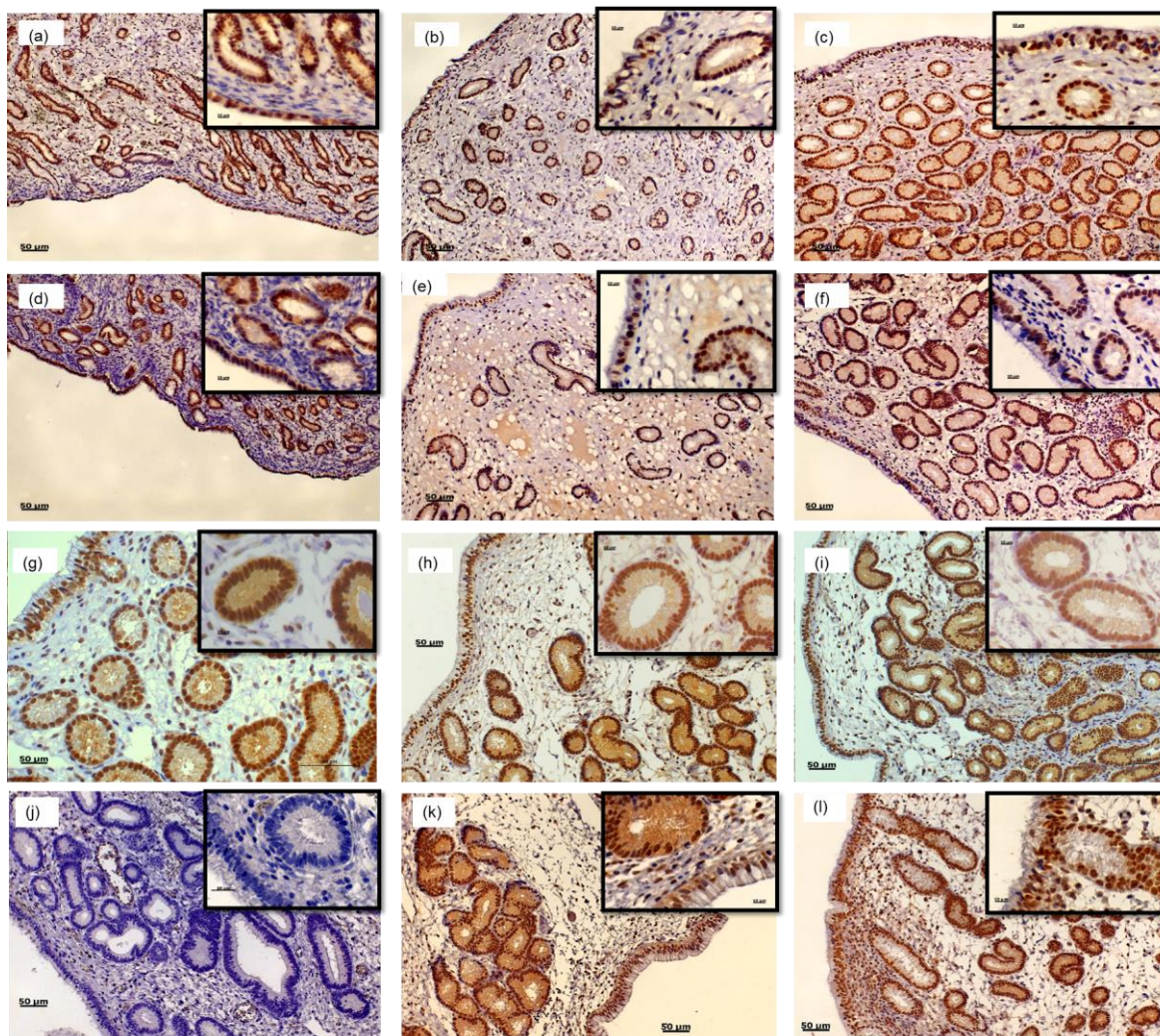


358

359

360 **Figura 6** - Imagem representativa de endométrio equino imunomarcado para receptor de  
 361 estrógeno  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ). O painel de figuras mostra imunomarcção imediatamente antes do  
 362 tratamento com Benzoato de Estradiol (BE) na figura *a* (grupo 5 mg + P4 LA), na figura *d*  
 363 (grupo 10 mg + P4 LA) e na figura *g* (grupo Priming Hormonal); 24 horas após última  
 364 administração de BE na figura *b* (grupo 5 mg + P4 LA), na figura *e* (grupo 10 mg + P4  
 365 LA) e na figura *h* (grupo Priming Hormonal) e cinco dias após administração da  
 366 progesterona de longa ação na figura *c* (grupo 5 mg + P4 LA) na figura *f* (grupo 10 mg +  
 367 P4 LA) e na figura *i* (grupo Priming Hormonal). Figuras *k* e *l* mostram expressão proteica  
 368 no período de estro e em cinco dias após ovulação, respectivamente, em éguas  
 369 naturalmente cíclicas. A figura *j* consiste no controle negativo. Barras = 50  $\mu$ m e 10  $\mu$ m.





370

371

372 **Figura 7** - Imagem representativa de endométrio equino imunomarcado para receptor de  
 373 estrógeno  $\beta$  (ER $\beta$ ). O painel de figuras mostra imunomarcção imediatamente antes do  
 374 tratamento com Benzoato de Estradiol (BE) na figura *a* (grupo 5 mg + P4 LA), na figura *d*  
 375 (grupo 10 mg + P4 LA) e na figura *g* (grupo Priming Hormonal); 24 horas após última  
 376 administração de BE na figura *b* (grupo 5 mg + P4 LA), na figura *e* (grupo 10 mg + P4  
 377 LA) e na figura *h* (grupo Priming Hormonal) e cinco dias após administração da  
 378 progesterona de longa ação na figura *c* (grupo 5 mg + P4 LA) na figura *f* (grupo 10 mg +  
 379 P4 LA) e na figura *i* (grupo Priming Hormonal). Figuras *k* e *l* mostram expressão proteica  
 380 no período de estro e em cinco dias após ovulação, respectivamente, em éguas  
 381 naturalmente cíclicas. A figura *j* consiste no controle negativo. Barras = 50  $\mu$ m e 10  $\mu$ m.

382

383

#### 384 4. Discussão

385 A oferta e qualidade das receptoras durante principalmente o início e final da estação  
386 de reprodução, são fatores limitantes para o sucesso de um programa de TE, uma vez que  
387 existe manejo diferenciado entre éguas doadoras e receptoras, além disso, uma pressão  
388 econômica para que os potros nasçam o mais próximo possível do início do ano hípico  
389 (NAGY, 2000). Para induzir características uterinas similares as encontradas nas éguas  
390 cíclicas durante a fase estral, foram avaliados três diferentes tratamentos hormonais com  
391 BE seguidos de P4 LA comumente realizados em protocolos hormonais de éguas  
392 receptoras acíclicas (CARNEVALE et al., 2000; ROCHA FILHO et al, 2004; SILVA  
393 2014a, 2015a, 2015b) os quais mantiveram resultados superiores quando comparados a  
394 utilização de éguas cíclicas em programas de TE (GRECO et al., 2015).

395 O efeito das doses utilizadas nos grupos tratados com doses totais de 5 mg BE+P4,  
396 10 mg BE+P4 e Priming Hormonal foi semelhante ao encontrado por Silva (2015b) em  
397 seus grupos de éguas em transição e anestro tratados com dose única de 2,5 mg de BE+P4  
398 LA, no que diz respeito ao edema uterino observado 24 horas após a primeira  
399 administração de BE, este edema se manteve alto por 3 a 2 dias anteriores ao dia da  
400 administração de 1500 mg P4 LA como observado no grupo das éguas cíclicas de 3 a 2  
401 dias anteriores à ovulação (GINTHER, 1992) e foram eficientes em induzir tônus uterino  
402 intermediário como observado no diestro (SILVA, 2015b). Adicionalmente, um aumento  
403 do edema pôde ser observado cinco dias após a ovulação no grupo das éguas cíclicas. Isso  
404 se deve, pela provável produção de estrógenos pelo corpo lúteo em desenvolvimento  
405 (DAELS et al., 1991) e preparação do ambiente uterino para o recebimento do embrião.

406 De acordo com o observado no grupo de éguas cíclicas e confirmado por estudos  
407 descritos na literatura (AUPPERLE et al., 2000; SPENCER e BAZER, 2002; HARTT et  
408 al., 2005; SILVA et al. 2014, 2015b), a expressão proteica para os receptores de E2 e P4  
409 presentes no endométrio de éguas cíclicas foi evidenciado durante o estro, justificado pelo  
410 estímulo dos altos níveis de estrógenos circulantes. Porém quando os níveis circulantes de  
411 P4 estão elevados, os receptores de E2 e P4 sofrem *down-regulation* no diestro tardio.  
412 Apesar da P4 LA ser eficiente em manter a gestação após a TE (BRINGEL et al., 2003),  
413 não Interferiu na dinâmica da expressão gênica e proteica dos receptores de E2 e PR, cinco  
414 dias após sua administração. Em vista da indução, pela aplicação de 1500 mg de P4 LA, de  
415 um perfil hormonal diferente do observado em éguas cíclicas que se tornam naturalmente  
416 gestantes (SILVA, 2015b).

417 Após a administração do BE nos grupos tratados ou ovulação em éguas cíclicas, foi  
418 observado um aumento na expressão proteica para PGR em todos os grupos. Estes  
419 resultados foram semelhantes aos encontrados por Silva (2015b) quando comparou os  
420 grupos transição e anestro tratados com dose total de 2,5 mg BE+P4 LA com o grupo de  
421 éguas cíclicas. Porém sem correlação com a expressão gênica relativa dos transcritos  
422 observada nos grupos 5 mg BE+P4 e Priming Hormonal quando comparados ao grupo de  
423 éguas cíclicas ( $P > 0,05$ ). O grupo dose total 10 mg BE+P4 não apresentou significância  
424 estatística em relação as éguas cíclicas, sugerindo uma similaridade deste tratamento  
425 hormonal com a dinâmica da expressão gênica relativa para PGR observada no grupo de  
426 éguas cíclicas.

427 Os resultados obtidos da expressão gênica relativa dos transcritos para ESR1 após  
428 administração do BE, diferiram estatisticamente entre o grupo Priming Hormonal e o  
429 grupo dose total de 10 mg BE+P4 ( $P < 0,05$ ). Porém, não foi observada diferença entre o  
430 grupo Priming Hormonal e os demais grupos. Sugerindo que existe similaridade na  
431 expressão gênica endometrial relativa dos transcritos para ESR1 de éguas receptoras  
432 acíclicas reutilizadas após 14 dias com as receptoras tratadas com dose total de 5 mg de  
433 BE+P4 e as cíclicas.

434 Após administração do BE foi observada similaridade na expressão gênica relativa  
435 dos transcritos para ESR2, entre o grupo das éguas tratadas e o controle. Tais resultados  
436 diferiram dos encontrados por Silva (2015b) que evidenciou uma redução desta expressão  
437 gênica nos grupos das éguas tratadas com 2,5 mg BE+P4 LA nos períodos de anestro e  
438 transição. Após a aplicação de P4 LA ou a ovulação em éguas cíclicas, foi evidenciado  
439 redução somente na expressão gênica em todos os grupos. Resultados semelhantes foram  
440 observados por Silva (2015b) no grupo de éguas cíclicas, porém divergiram dos grupos de  
441 éguas tratadas com 2,5 mg de BE+P4 LA nos períodos de transição e anestro. As  
442 divergências observadas no presente estudo, quando comparadas com o estudo supracitado,  
443 devem-se à dose utilizada, visto que o tratamento realizado com dose total de 10 mg  
444 BE+P4 proporcionou uma maior estimulação dos receptores para ESR1, quando  
445 comparado com a dose total de 2,5 mg de BE+P4 LA.

446 No que se refere a expressão relativa de transcritos para PGR, após a administração  
447 de P4 LA, foi observado redução apenas nos grupos tratados com 5 mg BE+P4, Priming  
448 Hormonal e éguas cíclicas, porém sem diferença estatística ( $P < 0,05$ ). O grupo de éguas  
449 tratadas com 10 mg BE+P4 apresentou um aumento na expressão relativa de transcritos  
450 para PGR após a aplicação de P4 LA. Silva (2015b), também observou uma redução na

451 expressão relativa dos transcritos para PGR utilizando uma dose diferente (2,5 mg BE+P4  
452 LA após a aplicação de P4 LA). A diferença observada entre o grupo tratado com 10 mg  
453 BE+P4 e o grupo descrito pela autora (2,5 mg BE+P4 LA após a aplicação de P4 LA),  
454 pode estar relacionada, com a dose utilizada e com um possível excesso na estimulação da  
455 expressão dos receptores provenientes do grupo de 10 mg BE+P4.

456 Em conclusão, os protocolos hormonais utilizados no presente estudo foram eficazes  
457 em promover características morfológicas como tônus e edema uterinos semelhantes as  
458 encontradas em éguas cíclicas como edema e tônus uterinos. Adicionalmente, o grupo  
459 Priming Hormonal demonstrou induzir características uterinas similares as observadas no  
460 grupo dose total de 5 mg BE+P4 e no grupo de éguas cíclicas, após 14 dias de intervalo. O  
461 tratamento hormonal com dose total de 10 mg de BE+P4 LA, utilizado para o preparo de  
462 receptoras acíclicas, demonstrou ser similar em relação ao tônus e edema uterino,  
463 expressão proteica e expressão gênica relativa dos transcritos para os receptores  
464 endometriais de E2 e P4 quando comparado as mesmas características uterinas em éguas  
465 cíclicas.

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485 **5. Referências**

- 486 Botelho JHV, et al. Hormone supplementation protocol using estradiol benzoate and long-acting  
487 progesterone is efficient in maintaining pregnancy of anovulatory recipient mares during autumn  
488 transitional phase. *Animal Reproduction Science*, 2015; 153: 39–43.
- 489 Carnevale EM, et al. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine  
490 embryo transfer. *Theriogenology*, 2000; 54: 965–979.
- 491 Daels PF, Ammon DC, Stabenfeldt GH, Liu IKM, Hughes JP and Lasley BL. Urinary and Plasma  
492 estrogen conjugates, estradiol and estrone concentrations in nonpregnant and early pregnant mares.  
493 *Theriogenology*, 1991; 35: 1001-1017.
- 494 Greco GM, et al. Use of long-acting progesterone to acyclic embryo recipient mares. *Revista*  
495 *Brasileira de Zootecnia*, 2012; 41: 607–611.
- 496 Greco GM, et al. Novel long-acting progesterone protocols used to successfully synchronize donor  
497 and recipient mares with satisfactory pregnancy and pregnancy loss rates. *Journal of Equine*  
498 *Veterinary Science*, 2015.
- 499 Hayes KEN, Ginther OJ. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in  
500 mares. *Theriogenology*, 1986; 25: 581-590.
- 501 Hinrichs K, Sertich PL, Cummings MR, Kenney MR. Pregnancy in ovariectomized mares achieved  
502 by embryo transfer. *Equine Veterinary Journal*, 1985; 3: 74-75.
- 503 Hinrichs K, Sertich PL, Kenney RM. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as  
504 embryo transfer recipients. *Theriogenology*, 1986; 26: 455-60.
- 505 IETS. Disponível em: < [http://www.iets.org/pdf/comm\\_data/December2014](http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2014) >. Acesso em: 09 set.  
506 2015.
- 507 Kaercher F, et al. Embryo transfer in anovulatory recipient mares treated with estradiol benzoate  
508 and long-acting progesterone. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2013; 33: 205-209.
- 509 Mccue PM, Scoggin CF, Lindholm AFG. Estrus. In: Mckinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner  
510 DD. *Equine Reproduction*. 2 Ed. Ames:Blackwell Publishing, 2011; 179: 1716-1727.
- 511 Mckinnon AO, Squires EL, Carnevale EM, Hermetet MJ. Ovariectomized steroidtreated mares as  
512 embryo transfer recipient and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance.  
513 *Theriogenology*, 1988; 29: 1055-63.
- 514 Neely PD, Kindahl H, Stabenfeldt GH, Edquist LE, Hughes JP. Prostaglandin release patterns in  
515 the mare: physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. *Journal of Reproduction and*  
516 *Fertility*, 1979; 27: 181-189.
- 517 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic*  
518 *Acids Research*, 2001; 29: 2002-2007.
- 519 Pinto CRF. Progestagens and Progesterone. In: Mckinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD.  
520 *Equine Reproduction*. 2 Ed. Ames:Blackwell Publishing, 2011; 189: 1811-1817.
- 521 Rocha Filho NA, et al. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with  
522 short or long acting progesterone. *Animal reproduction*, 2004; 1: 91–95.
- 523 Silva ESM, et al. Supplementary corpora lutea monitoring allows progestin treatment interruption  
524 on day 70 of pregnancy in non-cyclic recipient mares. *Animal Reproduction Science*, 2014; 144:  
525 122–128.
- 526 Silva ESM, et al. Ultrasonography of the conceptus development from days 15 to 60 of pregnancy  
527 in non-cyclic recipient mares. *Ciência Rural*, 2015a; 45: 512-518.
- 528

- 529 Silva ESM. Efeitos da administração de estradiol e progesterona sobre a concentração hormonal e  
530 expressão endometrial dos receptores de estrógeno e progesterona em éguas receptoras acíclicas  
531 [Tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2015b.
- 532
- 533 Vanderwall DK. Progesterone. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. Equine  
534 Reproduction. 2 Ed. Ames:Blackwell Publishing, 2011; 170: 1637-1641.