

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

NOVOS PROTOCOLOS HORMONAIIS PARA TRANSFERÊNCIA  
DE EMBRIÕES EM EQUINOS EM TEMPO FIXO

IVAN VERDUSSEN DE OLIVEIRA NETO

Botucatu – SP  
Abril de 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

NOVOS PROTOCOLOS HORMONAIIS PARA TRANSFERÊNCIA DE  
EMBRIÕES EM EQUINOS EM TEMPO FIXO

IVAN VERDUSSEN DE OLIVEIRA NETO

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia Animal para obtenção do  
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio  
Dell'Aqua Jr

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

Oliveira Neto, Ivan Verdussen.

Protocolos hormonais para transferência de embriões equinos em tempo fixo / Ivan Verdussen Oliveira Neto. - Botucatu, 2017

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

Orientador: José Antonio Dell'Aqua Júnior

Capes: 50504002

1. Equino - Reprodução. 2. Transferência de embriões.  
3. Sincronização. 4. Progesterona.

Palavras-chave: Altrenogest; Equino; Protocolos hormonais; Receptoras cíclicas e acíclicas; Sincronização.

Nome do autor: Ivan Verdussen de Oliveira Neto

Título: NOVOS PROTOCOLOS HORMONAIIS PARA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS EM TEMPO FIXO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Antonio Dell'Aqua Jr

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – Unesp – Botucatu-SP

Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga

Membro Titular

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – Unesp – Botucatu-SP

Dr. Márcio Teoro do Carmo

Membro Titular

Central de Reprodução Animal Haras Lub Breeding

Data da defesa: 27/04/2017.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Valores médios $\pm$ desvio padrão do edema uterino nos dias antes da aplicação do altrenogest e escore uterino no dia da transferência de embrião nos diferentes grupos estudados, das éguas submetidas ao protocolo com apenas uma aplicação de prostaglandina do D-4.....	31
TABELA 2 – Taxa de prenhez e perda embrionária nos diferentes grupos estudados, das éguas submetidas ao protocolo com apenas uma aplicação de prostaglandina do D-4.....	32
TABELA 3 – Valores médios $\pm$ desvio padrão do edema uterino nos dias antes da aplicação do altrenogest e escore uterino no dia da transferência de embrião nos grupos controle e receptoras com CL < 5 dias, submetidas ao protocolo com duas aplicações de prostaglandina no D-4 e D-3.....	33
TABELA 4 – Taxa de prenhez e perda embrionária no grupo controle e receptoras com CL < 5 dias, submetidas ao protocolo com duas aplicações de prostaglandina no D-4 e D-3.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS

Transferência de embriões	<b>TE</b>
Corpo Lúteo	<b>CL</b>
Hormônio Luteinizante	<b>LH</b>
Hormônio Folículo Estimulante	<b>FSH</b>
Progesterona	<b>P4</b>
Estrógeno	<b>E2</b>
Intramuscular	<b>IM</b>
Longa ação	<b>LA</b>
Tônus uterino	<b>UT</b>
Imagem ultrassonográfica	<b>US</b>
Gonadotrofina coriônica humana	<b>HCG</b>
Prostaglandinas	<b>PGs</b>
Diagnostico de gestação	<b>DG</b>

## SUMÁRIO

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	3
1 INTRODUÇÃO .....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	6
2.1 <i>Fisiologia do ciclo estral da égua</i> .....	6
2.2 <i>Sazonalidade e ciclo estral em éguas</i> .....	7
2.3 <i>Mecanismo de ação hormonal</i> .....	10
2.3.1 Prostaglandinas (PGs) .....	11
2.3.2 Estrógenos (E2) .....	12
2.3.3 Progesterona (P4) ou progestágenos .....	12
2.3.4 Gonadotrofina coriônica humana (hCG) .....	13
2.3.5 Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) .....	13
2.4 <i>Sincronização entre doadoras e receptoras de embriões e sua importância na técnica de TE</i> .....	14
2.6 <i>Protocolos hormonais para éguas receptoras de embriões</i> .....	15
REFERÊNCIAS .....	18
3.1 <i>Objetivos específicos</i> .....	23
TRABALHO CIENTÍFICO .....	24
RESUMO .....	25
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	27
2.1 <i>Animais</i> .....	27
2.2 <i>Delineamento experimental</i> .....	27
2.3 <i>Manejo da Doadora e obtenção dos embriões</i> .....	28
2.4 <i>Transferência dos embriões</i> .....	28
2.5 <i>Avaliações uterinas</i> .....	28
2.6 <i>Acompanhamento da gestação</i> .....	28
2.6.1. <i>Palpação retal</i> .....	29
2.6.2. <i>Ultrassonografia</i> .....	29
2.7. <i>Modificação do protocolo proposto</i> .....	29
2.8 <i>Análise Estatística</i> .....	30
3 RESULTADOS .....	30
4 DISCUSSÃO .....	33
REFERÊNCIAS .....	37

OLIVEIRA, I.V. **Utilização de éguas cíclicas ou acíclicas como receptoras de embriões em tempo fixo.** Botucatu, 2017. 48f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

Nos programas de transferência de embriões um dos principais entraves são a disponibilidade de receptoras aptas por doadora de embrião. Sendo assim, estudos estão sendo desenvolvidos utilizando de diferentes protocolos hormonais para utilização nas receptoras em programas de TE. O objetivo do presente trabalho foi sincronizar éguas receptoras de embriões, independentes da fase do ciclo estral e da atividade ovariana, com o ciclo da doadora, maximizando a utilização das receptoras no programa de transferência de embriões (TE). Foram utilizadas 160 éguas, que foram separadas em grupos de 20 animais conforme a fase do ciclo estral: 1) éguas acíclicas em anestro e transição, 2) cíclicas em estro com folículos < 35 mm, 3) em estro com folículos  $\geq$  35 mm, 4) em diestro com CL < 5 dias e 5) em diestro com CL  $\geq$  5 dias. Inicialmente, todos os animais receberam uma aplicação de 10mg de dinoprost trometamina e 1 aplicação de 17 $\beta$  estradiol por 4 dias consecutivos seguido por uma aplicação de 300 mg de altrenogest. Posteriormente, o protocolo foi modificado e realizado em mais um grupo 6) com uma dose de 10mg de dinoprost trometamina no segundo dia do tratamento. Os embriões foram transferidos de três a oito dias após a aplicação do altrenogest. O diagnóstico de gestação foi efetuado 5 a 7 dias após a TE. Com apenas uma aplicação de prostaglandina no primeiro dia de tratamento todos os animais apresentaram edema uterino acentuado e taxas de prenhez superior a 70%, entretanto as receptoras que ao início do tratamento apresentavam a presença de CL < 5 dias mostraram um edema uterino significativamente menor que os demais grupos e índices de gestação de 40%, inferiores aos observados nos demais grupos. Entretanto, quando este grupo foi submetido a duas aplicações de prostaglandina nos dois primeiros dias do tratamento as taxas de gestação aumentaram para 70%. Baseado nos dados obtidos pode-se concluir que boas taxas de prenhez de receptoras de embrião estão relacionadas a uma eficiente sensibilização uterina ao estrógeno que contribui para a posterior ação

progesteronica fundamental para obtenção da sincronização do ambiente uterino.

**Palavras-chave:** Transferência de Embrião, receptoras cíclicas e acíclicas, protocolos hormonais, equino, altrenogest, sincronização.

OLIVEIRA, I.V. **The use of cyclic or acyclic mares as fixed-time embryo receptors.** Botucatu, 2017. 42f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

#### ABSTRACT

In embryo transfer programs, one of the main obstacles is the availability of recipients suitable for embryo donors. Thus, studies are being developed using different hormonal protocols for use in recipients in ET programs. The objective of the present study was to synchronize the uterine environment of embryo recipient mares, independent of the estrous phase and ovarian activity, with the donor cycle, maximizing the use of recipients in the embryo transfer program. A total of 160 mares were used, which were separated into groups of 20 animals according to the estrous phase: acyclic mares in anestrus and transition, cyclic estrus with follicles <35 mm, estrus with follicles  $\geq 35$  mm, in right ventricle with CL <5 Days and in right arm with CL  $\geq 5$  days. Initially, all animals received an application of 10 mg of dinoprost tromethamine and 1 application of 17 $\beta$  estradiol for 4 consecutive days followed by a 300 mg application of altrenogest. Subsequently, the protocol was modified and another 10mg dose of dinoprost tromethamine was added on the second day of treatment. The embryos were transferred three to eight days after the application of altrenogest. The diagnosis of gestation was made 5 to 7 days after ET. With only one application of prostaglandin on the first day of treatment, all the animals had marked uterine edema and pregnancy rates higher than 70%; however, those receiving at the start of treatment had a CL <5 days showed significantly lower uterine edema than The other groups and gestation rates of 40%, lower than those observed in the other groups. However, when this group underwent two prostaglandin applications on the first two days of treatment, gestation rates increased to 70%. Based on the data obtained it can be concluded that good pregnancy rates of embryo recipients are related to an efficient uterine sensitization to estrogen that contributes to the subsequent progesterone action fundamental to obtain the synchronization of the uterine environment.

**Keywords:** Embryo transfer, cyclic and acyclic receptors, TE protocols, equine

## 1 INTRODUÇÃO

A transferência de embrião equina contribui ativamente para a multiplicação de reservas genéticas superiores. Possibilita ainda a obtenção de descendentes de animais que se tornaram subférteis, o melhor aproveitamento de éguas que possuem alto valor zootécnico, que estejam em atividade esportiva ou dificuldade reprodutiva devido à idade avançada.

A sincronização do ciclo estral é um fator relevante para TE. A taxa de prenhez, após transferência de embrião está intimamente relacionada às condições e a preparação das receptoras. Esta é a atividade que consome mais tempo em um centro de TE, uma vez que as éguas devem ser examinadas rotineiramente por palpação transretal e ultrassonografia do trato reprodutivo.

Éguas doadoras em estro devem ser examinadas uma vez ao dia assim que um folículo dominante é identificado, sendo essa prática essencial para determinar o dia da ovulação que é designado como Dia 0 (D0).

A utilização de protocolos com estrógenos e progestágenos para a utilização de éguas receptoras acíclicas em programas de TE tem sido cada vez mais estudados por diversos pesquisadores. Porém, não há estudos que relatam um único protocolo hormonal para receptoras de embriões, independente da fase do ciclo que esta se encontre. O objetivo deste trabalho é estabelecer um protocolo hormonal em tempo fixo para éguas receptoras de embriões equinos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Fisiologia do ciclo estral da égua*

Na espécie equina, o ciclo estral é uma combinação de fatos fisiológicos que ocorrem entre duas fases, estro e diestro, podendo também denominá-las de fase folicular e fase luteal, período correspondente ao intervalo entre uma ovulação e a ovulação subsequente (ANDRADE, 1986; DIELEMAN et al., 1986)

Em média, o ciclo estral tem duração de 21 dias em éguas, podendo haver variações de acordo com o ambiente, raça, comportamento e índole de cada animal, e a dificuldade de prever a fase exata de estro e do diestro se torna um fator predisponente a essa variação.

O conhecimento e a manipulação da duração do ciclo estral e suas fases em equinos têm-se tornado muito importante com a crescente utilização de técnicas de inseminação artificial e TE na espécie.

A fase de estro ou fase folicular em éguas é caracterizada pelo período de receptividade sexual, com variação de 3 a 7 dias. Nesta fase, o ovário da égua produz folículos dominantes, além da produção de elevados níveis de estrógenos pelas células da granulosa (ROMANO; MUCCIOLO; SILVA, 1998).

As quantidades crescentes de estradiol secretadas pelos folículos ovarianos, induzem o comportamento de estro e a elevação dos níveis de hormônio luteinizante (LH) pela ativação dos seus receptores nas células da granulosa, promovendo, portanto, a ovulação e a formação do corpo lúteo (CL) por meio da retroalimentação positiva no sistema hipofisário (GINTHER, 1992).

Durante a fase estral, a elevação dos níveis de estrógeno é responsável pela instalação do edema uterino, o qual tende a diminuir nos dois dias que antecedem a ovulação (MCKINNON; CARNEVALE, 1993).

A fase de diestro ou fase luteal dura com variação de 13 a 17 dias, e caracteriza-se pela produção de progesterona (P4) pelo CL. Nessa fase há o término das manifestações dos sinais do cio, que ocorrem entre 24 e 48 h após a ovulação, resultado da formação do CL (LEY, 2006).

O CL produz progesterona em quantidades crescentes, do segundo ao décimo dia pós-ovulação e, até o décimo segundo dia, ocorre uma queda

acentuada nas concentrações plasmáticas de progesterona, ocasionando a luteólise entre o décimo quarto e o décimo sexto dia do ciclo estral (GINTHER, 1992; NEELY et al., 1989).

Fêmeas equinas apresentam atividade sexual durante a fase de maior luminosidade, que ocorre na primavera e no verão, uma vez que o fator determinante deste comportamento é a duração do período de luz nas regiões temperadas. Devido a essas características, fêmeas equinas são classificadas como monovulatórias poliéstricas estacionais.

O estímulo luminoso nas éguas impede a produção de melatonina através do eixo pineal-hipotalâmico-hipofisário-gonadal, e uma vez liberada a melatonina pela glândula pineal, esta bloqueia a produção de gonadotrofina (GnRH) no hipotálamo, afetando a produção hipofisária e diminuindo a liberação do LH e folículo-estimulante (FSH), os quais são fundamentais para a seleção e dominância folicular induzindo ao recrutamento para o início de um novo ciclo estral (MCKINNON; VOSS, 1993).

Em decorrência desses fatores, as éguas atingem a maturidade sexual quando alcançam a puberdade, o que ocorre por volta dos dois anos de idade, podendo ser alterada pela influência das condições corporais, peso, níveis de energia, ferormônios e a estação do ano (BORTOT; ZAPPA, 2013).

## *2.2 Sazonalidade e ciclo estral em éguas*

Entende-se que a égua se classifica como poliéstrica sazonal em relação à sua reprodução, ou seja, possuem um período de atividade reprodutiva bem definida durante o ano. Esta condição sazonal está associada ao aumento no número de horas de luz por dia (fotoperíodo), temperatura e disponibilidade de alimento. Sua fase cíclica compreende épocas do ano com dias maiores e, conseqüentemente, com maior fotoperíodo, sendo as estações da primavera e verão. Ainda, possui um período acíclico fisiológico nos meses com dias mais curtos e com menor fotoperíodo, compreendendo as estações de outono e inverno (GINTHER, 1992).

A sazonalidade reprodutiva é dividida em quatro fases, baseada na dinâmica folicular: fase de anestro, de transição de primavera, ovulatória e de transição de outono (GINTHER et al., 2004). Geralmente, durante o período de

transição de primavera, um manejo alimentar diferenciado é oferecido a doadoras e receptoras nas propriedades rurais e centrais de TE, fazendo com que éguas doadoras iniciem a atividade cíclica mais cedo no ano, enquanto as receptoras permanecem em anestro.

O padrão geral da sazonalidade equina compreende pouca, ou nenhuma ovulação durante o inverno, com a atividade aumentando durante a primavera, atingindo o máximo durante o verão e diminuindo progressivamente no outono (GINTHER et al., 2005).

Na espécie equina, a melatonina é influenciada pela transmissão de sinais luminosos para o eixo hipotalâmico-hipofisário, a qual caracteriza-se como um neurotransmissor secretado pela pineal e cuja síntese e liberação são moduladas diretamente pelo fotoperíodo. Assim, durante o inverno, a reduzida intensidade luminosa estimula a produção de melatonina, afetando a liberação de GnRH do hipotálamo, enquanto no início da estação reprodutiva, com aumento da intensidade luminosa, ocorre inibição na secreção de melatonina (GINTHER, 1992).

O padrão regular do ciclo estral se baseia na relação dos hormônios produzidos e liberados pela glândula pineal, hipotálamo, hipófise, ovários e endométrio. Dessa forma, programas de fotoperíodo artificial podem antecipar, se bem manejados, as atividades regulares do ciclo estral nas éguas em até 60 a 90 dias, utilizando programas de iluminação artificial que garantam que todos os animais tratados recebem uma quantidade mínima de luz nos períodos estipulados (LEY, 2006).

Nas éguas, a dinâmica folicular consiste no processo contínuo de crescimento e regressão folicular que ocorre nos ovários, diretamente influenciado por fatores extrínsecos como nutrição, temperatura, estresse e fotoperíodo (GURGEL et al., 2008).

Na espécie equina, o ciclo estral é caracterizado por ondas de crescimento folicular ovariano. Entende-se como onda folicular um conjunto de fenômenos foliculares que obedecem à seguinte sequência: recrutamento, seleção, dominância e ovulação (GINTHER et al., 2005; GURGEL et al., 2008).

Durante o estro, o qual consiste na estação ovulatória da égua, ocorre o processo de seleção folicular, que acontece no fim da fase de crescimento comum em que o folículo dominante cresce em uma taxa contínua, e os

folículos subordinados crescem até o momento da seleção e então regridem. O controle do desvio folicular depende de fatores intrafoliculares, tais como fatores de crescimento, peptídeos, receptores de gonadotrofinas, fatores angiogênicos e esteroides, os quais são secretados de maneira diferenciada nos futuros folículos dominantes e subordinados, determinando efeitos regulatórios autócrinos, parácrinos e endócrinos (GURGEL et al., 2008).

Durante a fase de recrutamento, ocorre o crescimento comum de um grupo de folículos antrais sensíveis ao FSH, seguido pela fase de seleção, na qual um ou alguns folículos mantêm o padrão de crescimento, em detrimento dos demais que começam um processo de regressão ou atresia (GINTHER et al., 2003).

Nas espécies monovulatórias, que é o caso das éguas, normalmente, o folículo que continua a crescer é considerado dominante (fase de dominância); este secreta elevada quantidade de estrógeno e é sensível ao estímulo ovulatório desempenhado pelo padrão de liberação do LH (DRIANCOURT, 2001; GURGEL et al., 2008).

Existem dois padrões típicos para este evento: onda folicular maior, que possui folículos dominantes e normalmente se inicia na metade final do ciclo estral e termina com a subsequente ovulação; onda folicular menor, onde o maior folículo não atinge o diâmetro necessário para promover a divergência entre os futuros folículos subordinados, que se inicia entre o final do ciclo estral e o início do diestro. As ondas que emergem na metade final do ciclo estral e culminam com a ovulação são classificadas como ondas foliculares primárias, e as ondas que surgem entre o final do ciclo e início do diestro, são denominadas secundárias (DINGER; NOILES, 1984; GASTAL et al., 1999; GURGEL et al., 2008; SOUZA et al., 2010).

O pico de FSH é o estimulador de uma onda folicular ovariana, que na espécie equina é responsável pelo recrutamento de folículos com diâmetro de aproximadamente 13 mm. Entre quatro e cinco dias após a concentração plasmática de FSH ter atingido o seu valor máximo, os dois maiores folículos alcançam o diâmetro médio de 19 e 22 mm, iniciando a divergência do diâmetro, caracterizada pela seleção e crescimento contínuo do maior folículo, que será considerado como dominante, e redução ou cessação do crescimento

dos folículos remanescentes, considerados como folículos subordinados (GASTAL et al., 1999; GINTHER et al., 2003).

No início da divergência, a diferença de diâmetro entre os dois maiores folículos é equivalente a um período de crescimento de aproximadamente 24 h, em que se caracteriza como o momento no qual o maior folículo estabelece o processo de dominância, antes que o segundo maior folículo alcance diâmetro similar. Assim, o futuro folículo dominante (FD) exerce papel primário na supressão da concentração circulante de FSH. Após o processo de seleção, o crescimento do FD é menos dependente de FSH, cuja concentração é mantida em níveis basais, devido à produção de E2 e inibina, que fazem a retroalimentação negativa em nível hipofisário (GINTHER et al., 2003; GURGEL et al., 2008).

A manutenção da concentração plasmática mínima de FSH é essencial para o crescimento destas estruturas, e a sua supressão abaixo do nível basal, predispõe o folículo dominante à atresia. Após o processo de seleção, o crescimento e a atividade estrogênica do folículo são controlados pelos pulsos de LH. O folículo selecionado pode, ao superar a dependência de FSH, ficar extremamente sensível à pulsatilidade do LH, ao adquirir receptores para esse hormônio nas células da granulosa, bem como, pela síntese de enzimas esteroidogênicas (GURGEL et al., 2008; MIHM; BLEACH, 2003; RAWLINGS et al., 2003; SOUZA et al., 2010).

O esclarecimento dos mecanismos de desenvolvimento folicular, assim como a seleção do folículo dominante, juntamente com o entendimento do ciclo estral da égua, são fatores necessários para o completo entendimento e a manipulação do ciclo estral.

### *2.3 Mecanismo de ação hormonal*

Devido à grande variação na duração do estro e no intervalo de ovulação das éguas, a indução farmacológica é uma importante ferramenta para o manejo reprodutivo e, conseqüentemente, para aplicação de biotecnologias reprodutivas que são fundamentais para a multiplicação de animais geneticamente superiores (BEREZOWSKI et al., 2004; SOUZA, 2013).

Por meio da manipulação do ciclo estral das éguas, pode-se aumentar o período de ciclicidade durante o ano, a diminuição do ciclo estral, o aumento do número de ovulações/ciclo e, conseqüentemente, de embriões/ciclo, a possibilidade de tornar o ambiente uterino propício ao desenvolvimento embrionário, a indução de parto e abortamento, o auxílio no tratamento de infecções uterinas e a contribuição na utilização de biotécnicas reprodutivas, como a TE (FARIA; GRADELA, 2010).

### 2.3.1 Prostaglandinas (PGs)

A prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) e seus análogos são os hormônios mais utilizados na reprodução equina, apresentando excepcional contribuição quando utilizada sozinha para indução de cio em éguas cíclicas ou quando em apoio ao uso de biotécnicas como a inseminação artificial e a transferência de embriões.

A PGF2 $\alpha$  é considerada o agente luteolítico primário em éguas, pois controla a lise do CL em fêmeas não gestantes, que ocorre após sua liberação pelas células endometriais entre os dias 13 e 16 após a ovulação (MILVAE et al., 1996).

Prostaglandinas podem ser utilizadas para finalizar uma fase luteal persistente ou anestro lactacional, controlar o tempo de ovulação, induzir a secreção de gonadotrofinas, sincronizar o estro, tratar éguas com endometrite, eliminar pseudogestação, estimular a contração uterina, e promover abortamentos antes da formação dos cálices endometriais (MCKINNON; VOSS, 1992).

Embora a prostaglandina F2 $\alpha$  possa ser administrada pelas vias intramuscular (IM), intravenosa (IV), intrauterina (IU) ou intraluteal (IL), a via intramuscular é a preferida, pois alia praticidade a menores efeitos colaterais. Na sincronização e indução de estro, a prostaglandina pode ser aplicada em qualquer fase do ciclo estral em duas doses, com intervalo de 14 dias, ou em dose única, após a detecção de um CL maduro, ou, ainda, associada à administração de P4 (HUGHES et al., 1972).

### 2.3.2 Estrógenos (E2)

Os estrógenos são hormônios esteroides associados aos sinais de estro e produzidos, principalmente, pelos folículos ovarianos e pela unidade feto-placentária, embora pequenas quantidades sejam também produzidas em outras áreas do corpo (FARIA; GRADELA, 2010).

A secreção folicular de estrógenos nas éguas atinge o pico um ou dois dias antes da ovulação, e posteriormente declina até atingir níveis básicos no diestro e, ao contrário do que ocorre em outras espécies, a administração de estrógenos não leva à onda pré-ovulatória de LH nem causa marcada supressão no LH (MCKINNON; VOSS, 1993).

A administração de uma pequena dose de estradiol (0,5 a 1,0 mg) em éguas em anestro profundo é capaz de induzir sinais de estro dentro de 3 a 6 horas, enquanto em éguas com corpo lúteo funcional, sinais de estro não são observados (NEELY, 1983).

Por outro lado, a administração de 17- $\beta$  estradiol (50 mg, IM) ou de cipionato de estradiol (50 mg, IM) no dia seguinte à ovulação em éguas cíclicas suprime o desenvolvimento folicular sem alterar a função luteal, podendo estes serem utilizados em programas de sincronização de estro e ovulação associados à prostaglandina (sem progesterona) com o mesmo grau de sincronização de quando administrados em associação com progestágenos (PINTO; BURNS; WHISNANT, 2004).

### 2.3.3 Progesterona (P4) ou progestágenos

A progesterona é o progestágeno natural secretado pelas células luteínicas do CL, pela placenta e pelas glândulas adrenais. A progesterona é um importante regulador do ciclo estral, uma vez que sua secreção é estimulada primariamente pelo LH, promovendo o encerramento dos sinais de estro, a supressão do crescimento folicular e o controle da ovulação (FARIA; GRADELA, 2010).

No momento da aplicação, a presença de um CL afeta a eficácia do tratamento. Observou-se que em éguas em anestro, houve uma melhor expressão dos sinais de estro, um maior número de éguas ovulando e um

maior intervalo entre a remoção do dispositivo e o estro/ovulação do que em éguas em diestro e estro. Por outro lado, as concentrações médias de progesterona e LH após a aplicação do dispositivo foram maiores em éguas em diestro (HANDLER et al., 2007).

#### 2.3.4 Gonadotrofina coriônica humana (hCG)

Embora a hCG seja uma proteína quimicamente diferente do LH, apresenta atividade biológica primária idêntica e tem sido usada com eficácia na indução da ovulação em éguas, pois reduz a duração do estro e o intervalo até a ovulação (dentro de 48 h), reduzindo o número de inseminações e de coberturas necessárias por estro (BERGEFELT, 2000; KAYISLI et al., 2003; LEY, 2006).

É responsável por sincronizar o estro e a ovulação, aumentando os índices de fertilidade, as concentrações plasmáticas de progesterona e as taxas de prenhez. O aumento da progesterona melhora os tônus uterino e cervical, a morfoecogenicidade uterina e luteal e o diâmetro do CL, características reprodutivas que são desejáveis para a transferência de embriões (FARIA; GRADELA, 2010; FLEURY et al., 2007).

Por se tratar de uma proteína, a administração de hCG estimula a produção de anticorpos anti-hCG, devido à sua meia vida longa que pode variar entre 30 dias e vários meses após duas a quatro injeções do hormônio.

#### 2.3.5 Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH)

O GnRH estabelece a ligação entre o sistema humoral e os sistemas endócrino e nervoso, de modo que, em resposta à estimulação nervosa, pulsos de GnRH são liberados no sistema hipotálamo-hipofisário induzindo a hipófise anterior a liberar LH e FSH (FARIA; GRADELA, 2010).

A síntese e a secreção do GnRH são reguladas por *feedback* através dos esteroides gonadais. Em éguas, a progesterona reduz a frequência pulsátil do GnRH, como observado na fase luteal. Sendo assim, o aumento dos receptores de andrógeno, progesterona e estradiol estão intimamente

associados à redução do hormônio liberador de gonadotrofinas (CLARKE; CUMMINS, 1987).

Pode ser utilizado para iniciar um crescimento folicular ou para indução da secreção de FSH em éguas em anestro ou que não desenvolvem folículo pré-ovulatório durante a estação de monta e como uma alternativa não antigênica ao uso da hCG na indução de ovulação em éguas pré-ovulatórias (FLEURY et al., 2003; MCCUE et al., 2007; MCKINNON; VOSS, 1992).

#### *2.4 Sincronização entre doadoras e receptoras de embriões e sua importância na técnica de TE*

A sincronia entre doadora e receptora é essencial para estabelecer a gestação em programas de TE. Quando não há sincronia, ocorre mortalidade embrionária precoce, especialmente na primeira semana do desenvolvimento da vesícula no endométrio. Além disso, embriões transferidos em receptoras cíclicas 5 ou 6 dias após a ovulação, apresentam taxa superior de prenhez quando comparadas às fêmeas que ovularam há 7 a 9 dias (BARNES, 2000; EVANGELISTA, 2012).

A utilização de várias combinações de esteroides reprodutivos (progestágenos e estrógenos), prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF e análogos), hCG e GnRH e análogos, têm sido usados no controle do desenvolvimento folicular e tempo de ovulação, e aplicada com propósitos básicos durante a transição da primavera, ciclo estral e período pós-parto em éguas (MCKINNON; VOSS, 1992).

Sob a influência da progesterona, há alteração no ambiente uterino, uma vez que um embrião em um útero não sincronizado pode estar sujeito a níveis hormonais e fatores de crescimento não correspondentes à fase na qual ele se encontra. Além disso, uma migração pode impedir o embrião de transmitir o sinal para o reconhecimento materno e, com isso, não suprimir a resposta luteolítica cíclica da égua (EVANGELISTA, 2012; WILSHER; KÖLLING; ALLEN, 2005).

A sincronização entre doadora e receptora é uma técnica realizada de maneira relativamente simples em éguas cíclicas. Geralmente, administra-se uma única injeção IM de PGF2- $\alpha$  ou análogo na égua doadora, um ou dois dias

à frente da mesma terapia, aplicada nas receptoras, quando se sabe que ambas estão entre o sexto e décimo quarto dias do diestro e o exame ultrassonográfico dos ovários revela a ausência de um grande folículo pré-ovulatório, que pode ovular rapidamente (ALLEN, 2000).

Em todos os protocolos de sincronização empregados, monitora-se o crescimento folicular por ultrassonografia e utiliza-se hCG, GnRH ou EPE para induzir ovulação nas éguas receptoras, 48 h depois que a doadora for inseminada. Salienta-se que sucessivas aplicações de hCG induzem a formação de anticorpos, reduzindo a sua eficiência na resposta ovulatória (DUCHAMP et al, 1987).

A janela de sincronização entre doadoras e receptoras consiste naquela em que as receptoras se encontram entre o quarto e oitavo dia de ovulação (relacionado com a ovulação da doadora – D0), com coleta de embrião no sétimo dia; e a receptora pode ovular um no intervalo de dia antes (D+1) até 3 dias depois (D-3) da doadora, sendo considerada apta a receber embriões neste intervalo (VANDERWALL, 2000; SQUIRES, 2003; MCKINNON; SQUIRES, 2007).

Jacob et al. (2002; 2012) afirma que essa janela de sincronização pode ser mais flexível, uma vez que receptoras ovuladas de um dia antes até cinco dias após a doadora podem ser utilizadas sem afetar as taxas de prenhez. Com esse aumento de intervalo, um menor número de receptoras precisaria ser monitorado para atingir sucesso nas taxas de prenhez por TE, trazendo benefícios como menor número de éguas para manejo, menos exames reprodutivos, menos custos com tratamentos hormonais e menor necessidade de mão de obra.

## *2.6 Protocolos hormonais para éguas receptoras de embriões*

Hinrichs et al. (1985; 1986) foram pioneiros na aplicação de P4 ou altrenogest (progestágeno) para preparar éguas receptoras ovariectomizadas. Segundo os autores, administrou-se 300 mg diários de P4 por cinco dias antes da TE, o qual resultou em 75% de taxa de gestação. Estes estudos indicam que éguas ovariectomizadas tratadas com altrenogest ou P4 são capazes de manter a prenhez após a transferência do embrião.

Posteriormente, Hinrichs et al. (1986) obtiveram 16% (1/6), 33% (2/6) e 40% (2/5) de prenhez comparando-se dois protocolos utilizando o altrenogest oral (22 mg diários por cinco dias ou 66 mg diários por seis dias antes da TE) com o protocolo utilizando 300 mg diários de P4. Os autores supracitados concluíram que o altrenogest oral foi capaz de estabelecer a gestação após a TE, apesar da insuficiência na dose de 22 mg para a obtenção de taxas de prenhez adequadas.

Hinrichs e Kenney (1987) também avaliaram a necessidade de realizar a sincronia entre a administração de P4 na receptora e ovulação da doadora; observou-se que em receptoras cujo tratamento hormonal foi iniciado dois dias após a ovulação da doadora, as taxas de gestação foram superiores em relação às das éguas em que o início do tratamento hormonal ocorreu pelo menos quatro dias antes da ovulação da doadora, demonstrando assim a necessidade de sincronia.

Entende-se que o estrógeno estimula o aumento dos receptores uterinos de P4 e que o embrião equino secreta estradiol na fase inicial da gestação (ZAVY et al., 1979). Dessa forma, McKinnon et al. (1988) utilizaram estradiol previamente e em conjunto à administração de progesterona ou altrenogest em três diferentes protocolos, como descritos a seguir: no primeiro protocolo, foram administrados de três a cinco dias de 17 $\beta$ -estradiol (E2) 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 foi continuada após a administração da P4. O terceiro tratamento também foi similar ao primeiro, com exceção da substituição da P4 por 0,044mg/kg de altrenogest diários (MCKINNON et al., 1988).

Nesse procedimento, os autores obtiveram 70% e 80% de taxa de gestação respectivamente entre os protocolos testados, sugerindo que, independente da administração do E2, o requisito primário para o preparo e a manutenção da gestação é a concentração adequada de progesterona ou progestágenos (MCKINNON et al., 1988).

A partir da década de 90, as receptoras intactas acíclicas (anestro ou transição) foram introduzidas nos programas de TE. O uso desta categoria de receptoras dispensa a realização de cirurgia, tornando-se uma opção vantajosa. Assim, entende-se que éguas ovariectomizadas e também em

anestro podem ser utilizadas com sucesso como receptoras de embriões (LAGNEAUX; PALMER, 1993; SOUZA, 2013). McKinnon et al. (2000) avaliaram diferentes progestágenos disponíveis comercialmente com o objetivo de avaliar a eficácia destes em manter a gestação em éguas após induzir a luteólise do corpo lúteo aos 18 dias de prenhez. Diversos hormônios, como a medroxiprogesterona, hidroxiprogesterona, altrenogest, norgestomet e megesterol foram testados, e apenas o altrenogest foi eficiente em manter a gestação.

Além disso, uma preparação de progesterona de longa ação (P4 LA) foi avaliada por Bringel et al. (2003) em éguas sem o corpo lúteo primário, onde concentrações de P4 compatíveis com a fase luteal foram encontradas após a administração de 1500 mg a cada sete dias.

Rocha-Filho et al. (2004) realizaram um estudo comparativo entre as taxas de gestação em receptoras cíclicas (grupo controle) e acíclicas suplementadas com dois protocolos diferentes (P4 de longa ação e P4 de curta ação). Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa, sugerindo que ambos os tipos de P4 são eficazes para a preparação de receptoras acíclicas. Também não foi observada grande diferença na taxa de gestação entre as éguas cíclicas (75,0%) e éguas acíclicas de ambos os grupos tratadas com P4 (75,9%), demonstrando sucesso no protocolo utilizado e corroborando os achados de Bringel et al (2003), que relataram a concentração circulante de P4 compatível com os níveis da fase lútea (3,41 a 4,33 ng/mL), após a aplicação de 1500mg de P4 de longa ação (LA) a cada 7 dias em éguas com nenhuma fonte endógena de P4.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, W. R. The physiology of early pregnancy in the mare. In: *Proceedings...*, American Association of Equine Practitioners. p. 338-354. 2000.
- ANDRADE, L.S. O ciclo estral da égua e o seu controle endócrino. In: *Fisiologia e manejo da reprodução equina*. 2 ed, Recife, 1986.
- BARNES, F. L. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology*, v. 53, n. 2, p. 649-658, 2000.
- BEREZOWSKI, C.J.; STITCH, K.L.; WENDT, K.M. et al. Clinical comparison of 3 products available to hasten ovulation in cyclic mares. *J. Equine Vet. Sci.*, v.24, p.231-233, 2004.
- BERGEFELT, D. R. Estrous synchronization. mare. In: SAMPER, J. C.; PYCOCK, J.; MCKINNON, O. *Equine breeding management and artificial insemination*. Philadelphia: Saunders, 2000. p.195-228
- BORTOT, D.; ZAPPA, V. Aspectos Da Reprodução Equina: Inseminação Artificial E Transferência De Embrião: Revisão De Literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 21, n. 1, p. 1-23, 2013.
- BRINGEL, B. A.; JACON, J. C. F.; ZIMMERMAN, M.; ALVARENGA, M. A.; DOUGLAS, R. H. 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, p. 498-500, 2003.
- CLARKE, I. J.; CUMMINS, J. T. The significance of small pulses of gonadotrophin-releasing hormone. *Journal of endocrinology*, v. 113, n. 3, p. 413-418, 1987.
- DIELEMAN, S.J.; BEVERES, M.M.; VANTOL, H.T.M.; WILLEENSE, A.H. Peripheral plasma concentration of estradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the estrous cycles in the cow, with emphasis on the oestrous period. *Animal reproduction science*, Amsterdam, v. 10, p. 275 – 292, 1986.
- DINGER, J. E.; NOILES, E. E. Ovarian activity in synchronized mares following administration of follicle stimulating hormone. *Animal Reproduction Science*, v. 7, n. 6, p. 511-516, 1984.
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v.55, p.1211-1239, 2001.
- DUCHAMP, G.; BOUR, B.; COMBARNOUS, Y.; PALMER, E. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.35, p.221-228, 1987.

EVANGELISTA, R. M. *A transferência de embriões em equinos e a importância da égua receptora*. Trabalho de conclusão do curso – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Curso de Medicina Veterinária. 2012.

FARIA, D. R.; GRADELA, A. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 2, p. 114-122, 2010.

FLEURY, J. J.; FLEURY, P. D. C.; SOUSA, F. A.; GILLEY, R. Preliminary evaluation of a BioRelease delivery system for the controlled release of deslorelin for advancing ovulation in the mare: effects of dose. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.501-502, 2003

FLEURY, P. D. C.; ALONSO, M. A.; SOUSA, F. A. C.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R.P. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões equinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, p.27-31, 2007.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. *Biology of Reproduction*, v. 61, n. 1, p. 31-39, 1999.

GINTHER, O. J. *Reproductive Biology of the Mare: basics and applied aspects*. 2ª ed. Michigan, U.S.A: Equiservices Publishing, 1992.

GINTHER, O. J.; WOODS, B. G.; MEIRA, C.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R. Hormonal mechanism of follicle deviation as indicated by major versus minor follicular waves during the transition into the anovulatory season in mares. *Reproduction*, v.126, p.653-660, 2003.

GINTHER, O.J; GASTAL, E. L.; GASTAL, M.O.; BEG, M. A. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. *Biology of Reproduction*, v.73, p.315-323, 2005.

GURGEL, J. R. C.; VIANA, C. H. C; PEREZ, E. G.A; NICHI, M. Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafolliculares. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, n. 2, p. 122-132, 2008.

HANDLER, S.; SCHONLIEB, H.; HOPPEN, O.; AURICH, C. Influence of reproductive stage at PRID™ insertion on synchronization of estrus and ovulation in mares. *Animal Reproduction Science*, v.97, p.382-393, 2007.

HINRICHS, K.; SERTICH, P.L.; CUMMINGS, M.R.; KENNEY, M.R. Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer. *Equine Veterinary Journal, Supplement 3*, p. 74-75, 1985.

- HINRICHS, K.; SERTICH, P.L.; KENNEY, R.M. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. *Theriogenology*, v. 26, n.4, p.455-460, 1986
- HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. In: *Proceedings...*, American Association of Equine Practitioners. 1972. p. 119-152.
- IRVINE, C. H. G. Prostaglandins. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, L. (Ed.) *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, p.319-324.1993.
- JACOB, J. C. F.; DOMINGUES, I. B.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; SILVA, A. G.; MELLO, C. M.; GASPARETTO, F. The impact of degree of synchrony between donors and recipients in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 545, 2002.
- JACOB, J. C. F.; HAAG, K. T.; SANTOS, G. O.; OLIVEIRA, J. P.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology*, v. 77, n. 6, p. 1159-1166, 2012.
- KAYISLI, U.; SELAM, B.; GUZELOGLU-KAYISLI, O.; DEMIR, R.; ARICI, A. Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. *The Journal of Immunology*, v.171, p.2305-2313, 2003.
- LAGNEAUX, D.; PALMER, E. Embryo transfer in anoestrous recipient mares: attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. *Equine Veterinary Journal*, v. 25, n. S15, p. 107-110, 1993.
- LEY, W. B. *Reprodução em éguas para veterinários de equinos*. São Paulo: Roca, 2006. 215p.
- MCCUE, P. M.; MAGEE, C.; GEE, E. K. Comparison of compounded Deslorelin and hCG or induction of ovulation in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.27, p.58-61, 2007.
- MCCUE, P.; HUDSON, J. J.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L. Efficacy of hCG at inducing ovulation: anew look at an old issue. In: *Proceedings...*, Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 50, Denver, O. Denver, CO: AAEP, p.1492-1507, 2004.
- MCKINNON A. O.; CARNEVALE, E.M. Ultrasonography. In: MCKINNON, Angus O.; VOSS, James L. *Equine reproduction*. Philadelphia, London,, USA: Lea & Febiger, 1993.
- MCKINNON, A. O., LESCUN, T. B., WALKER, J. H., VASEY, J. R., ALLEN, W. R. The inability of some synthetic progestagens to maintain pregnancy in the mare. *Equine veterinary journal*, v.32, n. 1, p. 83-85, 2000.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; HERMENET, M. J. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. *Theriogenology*, v. 29, n. 5, p. 1055-1063, 1988.

MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine reproduction*. Philadelphia, London,, USA: Lea & Febiger, 1993.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Embryo Transfer and Related Technologies. In: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A. O. (Ed.). *Current therapy in equine reproduction*. Philadelphia: W.B. Saunders, cap.51, p. 319-334. 2007.

MIHM, M.; BLEACH, E. C. L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Animal reproduction science*, v. 78, n. 3, p. 217-237, 2003.

MILVAE, R. A.; HINCKLEY, S. T.; CARLSON, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, v.45, p.1327-1349, 1996.

NEELY, D. P.; KINDAHL, H.; STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. E.; HUGHES, J. P. Prostaglandin release patterns in the mares. Physiological, pathophysiological and therapeutic responses. *Journal of Reproduction and Fertility*, p. 181-189, 1979.

PINTO, C. R.; BURNS, P. J.; WHISNANT, S. Effects of single estradiol administration on follicular dynamics and luteal function of cyclic mares. In: *Proceedings...*, International Symposium on Equine Embryo Transfer, 6, 2004, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: ISEET,2004. p.92-94.

RAWLINGS, N. C.; EVANS, A. C. O.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKI, P. M. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Animal reproduction science*, v. 78, n. 3, p. 259-270, 2003.

ROCHA-FILHO, N. A.; PESSOA, M. A.; GIOSO, M. M.; ALVARENGA, M. A. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. *Animal Reproduction*, v. 1, n.1, p 91-95, 2004

ROMANO, M. A.; MUCCIOLO, R. G.; SILVA, A. E. D. F. Reproductive biology of the mare: oestrous cycle and ovulation time. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 35, n. 1, p. 00-00, 1998.

SOUZA, F. A.; CANISSO, I. F.; D'OLIVEIRA-SOUSA, A.; DO CARMO PATRÍCIO, F. A.; GOMES, M. G. T.; PINTO, P. F. B. Dinâmica folicular ovariana na égua. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 13, n. 1, 2, 3, p. 17-23. 2010.

SOUZA, R. T. R. *Sincronização de receptoras no diestro para utilização em programa de Transferência de Embriões em equinos*.

24F.Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista. 2013.

SQUIRES, E. L. Management of the embryo donor and recipient mare. In: SQUIRES, E. L., CARNEVALE, E. M., MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, v. 59, n. 1, p. 151-170, 2003.

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

WILSHER S.; KÖLLING, M.; ALLEN, W. R. The use of meclofenamic acid to extend donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. In: ALM, H.;

ZAVY, M. T., BAZER, F. W., SHARP, D. C., WILCOX, C. J. Uterine luminal proteins in the cycling mare. *Biology of reproduction*, v.20, n. 4, p. 689-698, 1979.

ZUCCARI, C. E. S. N.; DE PAULA, F. A. L.; FERREIRA, C. S.; NUNES, D. B.; COSTA E SILVA, E. V. Comportamento a rufiação de éguas mestiças submetidas a diferentes protocolos de sincronização de cio. *Revista de Etologia*, v.8, p.45-50, 2006.

### 3 OBJETIVO GERAL

Sincronizar éguas receptoras de embriões, independente das fases do ciclo estral e da atividade ovariana, através de protocolos hormonais.

#### 3.1 *Objetivos específicos*

Determinar a eficácia e comparar as taxas de prenhez com a realização da TE em receptoras em tempo fixo, independentemente das variáveis ovarianas existentes.

1 TRABALHO CIENTÍFICO

2

3 Artigo enviado a revista Theriogenology de acordo com as normas da revista.

4

5 Título Protocolo para sincronização do ambiente uterino de receptoras acíclicas  
6 e cíclicas em programas de transferência de embriões equinos

7

8 Artigo enviado a revista Theriogenology de acordo com as normas da revista.

9

10 Título: Protocolo para sincronização do ambiente uterino de receptoras  
11 acíclicas e cíclicas em programas de transferência de embriões equinos

12

13 Ivan Verdussen de Oliveira Neto

14 São Paulo State University Julio de Mesquita filho – UNESP, Botucatu –

15 Department of Reproduction and Veterinary Radiology.

16 Prof. Dr. Walter Mauricio Correa s/n - Caixa Postal 560, Unesp Campus de

17 Botucatu

18 18618-681 - Botucatu, SP

19 e-mail: [ivanverdussen@hotmail.com](mailto:ivanverdussen@hotmail.com)

20

21 José Antonio Dell'Aqua Jr

22 São Paulo State University Julio de Mesquita filho – UNESP, Botucatu –

23 Department of Reproduction and Veterinary Radiology.

24 Prof. Dr. Walter Mauricio Correa s/n - Caixa Postal 560, Unesp Campus de

25 Botucatu

26 18618-681 – Botucatu, SP

27

## 1 RESUMO

2 O objetivo do presente trabalho foi sincronizar o ambiente uterino de éguas  
3 receptoras de embriões, independentes da fase do ciclo estral e da atividade  
4 ovariana, com o ciclo da doadora, maximizando a utilização das receptoras no  
5 programa de transferência de embriões (TE). Foram utilizadas 160 éguas, que  
6 foram separadas em grupos de 20 animais conforme a fase do ciclo estral:  
7 éguas acíclicas em anestro e transição, cíclicas em estro com folículos < 35  
8 mm, em estro com folículos ≥ 35 mm, em diestro com CL < 5 dias e em diestro  
9 com CL ≥ 5 dias. Inicialmente, todos os animais receberam uma aplicação de  
10 10mg de dinoprosttrometamina e 4 aplicações de 17β estradiol por 4 dias  
11 consecutivos seguido por uma aplicação de 300 mg de altrenogest.  
12 Posteriormente, o protocolo foi modificado e foi adicionada mais uma dose de  
13 10mg de dinoprosttrometamina no segundo dia do tratamento. Os embriões  
14 foram transferidos de três a oito dias após a aplicação do altrenogest. O  
15 diagnóstico de gestação foi efetuado 5 a 7 dias após a TE. Com apenas uma  
16 aplicação de prostaglandina no primeiro dia de tratamento todos os animais  
17 apresentaram edema uterino acentuado e taxas de prenhez superior a 70%,  
18 entretanto as receptoras que ao início do tratamento apresentavam a presença  
19 de CL < 5 dias mostraram um edema uterino significativamente menor que os  
20 demais grupos e índices de gestação de 40%, inferiores aos observados nos  
21 demais grupos. Entretanto, quando este grupo foi submetido a duas aplicações  
22 de prostaglandina nos dois primeiros dias do tratamento as taxas de gestação  
23 aumentaram para 70%. Baseado nos dados obtidos pode-se concluir que boas  
24 taxas de prenhez de receptoras de embrião estão relacionadas a uma eficiente  
25 sensibilização uterina ao estrógeno que contribui para a posterior ação  
26 progesteronica fundamental para obtenção da sincronização do ambiente  
27 uterino.

28 **Palavras-chave:** Transferência de Embrião, receptoras cíclicas e acíclicas,  
29 protocolos TE, equinos.

30

## 1 1 INTRODUÇÃO

2 A transferência de embriões (TE) tem se tornado uma ferramenta  
3 relevante para muitos programas de melhoramento genético, contribuindo para  
4 maximizar a produção de potros por égua, que sejam de alto valor genético,  
5 apresentem alguma disfunção reprodutiva ou mesmo que estejam participando  
6 de eventos e competições.

7 Um dos fatores que mais honeram os programas de TE é a manutenção  
8 das receptoras, haja vista que seu número em relação as Doadoras é  
9 significativamente maior. Nesse sentido, muitas vezes os gastos com essa  
10 categoria pode contribuir de forma substancial para o gerenciamento financeiro  
11 das centrais de TE.

12 A sincronização da ovulação entre doadora e receptora é essencial para o  
13 sucesso da TE. Normalmente, duas ou três receptoras são reservadas para  
14 cada doadora, exigindo dois a quatro dias de diferença da ovulação entre elas.  
15 Outra opção é o uso de hormônios em receptoras que se encontram nas fases  
16 de anestro e transição [1].

17 Entretanto, poucos estudos são dirigidos para a sincronização de éguas  
18 independente de seu status reprodutivo, principalmente em relação a  
19 receptoras cíclicas. Dessa forma, gerando a possibilidade de utilizar qualquer  
20 animal a receber embrião, mesmo que seu momento do ciclo estral esteja  
21 desfavorável para tal sincronização com o ciclo da doadora.

22 Um protocolo que permitisse a sincronização do ambiente uterino de  
23 éguas receptoras cíclicas independentes de sua fase do ciclo estral  
24 possibilitaria que qualquer receptora do plantel se tornasse apta a receber o  
25 embrião. Desse modo, excluir a necessidade do acompanhamento folicular  
26 diário e otimizar a sincronização doadora/receptora, facilitando o manejo das  
27 centrais de TE.

28 Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um protocolo  
29 hormonal para sincronizar o ambiente uterino de qualquer receptora de  
30 embrião cíclicas e acíclicas com o da doadora.

31

## 1 2 MATERIAL E MÉTODOS

2

### 3 2.1 Animais

4

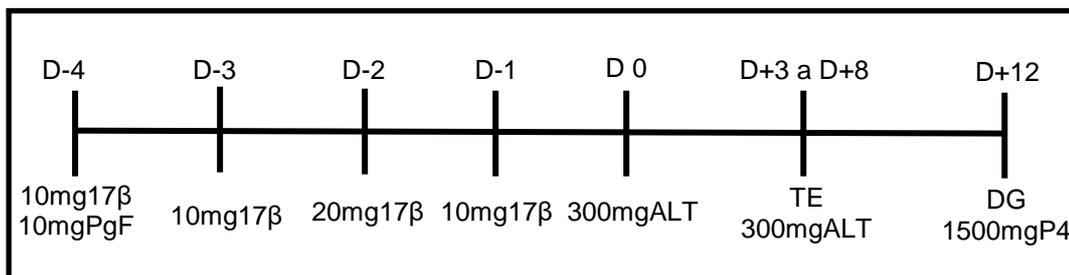
5 Foram utilizadas 160 éguas receptoras de embriões, sem raça definida,  
6 com idade entre 5 e 15 anos. Todas foram avaliadas inicialmente pela  
7 palpação retal para constatar a integridade do sistema reprodutivo. Os animais  
8 foram mantidos em pasto de tifton 85, com água e sal *ad libitum* específico  
9 para equinos. O estudo foi aprovado pela comissão de ética UNESP, Botucatu,  
10 sob protocolo nº 130/2014-CEUA.

11

### 12 2.2 Delineamento experimental

13

14 Todas as receptoras foram submetidas a um mesmo protocolo para  
15 sincronização do ambiente uterino. O início do protocolo foi estabelecido em  
16 relação ao dia da ovulação da doadora (D-4), conforme esquema abaixo:



PgF = Prostaglandina 2α (Lutalyse - Pfizer®)  
17β = 17 Beta Estradiol (17 Beta - Botupharma®)  
ALT= Altrenogest (Altrenogest - Botupharma®)  
P4 = Progesterona (P4 – 300 - Botupharma®)

17

18 Para identificação do efeito do protocolo nas alterações uterinas e  
19 ovarianas nos diferentes momentos do ciclo estral, asreceptoras foram  
20 divididas em grupos em relação ao período reprodutivo em que se  
21 encontravam acíclicas ou cíclicas e em relação a fase do ciclo estral estro ou  
22 diestro conforme descrição a seguir:

23 G1 = Receptoras ovuladas sem intervenção hormonal (n=20); G2 = Receptoras  
24 acíclicas em anestro (n=20); G3 = Receptoras acíclicas em transição (n=20);  
25 G4 = Receptoras cíclicas em estro folículos <35mm (n=20); G5 = Receptoras  
26 cíclicas em estrofolículos ≥ 35mm (n=20); G6 = Receptoras cíclicas em início

1 diestro CL < 5 dias (n=20); G7 = Receptoras cíclicas em diestro CL ≥ 5 dias  
2 (n=20).

3

#### 4 *2.3 Manejo da Doadora e obtenção dos embriões*

5

6 As éguas doadoras de embriões foram avaliadas por palpação retal e  
7 ultrassonografia. Após a identificação do estro e identificação de um folículo de  
8 35 mm, a ovulação foi induzida com 250 µg de acetato de histrelina (Strelin® -  
9 Botupharma) A inseminação artificial foi realizada 24h após a indução de  
10 ovulação com 1 x 10<sup>9</sup> de espermatozoides viáveis. Oito dias após a ovulação  
11 foi realizada a lavagem uterina para obtenção do embrião, apenas embriões  
12 classificados como ótimos ou bons foram utilizados para as TE.

13

#### 14 *2.4 Transferência dos embriões*

15

16 Antes de cada TE as receptoras foram palpadas e submetidas a  
17 avaliação ultrassonografia do status uterino. Foram efetuadas análise da  
18 consistência (UT) e da imagem ultrassonográfica (US) conforme descrição dos  
19 Itens 2.6.1. e 2.6.2. respectivamente. Todas as transfêrencias foram efetuadas  
20 pelo método transcervical com o auxílio de um inovulador. Os embriões foram  
21 depositados no corpo uterino realizados por um único técnico.

22

#### 23 *2.5 Avaliações uterinas*

24

25 Todas as receptoras foram controladas diariamente através de palpação  
26 e ultrassonografia transretal para indentificação da fase estral ou momento do  
27 ciclo estral em que se encontravam

28

#### 29 *2.6 Acompanhamento da gestação*

30

31 A cada 7 dias foi realizado o acompanhamento da gestação ou possivel  
32 perda embrionária. Nos animais que permaneceram prenhes era efetuado uma  
33 reaplicação de 1500 mg de Progesterona natural (IM) até os 120 dias de  
34 gestação.

35

1

2 *2.6.1. Palpação retal*

3

4 Através da palpação retal foi determinada a tensão uterina numa escala  
5 de 0 – 3, onde 0 é a menor tensão e 3 o máximo de tensão.

6

7 *2.6.2. Ultrassonografia*

8

9 Para o exame ultrassonografico foi utilizado um ultrassom WellD em  
10 frequência de 5 MHz.

11 Ambos os ovários eram avaliados quanto a presença de estruturas  
12 (folículos e/ou corpo lúteos) e suas respectivas dimensões.

13 As características uterinas também eram analisadas em relação a sua  
14 ecotextura e presença de edema uterino. O edema uterino foi classificado em  
15 uma escala de 0 a 3, no qual 0 foi considerado ausência de edema e 3 edema  
16 bem evidente na região da bifurcação dos cornos uterinos. E o aspecto da  
17 textura uterina por um escore de 0 a 3, sendo 0 considerado consistência  
18 flácida e 3 consistência máxima de tensão. Em relação à ECO uterina, sendo 0  
19 textura heterogênea com presença de linhas de aspectos anecóicas e 3 textura  
20 homogênea de aspecto uniforme isoecogênico.

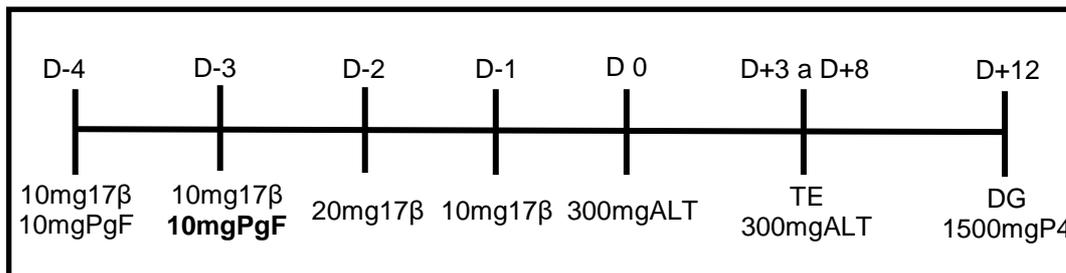
21 O diagnóstico de gestação foi efetuado 5 a 7 dias após a TE por US.

22

23 *2.7. Modificação do protocolo proposto*

24

1 Devido ao grupo de receptoras em início de diestro apresentarem taxas  
2 de prenhes distintas dos demais grupos estudados, optou-se pela adição ao



PgF = Prostaglandina 2α (Lutalyse - Pfizer®)  
17β = 17 Beta Estradiol (17 Beta - Botupharma®)  
ALT= Altrenogest (Altrenogest - Botupharma®)  
P4 = Progesterona (P4 – 300 - Botupharma®)

3 protocolo de uma segunda dose de 10mg de Dinoprost trometamina (IM) no D-  
4 3, nessa fase do ciclo estral. Foram utilizadas mais 20 receptoras em início de  
5 diestro CL < 5 dias. Conforme esquema abaixo

6

## 7 2.8 Análise Estatística

8

9 Para realização das análises estatísticas foi utilizado o pacote  
10 estatístico do SAS 9.1.3. O grau do edema uterino, tônus e classificação  
11 ultrassonográfica no momento da T.E.,foi efetuado a análise de variância  
12 (ANOVA) seguida pelo Tukey quando necessário. Já ataxa de prenhez e índice  
13 de perda embrionária foi utilizado o teste de regressão linear. Todas as  
14 estatísticas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

15

## 16 3 RESULTADOS

17

18 Os dados de escore de edema uterino nos momentos (D-4 a D-1) do  
19 início do protocolo e das características do tônus e ultrassonografia da  
20 condição uterina no dia da transferência do embrião estão descritos na Tabela  
21 1 (pág 31). Houve uma similaridade nos valores de edema uterino após as  
22 aplicações do 17β estradiol na maioria dos grupos estudados. Entretanto, o  
23 grau de edema uterino observados nos animais com CL com menos do que  
24 cinco dias foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) aos demais grupos em  
25 todos os momentos avaliados. O escore da imagem ultrassonográfica dos  
26 animais no momento da TE, apresentam valores inferiores ( $p < 0,05$ ) aos  
27 observados nos animais do grupo controle, entretanto o tônus uterino variou

1 entre os grupos estudados sendo encontrada menor tensão ( $p < 0,05$ ) uterina  
 2 nos animais acíclicos e com folículos menores que 35 mm no início do  
 3 protocolo Os demais grupos não diferiram do grupo controle.

4 TABELA 1 – Valores médios  $\pm$  desvio padrão do edema uterino nos dias antes  
 5 da aplicação do altrenogest e escore uterino no dia da transferência de  
 6 embrião nos diferentes grupos estudados, das éguas submetidas ao protocolo  
 7 com apenas uma aplicação de prostaglandina do D-4.

Fase do ciclo	Grau edema uterino				Escore uterino TE	
	D-4	D-3	D-2	D-1	UT	US
Controle (dias antes da ovulação)	1,8 $\pm$ 1,4 <sup>Bb</sup>	2,8 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	2,7 $\pm$ 0,3 <sup>Aa</sup>	1,6 $\pm$ 1,2 <sup>ABb</sup>	2,8 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>	2,6 $\pm$ 0,3 <sup>A</sup>
Anestro	0,2 $\pm$ 0,2 <sup>Cb</sup>	3 $\pm$ 0,0 <sup>Aa</sup>	3 $\pm$ 0,0 <sup>Aa</sup>	3 $\pm$ 0,0 <sup>Aa</sup>	2,1 $\pm$ 0,3 <sup>B</sup>	1,9 $\pm$ 0,7 <sup>B</sup>
Transição	1,8 $\pm$ 0,7 <sup>Bb</sup>	3 $\pm$ 0,0 <sup>Aa</sup>	3 $\pm$ 0,0 <sup>Aa</sup>	3 $\pm$ 0,0 <sup>Aa</sup>	2,2 $\pm$ 0,2 <sup>B</sup>	2,1 $\pm$ 0,2 <sup>B</sup>
Estro Fol < 35 mm	2,1 $\pm$ 0,6 <sup>ABb</sup>	3 $\pm$ 0,0 <sup>Aa</sup>	3 $\pm$ 0,0 <sup>Aa</sup>	3 $\pm$ 0,0 <sup>Aa</sup>	2,0 $\pm$ 0,4 <sup>B</sup>	2,0 $\pm$ 0,6 <sup>B</sup>
Estro Fol $\geq$ 35mm	2,7 $\pm$ 0,1 <sup>Ab</sup>	3 $\pm$ 0,0 <sup>Aa</sup>	3 $\pm$ 0,0 <sup>Aa</sup>	3 $\pm$ 0,0 <sup>Aa</sup>	2,4 $\pm$ 0,2 <sup>AB</sup>	1,8 $\pm$ 0,5 <sup>B</sup>
Diestro CL <5 dias	0,7 $\pm$ 0,4 <sup>Cb</sup>	1,1 $\pm$ 0,3 <sup>Ba</sup>	1,1 $\pm$ 0,4 <sup>Ba</sup>	1,2 $\pm$ 0,6 <sup>Ba</sup>	2,6 $\pm$ 0,2 <sup>AB</sup>	2,2 $\pm$ 0,2 <sup>B</sup>
Diestro CL $\geq$ 5 dias	0,3 $\pm$ 0,2 <sup>Cb</sup>	2,5 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	2,7 $\pm$ 0,1 <sup>Aa</sup>	2,6 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	2,5 $\pm$ 0,3 <sup>AB</sup>	2,0 $\pm$ 0,4 <sup>B</sup>

8 <sup>abc</sup>Letras minúsculas na mesma linha diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

9 <sup>AB</sup>Letras maiúsculas na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

10 Grau edema uterino = escore (0-3), UT = Consistência uterina escore (0-3), US = Imagem ultrassonográfica uterina  
 11 escore (0-3).

12

13 Todos os grupos, com exceção das éguas em diestro com CL <5 dias,  
 14 onde as taxas foram inferiores e não apresentaram diferença estatística  
 15 ( $p < 0,05$ ) nos índices de prenhez aos 60 e 120 dias. O mesmo foi observado  
 16 nesse grupo em relação a taxa de perda embrionária (Tabela 2, pág 32).

17

1 TABELA 2 – Taxa de prenhez e perda embrionária nos diferentes grupos  
 2 estudados, das éguas submetidas ao protocolo com apenas uma aplicação de  
 3 prostaglandina do D-4.

Fase do ciclo	N	Prenhez até 60 d		Perda Embrionária (60 – 120 dias)		Prenhez 120 d	
			%		%		%
Controle	20	15 <sup>A</sup>	75 <sup>A</sup>	1 <sup>A</sup>	7 <sup>A</sup>	14 <sup>A</sup>	70 <sup>A</sup>
Anestro	20	18 <sup>A</sup>	90 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	18 <sup>A</sup>	90 <sup>A</sup>
Transição	20	18 <sup>A</sup>	90 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	18 <sup>A</sup>	90 <sup>A</sup>
Estro Fol < 35 mm	20	16 <sup>A</sup>	75 <sup>A</sup>	2 <sup>A</sup>	13 <sup>AB</sup>	14 <sup>A</sup>	70 <sup>A</sup>
Estro Fol ≥35mm	20	15 <sup>A</sup>	70 <sup>A</sup>	1 <sup>A</sup>	7 <sup>A</sup>	14 <sup>A</sup>	70 <sup>A</sup>
Diestro CL < 5 dias	20	8 <sup>B</sup>	40 <sup>B</sup>	2 <sup>A</sup>	25 <sup>B</sup>	6 <sup>B</sup>	30 <sup>B</sup>
Diestro CL ≥ 5 dias	20	13 <sup>AB</sup>	65 <sup>AB</sup>	1 <sup>A</sup>	8 <sup>A</sup>	12 <sup>A</sup>	60 <sup>A</sup>

4 <sup>AB</sup>Letras maiúsculas na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

5

6 Com a utilização de duas aplicações de prostaglandina no início do  
 7 tratamento em animais com presença de CL no ovário de até 5 dias de  
 8 formação, verificou-se que o edema e as características uterinas apresentaram  
 9 valores significativamente distintos em relação ao grupo controle. Entretanto,  
 10 as taxas de prenhez e perda embrionária foram diferentes p>0,05. Dados  
 11 apresentados nas Tabelas 3 e 4.

12

1 TABELA 3 – Valores médios  $\pm$  desvio padrão do edema uterino nos dias antes  
 2 da aplicação do altrenogest e escore uterino no dia da transferência de  
 3 embrião nos grupos controle e receptoras com CL < 5 dias, submetidas ao  
 4 protocolo com duas aplicações de prostaglandina no D-4 e D-3.

Fase do ciclo	Grau edema uterino				Escore uterino TE	
	D-4	D-3	D-2	D-1	UT	US
Controle (dias antes da ovulação)	1,8 $\pm$ 1,4 <sup>Bb</sup>	2,8 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	2,7 $\pm$ 0,3 <sup>Aa</sup>	1,6 $\pm$ 1,2 <sup>ABb</sup>	2,8 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>	2,6 $\pm$ 0,3 <sup>A</sup>
Diestro CL < 5 dias	0,6 $\pm$ 0,4 <sup>Ac</sup>	1,1 $\pm$ 0,2 <sup>Bb</sup>	1,8 $\pm$ 0,6 <sup>Bab</sup>	2,4 $\pm$ 0,6 <sup>Ba</sup>	2,5 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>	2,3 $\pm$ 0,2 <sup>B</sup>

5 <sup>abc</sup>Letras minúsculas na mesma linha diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

6 <sup>AB</sup>Letras maiúsculas na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

7 Grau edema uterino = escore (0-3), UT = Consistência uterina escore (0-3), US = Imagem ultrassonografia uterina  
 8 escore (0-3).

9

10

11 TABELA 4 – Taxa de prenhez e perda embrionária no grupo controle e  
 12 receptoras com CL < 5 dias, submetidas ao protocolo com duas aplicações de  
 13 prostaglandina no D-4 e D-3.

Fase do ciclo	N	Prenhez até 60 d	%	Perda Embrionária	%	Prenhez 120 d	%
Controle	20	15	75	1	7	14	70
Diestro CL <5 dias	20	15	75	1	7	14	70

14  $p>0,05$

15

#### 16 4 DISCUSSÃO

17

18 Os achados desse trabalho demonstram a importância da fase  
 19 estrogênica marcante para a obtenção de boas taxas de prenhez. Nesse  
 20 sentido, ressalta-se que a presença de edema uterino acentuado e prolongado  
 21 foi fundamental para uma adequada preparação uterina para a posterior fase  
 22 progesterônica. Assim, foi observado taxa de prenhez satisfatória somente nos  
 23 animais que apresentaram edema uterino característico com o de um estro  
 24 fisiológico. Em contrapartida, receptoras com pouco edema uterino obtiveram

1 menores taxas de prenhez. Desta maneira o presente estudo com o intuito da  
2 mimetização de éguas fisiologicamente cíclicas foi capaz de simular o  
3 crescimento dos níveis séricos de estrógeno seguido de um posterior  
4 decréscimo.

5 A diminuição dos níveis de estrógeno no final do crescimento do folículo  
6 pré-ovulatório, dois dias antes da ovulação deve-se a um efeito negativo  
7 recíproco de LH na produção folicular de estradiol, sendo assim a liberação de  
8 LH responsável a ovulação é desencadeada com a queda do estrógeno [2]. No  
9 presente estudo alguns animais do grupo de éguas cíclicas com folículos  
10 maiores ou iguais a 35 mm não ovularam e em alguns casos esses folículos  
11 começaram a regredir, causado pelo constante aumento do estrógeno. Isso  
12 provavelmente ocorreu nos animais que ainda não tinham liberado o LH  
13 responsável pela ovulação. Entretanto, esse fato não impediu a gestação, com  
14 taxas de prenhez similares aos do grupo controle.

15 Segundo Silva, et al 2015, aplicações mais altas de benzoato de  
16 estradiol (BE) diminuíram a concentração de progesterona circulante após 24  
17 horas da aplicação da P4 LA [3], esses resultados sugerem com obtidos no  
18 presente estudo, já que as taxas de prenhez foram maiores quando um edema  
19 uterino marcante estava presente. Assim sendo, acreditamos que os animais  
20 que apresentavam maiores concentrações de P4 neste estudo, obtiveram  
21 estes valores devido a baixa ligação deste hormônio com os receptores  
22 uterinos, visto que os mesmo se encontravam em anestro sem uma fonte  
23 endógena de P4. Hipótese esta corroborada com os achados de Fritsch, 2016,  
24 que verificou que doses mais altas de 10 mg de BE+P4 apresentaram  
25 expressão protéica e expressão gênica relativa dos transcritos para os  
26 receptores endometriais de E2 e P4 similares aos de éguas.

27 Nesse sentido, no presente estudo verificou-se que as éguas com CL<5  
28 dias apresentaram características uterinas similares ( $p<0,05$ ) as observadas  
29 nos demais grupos, entretanto obtiveram baixas taxas de prenhez. Esse fato  
30 provavelmente ocorreu devido a não sensibilização prévia do útero ao  $17\beta$   
31 estradiol contribuindo para uma menor ligação da progesterona ao endométrio.  
32 Com a adição de uma segunda dose da prostaglandina, possivelmente houve  
33 uma maior liberação dos receptores para estrógeno e, conseqüentemente, uma  
34 ligação adequada da progesterona aos receptores uterinos, uma vez que os

1 efeitos da progesterona sobre as características morfológicas da cérvix e útero  
2 são eficazes somente após efeitos estrogênicos [4].

3 A administração seriada de PGF (dinoprost) em éguas no diestro  
4 precoce provavelmente pode causar a lise do CL e estagnar suas funções,  
5 iniciando uma nova esteroidogênese, induzindo assim um retorno ao estro  
6 semelhante a éguas tratadas com uma dose de PGF<sub>2α</sub> na metade do diestro  
7 [5]. Nesse sentido, as aplicações consecutivas de 10 mg de dinoprost  
8 trometamina no início do protocolo para o grupo de éguas cíclicas em diestro  
9 com corpo lúteo menor do que quatro dias possibilitou uma ação estrogênica  
10 mais efetiva e conseqüentemente, após a aplicação do altrenogest resultou em  
11 um ambiente uterino adequado a manutenção embrionária, haja visto que os  
12 resultados de fertilidade desses animais foi restabelecido após essa  
13 intervenção.

14 A utilização do altrenogest e da progesterona nas doses utilizadas neste  
15 estudo foram eficientes para a manutenção da gestação desde que precedidas  
16 de uma fase estrogênica marcante, indicando que éguas anovulatórias  
17 administradas com progesterona exógena podem ser utilizadas como  
18 receptoras de embriões durante os períodos de transição e anestro [6]. Pode-  
19 se utilizar progesterona de longa ação com intuito da fixação e manutenção da  
20 gestação em éguas receptoras de embriões cíclicas [7].

21 A avaliação uterina pela da palpação retal e pelas imagens  
22 ultrassonográfica, no momento da TE, apresentaram características distintas  
23 das observadas nos animais do grupo controle. O tônus uterino se mostrou  
24 ligeiramente menos tenso e a imagem ultrassonográfica, muitas vezes, resultou  
25 na presença de estrias anecóicas similares as observadas em um animal com  
26 edema grau 1 durante o estro. Entretanto essas características nao interferiram  
27 na obtenção das taxas de prenhez diferentes das observadas do grupo  
28 controle.

29 Taxas de prenhez na TE de éguas foram similares a 70-75%, avaliadas  
30 com 12 dias após a TE. Nos 50 dias de gestação as taxas caíram para 65%,  
31 justificando a utilização de embriões de doadoras de idade avançada, o que  
32 não aconteceu com embriões de éguas doadoras jovens [8]. Resultados  
33 similares foram observados no presente estudo tanto nos animais do grupo  
34 controle como nos animais submetidos ao protocolo testado.

1 Com base nos resultados obtidos, a sincronização de qualquer receptora  
2 com a ovulação da Doadora contribuirá para uma redução da relação  
3 doadora/receptora, minimizando os custos com a manutenção de uma grande  
4 quantidade de receptoras no plantel. O protocolo proposto foi realizado com o  
5 intuito da sincronização as cegas sem a necessidade de palpar a receptora  
6 que seria utilizada, entretanto cabe ressaltar que o protocolo pode ser  
7 modificado quando através da palpação inicial indentifique-se o status  
8 reprodutivo da receptora, nesse caso, receptoras sem a presença de CL nos  
9 ovários descartariam a utilização do luteolítico nos primeiros dias do protocolo.

10 Outra vantagem na utilização deste tipo de sincronização uterina é a  
11 exclusão das falhas ovulatórias, que podem ocorrer, desqualificando algumas  
12 receptoras a se tornarem aptas a receber o embrião. Nesse sentido, vários  
13 autores relatam, que mesmo após a indução da ovulação, um percentual de  
14 aproximadamente 14,3% das éguas não ovulam após a aplicação do hCG ou  
15 análogas ao GnRH [9], ou apresentam a formação do folículo hemorrágico [17].  
16 Ainda, ocorrência de estros com baixa atividade estrogênica que contribuem  
17 para uma baixa qualidade do ambiente uterino e conseqüentemente taxas de  
18 prenhez insatisfatórias.

19 A utilização da preparação de receptoras exclusivamente com terapia  
20 hormonal, se por um lado apresenta algumas vantagens, também apresenta  
21 fatores desfavoráveis quando a receptora é diagnosticada como não prenhe ou  
22 não for utilizada devido a ausência da recuperação do embrião da doadora,  
23 pois nesses casos, as fêmeas permanecem com receptores uterinos ocupados  
24 por um período de aproximadamente 30 dias, não apresentando formação de  
25 edema uterino após a aplicação dos estrógenos. Outro fato que deve ser  
26 ressaltado é a necessidade da manutenção da prenhez com progesterona, até  
27 por volta dos 120 dias de gestação, haja vista que a maioria dos animais  
28 submetidos ao protocolo instituído não apresentam a formação de corpo lúteo.

29 Em conclusão, a sincronização do ambiente uterino pela intervenção  
30 hormonal proposta, se mostrou eficiente e possibilita uma alternativa para  
31 redução do manejo das receptoras em centrais de TE sem afetar as taxas de  
32 prenhez podendo dessa forma reduzir a proporção doadora/receptora.

33

34

## 1 REFERÊNCIAS

- 2  
3 [1] Hinrichs K, Sertich PL, Kenney RM. Use of altrenogest to prepare  
4 ovariectomized mares as embryo transfer recipients.  
5 *Theriogenology*1986;26(4):455-460.
- 6 [2] Ginther OJ, Rodrigues BL, FerreiraJC, Araujo RR, Beg MA. Characterisation  
7 of pulses of 13, 14-dihydro-15-keto-PGF2alpha (PGFM) and relationships  
8 between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis  
9 in mares.*Reproduction, FertilityandDevelopment*2008;20(6):684-693.
- 10 [3] Silva, ESM. Efeitos da administração de estradiol e progesterona sobre a  
11 concentração hormonal e expressão endometrial dos receptores de estrógeno  
12 e progesterona em éguas receptoras acíclicas 2015.
- 13 [4] Allen WR. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reproduction*  
14 *in domestic animals*2001;36(3-4):121-131.
- 15 [5] Coffman EA. Antiluteogenic effects of serial prostaglandin f2 $\alpha$  administration  
16 in mares2013.
- 17 [6] Rocha Filho NA, Pessoa MA, Gioso MM, Alvarenga MA. Transfer of equine  
18 embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting  
19 progesterone. *Animal Reproduction* 2004;1(1):91-95.
- 20 [7] Greco GM, Fioratti EG, Segabinazzi LG, Dell'Aqua JA, Crespilho AM,  
21 Castro-Chaves MMB, Alvarenga MA. Novel Long-Acting Progesterone  
22 Protocols Used to Successfully Synchronize Donor and Recipient Mares With  
23 Satisfactory Pregnancy and Pregnancy Loss Rates. *Journal of Equine*  
24 *Veterinary Science*2016; 39:58-61.
- 25 [8] Squires EL. Management of the embryo donor and recipient mare. In:  
26 Squires EL, Carnevale EM, Mccue PM, Bruemmer JE. *Embryo technologies in*  
27 *the horse. Theriogenology*2003;59(1):151-170.
- 28 [9] Yoon MJ, Boime I, Colgin M, Niswender KD, KingSS, Alvarenga M.,  
29 ...RoserJF. The efficacy of a single chain recombinant equine luteinizing  
30 hormone (reLH) in mares: induction of ovulation, hormone profiles, and inter-  
31 ovulatory intervals. *Domestic animal endocrinology* 2007; 33(4): 470-479.

1 [10] Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Conversion of a viable  
2 preovulatory follicle into a hemorrhagic anovulatory follicle in mares. *Animal*  
3 *Reproduction*2006; 3(1): 29-40.

4

1 Normas de publicação da revista Theriogenology:

2 Subdivision - numbered sections Divide your article into clearly defined and  
3 numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...),  
4 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering  
5 also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection  
6 may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate  
7 line.

8 Introduction State the objectives of the work and provide an adequate  
9 background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

10 Material and methods Provide sufficient detail to allow the work to be  
11 reproduced. Methods already published should be indicated by a reference:  
12 only relevant modifications should be described.

13 Results Results should be clear and concise. Discussion This should explore  
14 the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results  
15 and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and  
16 discussion of published literature.

17 Conclusions The main conclusions of the study may be presented in a short  
18 Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a  
19 Discussion or Results and Discussion section.

20 Essential title page information • Title. Concise and informative. Titles are often  
21 used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where  
22 possible. • Author names and affiliations. Please clearly indicate the given  
23 name(s) and family name(s) of each author and check that all names are  
24 accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual  
25 work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase  
26 superscript letter immediately after the author's name and in front of the  
27 appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including  
28 the country name and, if available, the e-mail address of each author. •  
29 Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all  
30 stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-  
31 mail address is given and that contact details are kept up to date by the

1 corresponding author. • Present/permanent address. If an author has moved  
2 since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a  
3 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to  
4 that author's name. The address at which the author actually did the work must  
5 be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are  
6 used for such footnotes.

7 Abstract A concise and factual abstract is required. The abstract should state  
8 briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions.  
9 Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able  
10 to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if  
11 essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also,  
12 nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is  
13 essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself.  
14 Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500  
15 keystrokes (characters plus spaces).

16 Keywords Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords,  
17 using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple  
18 concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only  
19 abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will  
20 be used for indexing purposes.

21 Acknowledgements Collate acknowledgements in a separate section at the end  
22 of the article before the references; therefore, do not include them on the title  
23 page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during  
24 the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading  
25 the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and  
26 materials.

27

28 Subdivisão - seções numeradas Divida seu artigo em seções claramente  
29 definidas e numeradas. As subsecções devem ser numeradas 1.1 (em seguida,  
30 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (o resumo não está incluído na numeração da  
31 secção). Use esta numeração também para referências cruzadas internas: não

1 se refira apenas ao "texto". Qualquer subsecção pode receber um breve  
2 cabeçalho. Cada título deve aparecer em sua própria linha separada.

3 Introdução Exponha os objetivos do trabalho e forneça uma base adequada,  
4 evitando uma pesquisa bibliográfica detalhada ou um resumo dos resultados.

5 Material e métodos Fornecer detalhes suficientes para permitir que o trabalho  
6 seja reproduzido. Métodos já publicados devem ser indicados por uma  
7 referência: apenas devem ser descritas modificações relevantes.

8 Resultados Os resultados devem ser claros e concisos. Discussão Isso deve  
9 explorar a importância dos resultados do trabalho, não repeti-los. Uma seção  
10 combinada de Resultados e Discussão é freqüentemente apropriada. Evite  
11 citações extensas e discussão da literatura publicada.

12 Conclusões As principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em  
13 uma breve seção de Conclusões, que pode ser isolada ou formar uma  
14 subseção de uma seção Discussão ou Resultados e Discussão. Informações  
15 essenciais da página de rosto • Título. Concisa e informativo. Os títulos são  
16 freqüentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Evite  
17 abreviações e fórmulas sempre que possível. • Nomes de autores e afiliações.  
18 Indique claramente o (s) nome (s) e nome (s) de família de cada autor e  
19 verifique se todos os nomes estão devidamente escritos. Apresentar os  
20 endereços de afiliação dos autores (onde o trabalho real foi feito) abaixo dos  
21 nomes. Indique todas as afiliações com uma letra de sobrescrito em minúscula  
22 imediatamente após o nome do autor e na frente do endereço apropriado.  
23 Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do  
24 país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor. • Autor  
25 correspondente. Indicar claramente quem vai lidar com a correspondência em  
26 todas as fases de arbitragem e publicação, também pós-publicação. Certifique-  
27 se de que o endereço de e-mail é dado e que os detalhes de contato são  
28 mantidos atualizados pelo autor correspondente. • Endereço atual /  
29 permanente. Se um autor se deslocou desde que o trabalho descrito no artigo  
30 foi feito, ou estava visitando no momento, um "endereço atual" (ou "endereço  
31 permanente") pode ser indicado como uma nota de rodapé para o nome do  
32 autor. O endereço em que o autor realmente fez o trabalho deve ser mantido

1 como o principal endereço de afiliação. Números arábicos sobrescritos são  
2 usados para tais notas de rodapé. Resumo É necessário um resumo conciso e  
3 factual. O resumo deve indicar brevemente o objetivo da pesquisa, os  
4 principais resultados e principais conclusões. Uma vez que um resumo é  
5 muitas vezes apresentado separadamente do artigo, ele deve ser capaz de  
6 ficar sozinho. Por esta razão, as referências devem geralmente ser evitadas,  
7 mas, se forem essenciais, devem ser citadas na íntegra, sem referência à lista  
8 de referências. Além disso, devem ser evitadas abreviaturas não padronizadas  
9 ou incomuns, mas se a sua utilização for essencial, devem ser definidas na sua  
10 primeira menção no próprio resumo. Os resumos devem ser limitados a um  
11 único parágrafo com não mais de 2.500 pressionamentos de tecla (caracteres  
12 mais espaços).

13 Palavras-chave Imediatamente após o resumo, fornecer um máximo de 6  
14 palavras-chave, usando a ortografia americana e evitando termos gerais e  
15 plurais e conceitos múltiplos (evite, por exemplo, 'e', 'de'). Ser poupador com  
16 abreviaturas: apenas abreviaturas firmemente estabelecidas no campo podem  
17 ser elegíveis. Essas palavras-chave serão usadas para fins de indexação.

18 Agradecimentos Agrupe reconhecimentos em uma seção separada no final do  
19 artigo antes das referências; Portanto, não incluí-los na página de rosto, como  
20 uma nota de rodapé para o título, etc. Liste as pessoas que prestaram ajuda  
21 durante a pesquisa (por exemplo, fornecer ajuda de idioma, escrever ajuda ou  
22 prova de ler o artigo, etc.), fontes de Apoio financeiro e doações de produtos e  
23 materiais.