

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 03/05/2017.

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 α - Receptor de Estrógeno Alfa
ER β - Receptor de Estrógeno Beta
ESR1 – Transcritos para o Receptor de Estrógeno Alfa
ESR2 - Transcritos para o Receptor de Estrógeno Beta
H₂O₂ – 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
PGF₂ α – Prostaglandina 2 α
pH – Potencial Hidrogeniônico
RNA – Ácido Ribonucléico
RNAm – Ácido Ribonucléico Mensageiro
RT-qPCR – Transcriptidase Reversa Quantitativa PCR
UI – Unidade Internacional
 μ L – Microlitro
 μ 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 α (ESR1), estrógeno β (ESR2), progesterona (PGR) e β -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 μ m e 10 μ m. 45

Figura 6 - Imagem representativa de endométrio equino imunomarcado para receptor de estrógeno α (ER α). 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 μ m e 10 μ m. 46

Figura 7 - Imagem representativa de endométrio equino imunomarcado para receptor de estrógeno β (ER β). 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 μ m e 10 μ 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, ERα e ERβ</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.

3. REFERÊNCIAS¹

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.

¹Referências 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 >. 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 α 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 α and β . **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 α 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.