

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

**EXPRESSÃO DOS RECEPTORES ENDOMETRIAIS DE
ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM ÉGUAS ACÍCLICAS
APÓS ADMINISTRAÇÃO DE PROGESTERONA**

LUCIANA FRANÇA SMITH MACIEL

BOTUCATU, SP

Julho-2017

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

**EXPRESSÃO DOS RECEPTORES ENDOMETRIAIS DE
ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM ÉGUAS ACÍCLICAS
APÓS ADMINISTRAÇÃO DE PROGESTERONA**

LUCIANA FRANÇA SMITH MACIEL

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

Orientador: Prof.Dr.Cezinande de
Meira

Coorientadora: Profa.Dra. Elisa
Sant’Anna Monteiro da Silva

BOTUCATU- SP
Julho 2017

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

Maciel, Luciana França Smith.

Expressão dos receptores endometriais de estrógeno e progesterona em éguas acíclicas após administração de progesterona / Luciana França Smith Maciel. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Cezinande de Meira

Coorientador: Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva

Capes: 50504002

1. Equino - Distribuição sazonal. 2. Expressão gênica. 3. Estrogênios. 4. Progesterona.

Palavras-chave: Equinos; Protocolos hormonais; Sazonalidade.

Nome do Autor (a): Luciana França Smith Maciel

Título: Expressão dos receptores endometriais de estrógeno e progesterona em éguas acíclicas após administração de progesterona.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Cezinande de Meira

Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Profa.Dra. Fernanda Saules Ignácio

Membro

Departamento de Medicina Veterinária, setor de Reprodução Animal

Faculdades Integradas de Ourinhos

Data da defesa: 07 de Julho de 2017

Agradecimentos

Agradeço a meus pais, Paulo e Vanessa, por todo apoio, incentivo e amor. Aos meus irmãos, André e Ivan, minha cunhada Bruna, por todo amor e apoio. Sem vocês nada disso seria possível!

Ao meu orientador, professor Cezinande Meira, pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

A minha coorientadora, Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva, pela imensa ajuda em todos os momentos, pelo incentivo e ensinamentos.

A todos os amigos que fiz em Botucatu por tornarem meus dias melhores, pelo companheirismo e experiências compartilhadas.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal pelos ensinamentos, em especial a professora Eunice Oba pelo auxílio na dosagem hormonal para meu experimento e por ceder o laboratório de Endocrinologia.

A todos os funcionários do Departamento de Reprodução Animal pela agradável convivência e auxílio.

Ao professor José Paes de Oliveira Filho por ceder o laboratório de Biologia Molecular da Clínica Veterinária, pelos ensinamentos e oportunidade.

A professora Renée Laufer Amorim do Departamento de Patologia Veterinária por ceder o laboratório de Imunoistoquímica para a realização da técnica.

Ao mestrando Rodolfo Rossi pelo auxílio e realização das análises estatísticas.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio concedido para realização deste e dos demais projetos do grupo de pesquisa coordenado pelo professor Cezinande de Meira.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o período de realização deste mestrado.

Ao professor José Camisão de Souza da UFLA, pela amizade, conselhos e por me passar seus conhecimentos sem os quais não teria chegado até aqui. Aos amigos da UFLA que mesmo com a distância estiveram sempre presentes.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização do meu projeto fica aqui registrado o meu agradecimento e minha gratidão.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	3
1-INTRODUÇÃO.....	4
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1- Ciclo estral e sazonalidade reprodutiva	5
2.2- Éguas receptoras acíclicas	6
2.3- Progestágenos	8
2.4- Expressão dos receptores endometriais de estrógeno e progesterona	10
3-REFERÊNCIAS	14
 CAPÍTULO 2	20
Introdução	22
Material e métodos	24
Resultados	28
Discussão.....	33
Conclusão	36
Referências	37

MACIEL, L.F.S. Expressão dos receptores endometriais de estrógeno e progesterona em éguas acíclicas após administração de progesterona. Botucatu, 2017. 40 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A progesterona (P4) é frequentemente utilizada, após a administração de estradiol, para preparo de éguas acíclicas sazonais como receptoras de embrião, entretanto estudos anteriores relataram gestação de éguas acíclicas sazonais tratadas somente com P4. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão gênica e proteica dos receptores de estrógeno alfa (ER α), estrógeno beta (ER β) e progesterona (PR) no endométrio de éguas acíclicas sazonais tratadas com progesterona de longa ação (P4LA). Foram utilizadas 8 éguas durante a fase de anestro sazonal, nas quais foram realizadas biópsias uterinas imediatamente antes e cinco dias após a administração de 1,5 g de P4LA. Coletas de sangue foram realizadas diariamente para dosagem da concentração plasmática de P4. Para avaliação da expressão proteica dos receptores foi realizada a técnica de imunoistoquímica (IHQ) e o percentual da área imunomarcada foi determinado pelo *software* ImageJ. As abundâncias dos transcritos para ER α (ESR1), ER β (ESR2) e PR (PGR) foram determinadas por RT-qPCR. Os ER α apresentaram maior expressão proteica ($p < 0,05$) após a administração de P4LA, porém não houve alteração da abundância dos mRNA que codificam esse gene ($p > 0,05$). Quanto aos ER β , foi observada tendência a menor expressão proteica ($p = 0,07$) e inibição da expressão gênica ($p < 0,05$) após o tratamento, já os PR não apresentaram alteração ($p > 0,05$). A concentração plasmática de P4 apresentou maior concentração 24 horas após a aplicação de P4LA (D1) com posterior declínio desses valores ($p < 0,05$). A dose de 1,5 g de P4LA atingiu as concentrações mínimas de P4 necessárias para o estabelecimento e manutenção da gestação.

Palavras-chave: Equinos, protocolos hormonais, sazonalidade.

MACIEL, L.F.S. Endometrial expression of estrogen and progesterone receptors in non-cyclic mares after progesterone administration, Botucatu, 2017. 40 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

Progesterone (P4) is frequently used after the administration of estradiol, to prepare seasonal non-cyclic mares as embryo recipients, however previous studies have reported gestation of seasonal non-cyclic mares treated only with P4. The objective of the present study was to evaluate the gene and protein expression of estrogen receptor alpha (ER α), estrogen beta (ER β) and progesterone (PR) in the endometrium of seasonal non-cyclic mares treated with long acting progesterone (LAP4). Eight mares were used during the seasonal anoestrus phase, uterine biopsies were performed immediately before and five days after administration of 1,5 g of LA P4. Blood samples were taken daily for the determination of plasma P4 concentration. The protein expression of the receptors was evaluated by the immunohistochemistry and the immunostaining area percentage was determined by the ImageJ software. Transcripts abundance for ER α (ESR1), ER β (ESR2) and PR (PGR) were determined by RT-qPCR. ER α showed higher protein expression ($p < 0.05$) after administration of P4LA, but there was no change in mRNA abundance encoding this gene ($p > 0,05$). Tendency to lower protein expression was observed ($p = 0,07$) and gene expression inhibition ($p < 0,05$) for ER β , PR did not changes ($p > 0,05$). The plasma concentration of P4 presented a higher concentration 24 hours after the application of LA P4 (D1), with subsequent decline in these values ($p < 0,05$). The 1.5 g dose of LA P4 reached the minimum concentrations of P4 required for the establishment and maintenance of gestation.

Keywords: Equine, hormonal protocols, seasonality.

Capítulo 1

1.Introdução

O fotoperíodo tem ação direta sobre o início da estação reprodutiva nas éguas. Durante os períodos de baixa luminosidade diária, a atividade reprodutiva torna-se reduzida, caracterizando a fase de anestro sazonal (BLANCHARD et al., 2003). Além disso, o início da estação reprodutiva depende de diversos fatores fisiológicos e ambientais, tais como idade, raça e condição corporal (GINTHER, 1992; NAGY et al., 2000).

O manejo diferenciado entre éguas doadoras e receptoras, além da baixa oferta de alimentos durante o período de transição, faz com que as doadoras iniciem a atividade reprodutiva mais cedo, enquanto as receptoras permanecem em anestro (SILVA et al., 2014a). Dessa forma, existe um reduzido número de receptoras cíclicas disponíveis nessa fase.

Protocolos hormonais utilizando estradiol (E2) associado à progesterona (P4) são amplamente utilizados para a preparação de éguas acíclicas sazonais (anestro ou transição) como receptoras de embrião (GRECO et al., 2012; ROCHA FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2014b), uma vez que a utilização desses hormônios mimetiza alterações uterinas semelhantes às observadas em éguas cíclicas (PINTO, 2011). O E2 e a P4 ligam-se a seus receptores no endométrio, modulando a expressão gênica e a síntese proteica de acordo com a fase do ciclo estral (HARTT et al., 2005). Além disso, o E2 estimula o aumento dos receptores de estrógeno e P4 no endométrio (McDOWELL et al., 1999; SILVA et al., 2017). Ao contrário do estrógeno, a P4 secretada pelo corpo lúteo (CL) após a ovulação inibe a expressão gênica e proteica dos receptores de estrógeno e P4 no endométrio durante o diestro. Tal inibição, principalmente no epitélio luminal e glandular, é importante para o desenvolvimento inicial da gestação (HARTT et al., 2005), pois pode ser em resposta a sinalização da presença do embrião no útero. Alguns trabalhos relataram prenhez em éguas receptoras acíclicas ovariectomizadas e sazonais tratadas somente com P4 (HINRICHS et al., 1985, 1986, 1987; CARNEVALE et al., 2000).

McDowell et al. (1999) e Silva et al. (2017) descreveram o efeito da administração de estrógeno seguido de P4 na expressão gênica e proteica dos

receptores endometriais de éguas acíclicas, no entanto, o efeito somente da P4 sobre esses receptores ainda é pouco conhecido. O objetivo dessa revisão é abordar o ciclo estral na espécie equina, uso de éguas receptoras acíclicas, progestágenos e a dinâmica dos receptores endometriais de estrógeno e P4.

2.Revisão da literatura

2.1 Ciclo estral e sazonalidade reprodutiva

A espécie equina caracteriza-se por ser poliéstrica estacional, ou seja, manifesta comportamento reprodutivo durante a primavera e verão, períodos de maior luminosidade diária (AURICH, 2011). Durante o período ovulatório, as éguas apresentam atividade reprodutiva regular, sendo o ciclo estral dividido em duas fases distintas: estro (fase folicular) e diestro (fase luteal) com duração média de 21 a 22 dias e variação de 18 a 26 dias (BLANCHARD et al., 2003).

O estro caracteriza-se pela receptividade sexual da égua ao garanhão, estimulado pelos níveis crescentes de estrógeno produzido pelo folículo em desenvolvimento, além disso, a maioria das éguas apresenta edema endometrial (McCUE et al., 2011). Apresenta de 4 a 7 dias de duração, dependendo da taxa de crescimento do folículo dominante até o momento da ovulação (McCUE et al., 2011). No diestro há produção crescente de P4 pelo corpo lúteo (CL), cessando temporariamente as manifestações de estro. Os níveis de P4 são estáveis até o 12^a e após esse período é iniciada a luteólise (GINTHER, 1992). O diestro tem duração de 14 a 15 dias, tendo pouca variação quando comparado ao estro (BRINSKO et al., 2010; GINTHER et al., 2004).

As mudanças na luminosidade diária comprometem a atividade reprodutiva das éguas via estímulo ou inibição da secreção de melatonina pela glândula pineal, o que afeta a produção hormonal no hipotálamo e hipófise (GINTHER et al., 2004; NAGY et al., 2000). Além da fase ovulatória, a sazonalidade pode ser dividida em outras três fases: transição de outono, anestro e transição de primavera (BLANCHARD et al., 2003; GINTHER et al., 2004).

A transição de outono é o período entre a fase ovulatória e o anestro, caracteriza-se por alterações ovarianas como persistência do CL, crescimento de folículos anovulatórios, folículos hemorrágicos e decréscimo da concentração de E2 (KING 2011; NEQUIM et al., 2000; WEEDMAN et al., 1993). No anestro os ovários da égua ficam com a estrutura e a função hormonal quiescente (KING, 2011). Durante essa fase, os folículos são menores que 15 mm, há ausência de CL e a concentração de P4 é menor que 1 ng/mL (DONADEU; WATSON, 2007; GINTHER, 1992). Já a transição de primavera é o período entre o anestro e a fase ovulatória, no qual se observa aumento gradual do número e diâmetro foliculares, sem que ocorra ovulação (SHARP, 2011).

2.2 Éguas receptoras acíclicas

Éguas receptoras acíclicas tratadas hormonalmente são utilizadas em programas de transferência de embrião (TE) por facilitar o manejo e permitir o uso dos animais no período não-ovulatório. Podem ser utilizadas como acíclicas as éguas ovariectomizadas e as que se encontram em anestro ou transição (acíclicas sazonais). O uso de éguas receptoras acíclicas iniciou-se nos anos 80, com a utilização de éguas ovariectomizadas. As cirurgias eram realizadas três semanas antes da realização da TE, com objetivo de reduzir o manejo com rufiações e palpações transretais (HINRICHS et al. 1985, 1986, 1987).

Hinrichs et al. (1985, 1986) utilizaram somente progestágenos para o preparo de receptoras ovariectomizadas. O tratamento com 300 mg de altrenogest (progestágeno sintético), diariamente, cinco dias antes da TE resultou em uma taxa de prenhez de 75% (3 gestações de 4 transferências) (HINRICHS et al., 1985). Em outro estudo de Hinrichs et al. (1986), foi comparada a eficácia de diferentes doses dos progestágenos. As éguas foram tratadas com 22 mg e 66 mg de altrenogest e 300 mg de P4 oleosa, diariamente por cinco a seis dias antes da TE e as taxas de prenhez obtidas foram 16% (1/6), 33%(2/6) e 40% (2/5), respectivamente. Hinrichs et al. (1986) afirmam que uma baixa dose (22mg) do progestágeno pode não ser suficiente para preparação do ambiente uterino para receber o embrião.

McKinnon et al. (1988) prepararam receptoras ovariectomizadas com E2 administrado previamente aos progestágenos O E2, além de simular hormonalmente o estro, estimula o aumento dos receptores endometriais para P4 em éguas cíclicas (ZAVY et al., 1979). No primeiro tratamento do estudo de McKinnon et al. (1988), administrou-se E2 três a cinco dias até a ovulação da doadora e 300 mg de P4 injetável diariamente após ovulação da doadora. O segundo tratamento foi similar ao primeiro, porém a aplicação de E2 foi contínua até o dia 20 após ovulação da doadora. E o terceiro protocolo também foi similar ao primeiro, porém com uma dose de 0,044 mg/kg de altrenogest. As taxas de prenhez encontradas foram semelhantes às descritas por Hinrichs et al. (1985), com variação de 70 a 80% entre os grupos (7/10, 8/10, 14/20). É interessante relatar que a dose de 0,044 mg/kg utilizada em um animal com peso de 500 kg, como descrito no estudo de McKinnon et al. (1988), equivale a 22 mg do progestágeno, dose considerada baixa por Hinrichs et al. (1985). Assim, pode ser que o período de tratamento com E2 não seja a condição primordial para iniciar e manter a gestação, mas a administração prévia de estrógeno sim.

Em vista da dificuldade para realização da ovariectomia e do custo do procedimento, o uso de receptoras acíclicas sazonais tratadas hormonalmente tornou-se uma opção vantajosa, por dispensar a realização de cirurgia. Além disso, assim como as éguas ovariectomizadas, as acíclicas sazonais também podem ser utilizadas com sucesso como receptoras de embrião (LAGNEAUX; PALMER, 1993). Em estudos com éguas acíclicas sazonais em transição de primavera, foram encontradas taxas de gestação similares a de éguas cíclicas, administrando somente altrenogest (Regumate®, 0,044 mg/Kg), diariamente, cinco a sete dias antes da TE e até os 120 dias de gestação (CARNEVALE et al., 2000). Possivelmente, na fase de transição de primavera as éguas já apresentavam concentrações mínimas de estrógeno, suficientes para estimular a expressão dos receptores endometriais de estrógeno e P4. Rocha Filho et al. (2004), também não encontraram diferença nas taxas de prenhez ao comparar receptoras cíclicas com receptoras acíclicas sazonais, tratadas com cipionato de estradiol (10 mg/day, i.m.; ECP; Pharmacia and Upjohn Co., Kalamazoo, Michigan, EUA) associado a P4 de curta (P4; Northside Pharmacy, Lexington,

EUA) e longa ação (P4LA 150; B.E.T. Laboratories, Lexington, EUA) até 100 dias de gestação.

Existe uma vantagem econômica para criadores quando os potros nascem próximo ao início do ano hípico (1^a de janeiro no hemisfério norte e 1^a de julho no hemisfério sul), porém para nascerem nessa época, a TE deve ser realizada no período de transição, no qual há baixo número de receptoras cíclicas. Sendo assim, o uso de receptoras acíclicas sazonais torna-se uma alternativa benéfica.

2.3 Progestágenos

O termo progestágeno refere-se à esteróides naturais ou sintéticos que apresentam efeito análogo ao da P4 e por isso mimetizam alterações uterinas semelhantes às observadas em éguas cíclicas gestantes (PINTO, 2011). A P4 é uma molécula lipofílica, derivada do colesterol, classificada como hormônio esteroide. É sintetizada nos ovários pelas células do CL e em éguas gestantes pela unidade feto-placentária (BEATO; KLUG, 2000; VANDERWALL, 2011). A síntese de P4 é iniciada no interior da mitocôndria. O colesterol é transportado pela proteína stAR (proteína reguladora da esteroidogênese) para o interior da mitocôndria e convertido enzimaticamente à pregnenolona pela ação da P450scc (enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol). No retículo endoplasmático liso a enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase converte a pregnenolona em P4 (HANUKOGLU, 1992; NISWENDER et al., 2000).

Na circulação sanguínea, a P4 é carregada por proteínas de transporte, albumina e transcortina, para receptores específicos localizados nas células alvo (GIORGI, 1980). As proteínas transportam a P4 até próximo da membrana celular externa das células alvo e neste local a P4 se dissocia da proteína, difundindo-se na membrana plasmática para se ligar ao receptor (NORMAN; HENRY, 2015). O complexo hormônio-receptor realiza a transcrição de genes responsivos a P4 presentes no DNA. Esse complexo atua como um fator de transcrição, por modular a síntese de RNAm e proteínas, o que resulta nas ações hormonais da P4 (BAGCHI et al., 1992; DeFRANCO, 2002; DeMAYO et al., 2002; VANDERWALL, 2011). A concentração de P4 aumenta gradativamente nos primeiros dias pós-ovulação e atinge valores máximos, em

torno de 12 a 14 ng/mL, entre seis e oito dias após a ovulação, continuando elevados até o início da luteólise (GINTHER et al., 2006, 2007).

Em éguas gestantes a produção inicial de P4 pelo CL é idêntica à de éguas não gestantes, no entanto a presença do embrião no lúmen uterino impede a liberação de prostaglandina (PGF2 α) e consequentemente a luteólise (VANDERWALL, 2011), além disso, com o decorrer da gestação outras fontes de P4 tornam-se ativas, como os CL suplementares e a unidade feto-placenta (ALLEN, 2001). No início da gestação há liberação contínua do hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise anterior e presença de ondas foliculares nos ovários, entretanto não ocorre ovulação devido à retroalimentação negativa da P4 sobre a secreção do hormônio luteinizante (LH) (ALLEN, 2001; SQUIRES; GINTHER, 1975). A partir de 38 a 40 dias de gestação os cálices endometriais produzem a gonadotrofina coriônica equina (eCG), que apresenta atividade biológica de FSH e LH na mesma molécula (BRINSKO et al., 2011). Nos equinos a fração FSH da eCG possui baixa capacidade de se ligar a seus receptores e a fração LH tem ação luteotrófica (MURPHY, 2012), dessa forma, os folículos oriundos das ondas foliculares do início da gestação ovulam ou luteinizam dando origem aos CLs suplementares, que irão produzir P4 até aproximadamente 150 de gestação, quando então a unidade feto- placenta assume a produção de progestágenos (BRINSKO et al., 2011; GINTHER, 1992; SILVA et al., 2014a).

A P4 é o hormônio essencial para o estabelecimento da gestação, por provocar modificações uterinas necessárias para mobilidade, fixação, orientação e sobrevivência do embrião (KASTELIC et al., 1987). Dentre outras ações importantes da P4, destaca-se a influência expressiva no comportamento sexual das éguas, sendo que as manifestações de estro ocorrem somente quando os níveis plasmáticos de P4 estão abaixo de 1ng/mL e 24 a 48 horas após ovulação o CL produz P4 suficiente para bloquear o comportamento de estro (ARRUDA et al., 2001; AURICH, 2011; CROWELL-DAVIS, 2007). A P4 e estrógeno exercem ações diretas sobre o eixo hipotálamo- hipófise. Enquanto o estrógeno estimula a liberação de LH e inibe a de FSH, a P4 apresenta ação inibitória sobre a liberação de LH e parece não

afetar a secreção de FSH (VANDERWALL, 2011), importante para posterior formação dos CLs suplementares em éguas gestantes.

2.4 Expressão dos receptores de estrógeno e progesterona

As ações biológicas da P4 e estrógeno ocorrem por meio da ligação do hormônio a receptores celulares, esse complexo hormônio-receptor desloca-se para o núcleo da célula e se liga a elementos responsivos a ação esteroide presentes no DNA. Após essa ligação é iniciada a transcrição do gene alvo (SCHUCHARD et al., 1993; SCHWARTZ et al., 2016). A estrutura dos receptores esteroidais é construída por uma região amino terminal variável (N-terminal), que modula a expressão gênica; pelo domínio de ligação ao DNA, que reconhece as sequências específicas do DNA; e pelo domínio de ligação carboxi terminal (C-terminal), essencial para a ligação hormonal, dimerização e transativação do receptor (BRINKMANN, 1994; GRIMM et al., 2016).

Os receptores de P4 (PR) são constituídos por duas isoformas distintas, A e B (CONNELLY; LYDON, 2000; McDONNELL et al., 1994; MOTE et al., 2006), expressas no útero, ovários, vagina, glândula mamária e testículos (CONNELLY; LYDON, 2000; GRAHAM; CLARKE, 1997). A isoforma PR-B difere-se da PR-A por apresentar uma sequência adicional de aminoácidos em sua região N-terminal (CONNELLY; LYDON, 2000). O PR-A apresenta efeito inibitório sobre a expressão de diversos receptores, como os de andrógenos, estrógeno, mineralocorticoides e do próprio PR-B. Já o PR-B ativa intensamente a transcrição de genes responsivos a P4 (CONNELLY et al., 2003; WEN et al., 1994). Além disso, a alta expressão gênica do PR-A nos tecidos alvo pode reduzir a resposta à P4. O equilíbrio da expressão do PR-A e PR-B foi descrito no útero de mulheres, oviduto de galinhas e em células cultivadas de câncer de mama, porém, em roedores foi observado que não há equilíbrio entre a expressão destas isoformas, sendo que a expressão do PR-A sobrepõe a do PR-B na proporção de 3:1 (GRAHAM; CLARKE, 1997).

As funções biológicas do receptor de estrógeno (ER) também são reguladas por dois tipos de receptores, alfa (ER α) e beta (ER β), que apresentam estrutura molecular semelhante (KUIPER et al., 1997; LANE, 2008; LEE et al., 2012), apesar de apresentarem diferença significativa das regiões

C- terminal e N-terminal, com percentual de homologia de 18 e 17% respectivamente (KUIPER et al., 1996). As ações do estrógeno são controladas pelo equilíbrio da atividade do ER α e ER β , uma vez que esses receptores apresentam diferentes mecanismos transcricionais (LEE et al., 2012). Quando localizados na mesma célula a expressão gênica mediada pelo ER α geralmente é inibida pelo ER β (LANE, 2008). Em ratos, observa-se alta expressão gênica do ER α no útero, células da teca, estroma da próstata e células de Leydig nos testículos (LANE, 2008). Já o ER β apresenta elevada expressão gênica no epitélio da próstata, testículos e células da granulosa (ENMARK et al., 1997; WEISER, 2008). Foi relatada a expressão do ER β no útero de mulheres, ratos (MATSUZAKI et al., 1999; WADA-HIRAIKE et al., 2006) e em equinos (HONNENS et al., 2011; SILVA et al., 2014b).

A expressão gênica e proteica dos ER e PR varia de acordo com a fase do ciclo estral e nas células que constituem o tecido endometrial. Observa-se expressão proteica dos ER e PR nos núcleos do epitélio luminal, epitélio glandular e nas células do estroma do endométrio. (AUPPERLE et al., 2000; KIMMINS; MacLAREN, 2001; WATSON et al., 1992). Durante o estro de suínos (GEISERT et al., 1993), ovinos (SPENCER; BAZER, 1995) e equinos (HARTT et al., 2005; McDOWELL et al., 1999; SILVA et al., 2014b), os ER e PR apresentam intensa expressão gênica e proteica. Acredita-se que tal padrão observado seja devido aos altos níveis de estrógeno presentes durante o estro, uma vez que já foi descrito por que o estrógeno estimula o aumento de seus receptores e dos PR (SPENCER; BAZER, 1995; ZAVY et al., 1979)

Os ER apresentam elevada expressão proteica nos epitélios luminal, glandular e estroma uterino durante o estro (HARTT et al., 2005). Os ER α apresentaram alta marcação proteica nos epitélios luminal, glandular e estroma durante o estro, enquanto a expressão proteica dos ER β foi observada nos mesmos tipos celulares, porém não apresentaram variação na intensidade de imunomarcação entre os momentos avaliados, estro e diestro (SILVA et al., 2014b). Os PR também apresentam maior expressão gênica durante o estro, com intensa marcação proteica nos epitélios luminal, glandular e estroma (AUPPERLE et al., 2000; HARTT et al., 2005; SILVA et al., 2014b).

Em ovinos, espécie em que se têm mais detalhes sobre a expressão gênica dos receptores uterinos, o estrógeno tem efeito estimulatório sobre a expressão proteica dos ER e PR, enquanto a P4 possui efeito inibitório (SPENCER; BAZER, 1995). Acredita-se que em equinos ocorra o mesmo (HARTT et al., 2005). Durante o diestro, observa-se fraca expressão gênica e proteica tanto dos ER quanto dos PR devido aos altos níveis plasmáticos de P4 (AUPPERLE et al., 2000; WATSON et al., 1992; SILVA et al., 2014b). Durante o início (14 a 20 dias) e no terço inicial da gestação também há um decréscimo na expressão gênica e proteica dos ER e PR no endométrio de éguas (HARTT et al., 2005; SILVA et al., 2014b), bovinos (KIMMINS; MacLAREN, 2001) e ovinos (SPENCER;BAZER, 1995; SPENCER;BAZER, 2002). Hartt et al. (2005) relatam que a supressão dos PR pode ocorrer em resposta à presença do embrião no útero. Além disso, essa menor expressão proteica pode ser importante para o preparo do útero para receber o embrião, para o reconhecimento materno da gestação, implantação e desenvolvimento do embrião (OKUMU et al., 2010; SPENCER; BAZER, 1995; SPENCER; BAZER, 2002).

Estudos utilizando fêmeas acíclicas sazonais ou ovariectomizadas tratadas hormonalmente (KIMMINS; MacLAREN, 2001; McDOWELL et al., 1999; SILVA et al., 2017; WU et al., 1996) foram desenvolvidos com intuito de compreender o mecanismo de ação do estrógeno e da P4 sobre a expressão gênica e proteica dos receptores endometriais. Foi observada maior expressão gênica dos ER α em éguas acíclicas sazonais tratadas somente com valerato de estradiol por seis dias, quando comparado aos animais tratados com valerato de estradiol pelo mesmo período seguido da administração de P4 de curta ou longa ação (P4LA) por seis dias (McDOWELL et al., 1999). Em outro estudo com éguas acíclicas sazonais foi utilizada uma única dose de benzoato de estradiol seguido de administração única de P4LA, os autores relataram um aumento da expressão gênica dos ER α e PR cinco dias após a administração de P4LA e o ER β não apresentou alteração (SILVA et al., 2017). Em vacas e ovelhas ovariectomizadas, a administração de P4 não alterou a expressão proteica dos seus próprios receptores e dos ER (KIMMINS; MacLAREN, 2001; WU et al., 1996).

McDowell et al. (1999) e Silva et al. (2017) observaram imunomarcção dos ER e PR no endométrio de éguas acíclicas antes do tratamento hormonal, semelhante ao relatado na expressão proteica dos mesmos receptores em vacas ovariectomizadas (KIMMINS; MacLAREN, 2001). Uma das hipóteses é que fatores parácrinos possam estar envolvidos na regulação da expressão dos ER e PR (McDOWELL et al., 1999; SPENCER; BAZER, 1995).

Assim, é importante avaliar as alterações observadas na expressão gênica e proteica dos receptores endometriais de estrógeno e progesterona em éguas acíclicas após o tratamento com protocolos hormonais.

Referências bibliográficas organizadas de acordo com as normas da ABNT6023/2016.

REFERÊNCIAS

ALLEN, W.R. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 36, p. 121-131, 2001.

ARRUDA, R.P. et al. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultrassom e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões equinos? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 233-239, 2001.

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

AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, v.124, p. 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, 1992.

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

BLANCHARD, T.L. et al. **Reproductive Physiology of the Nonpregnant Mare**. In: BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P. RIGBY, S.L. Manual of Equine Reproduction. 3ª Ed ,Mosby, Elsevier, 2003, cap. 2, p.9-15.

BRINKMANN, A.O. Steroid Hormone Receptors: Activators of Gene Transcription. **Journal of Pediatric Endocrinology**, v.7, p. 275-282, 1994.

BRINSKO, S.P. et al. **Pregnancy: Physiology and Diagnosis**. In: BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D.L. Manual of Equine Reproduction. 3ª Ed ,Mosby, Elsevier, 2011, p.85-93.

CARNEVALE, E.M. et al. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.54, p.965-79, 2000.

CONNELLY, O.M.; LYDON, J.P. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. **Steroids**, v. 65, p. 571–577, 2000.

CONNELLY, O.M.; MULAC-JERICEVIC, B.; LYDON, J.P. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. **Steroids**, v. 68, p. 771–778, 2003.

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

DeFRANCO, B.D. Navigating Steroid Hormone Receptors through the Nuclear Compartment. **Molecular Endocrinology**, v.16, p.1449–1455, 2002.

DeMAYO, F.J. et al. Mechanisms of Action of Estrogen and Progesterone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p.48-59, 2002.

DONADEU, F.X.; WATSON, E.D. Seasonal changes in ovarian activity: Lessons learnt from the horse. **Animal Reproduction Science**, v.100, p.225–242, 2007.

ENMARK, E. et al. Human Estrogen Receptor β -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.82, p. 4258-4265, 1997.

GEISERT, R.D.; BRENNER, R.M.; MOFFATT, R.J.; HARNEY, J.P.; YELLIN, T.; BAZER, F.W. Changes in Oestrogen Receptor Protein, mRNA Expression and Localization in the Endometrium of Cyclic and Pregnant Gilts. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, p. 247-260, 1993.

GINTHER, O.J. et al. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p.144–150, 2006.

GINTHER, O.J. et al. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 213–220, 2007.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects**. 2^a ed. Editora Cross Plains WI: Equiservices, 1992.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Seasonal influence on equine follicle dynamics. **Animal Reproduction**, v.1, p. 31-44, 2004.

GIORGI, E.P. The Transport of Steroid Hormones into Animal Cells. **International Review of Cytology**, v. 65, p.49-111, 1980.

GRAHAM, J.D.; CLARKE, C.L. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. **Endocrine Reviews**, V. 18, P. 502-519, 1997.

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

GRIMM, S.L.; HARTIG, S.M.; EDWARDS, D.P. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, p. 3831–3849, 2016.

HANUKOGLU, I. Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 8, pp. 779–804, 1992.

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, p. 241–250, 2005.

HINRICHS, K. et al. Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. 3, p.74–75, 1985.

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

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

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

KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; GINTHER, O.J. Role of progesterone in mobility, fixation, orientation and survival of the equine embryonic vesicle. **Theriogenology**, v. 27, p.655–663, 1987.

KIMMINS S.; MacLAREN, L. A. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. **Placenta**, v. 22, p. 742–748, 2001.

KING, S.S. **Autumnal Transition Out of the Breeding Season**. In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA W.E.; VARNER, D.D. Equine Reproduction. 2^a Ed. Blackwell Publishing, 2011, cap.181, p.1732–1753.

KUIPER, G. G. J. M. et al. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 5925–5930, 1996.

KUIPER, G.G.J.M. et al. Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β . **Endocrinology**, v.138, 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, p. 107-110, 1993.

LANE, P.H. Estrogen Receptors in the Kidney: Lessons from Genetically Altered Mice. **Gender Medicine**, v. 5, suppl. A, 2008.

LEE, H.R.; KIM, T.H.; CHOI, K.C. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse. **Laboratory Animal Research**, v.28, p.71-76, 2012.

MATSUZAKI, S. et al. Oestrogen receptor α and β mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Molecular Human Reproduction**, v.5, p. 559–564, 1999.

McCUE, P.M., SCOGGIN, F.C, LINDHOLMIN, A.R.G. **Estrus** In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA W.E.; VARNER, D.D. Equine Reproduction. 2^a Ed. Blackwell Publishing, 2011, cap.179, p.1716-1727.

McDONNELL, D.P. et al. The human progesterone receptor A-form functions as a transcriptional modulator of mineralocorticoid receptor transcriptional activity. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.48, n^a 5/6, p. 425-432, 1994.

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, p. 135-142, 1999.

McKINNON, A.O. et al. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipient and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. **Theriogenology**, v.29, p.1055-63, 1988.

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, p.5503–5512, 2006.

MURPHY, B.D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.223-230, 2012.

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

NEQUIN, L.G. et al. Uncoupling of the equine reproductive axes during transition into anoestrus. **Journal Reproduction and Fertility**, v.56, p.153–161, 2000.

NISWENDER, G.D. et al. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, p.1-29, 2000.

NORMAN, A.W.; HENRY, H.L. **Steroid Hormones: Chemistry, Biosynthesis, and Metabolism**. In: NORMAN, A.W.; HENRY, H.L. Hormones. 3^a Ed. Elsevier Publishing, 2015, cap.2, p.27-53.

PINTO, C.R.F. **Progestagens and Progesterone**. In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA W.E.; VARNER, D.D. Equine Reproduction. 2^a Ed. Blackwell Publishing, 2011, chap.189, pg.1811-1817.

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, p.91-95, 2004.

SCHUCHARD, M. et al. Steroid Hormone Regulation of Nuclear Proto-oncogenes. **Endocrine Reviews**, v. 14, p. 659-669, 1993.

SCHWARTZ, N. et al. Rapid steroid hormone actions via membrane receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1863, p. 2289–2298, 2016.

SHARP, D.C. **Vernal Transition into the Breeding Season**. In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA W.E.; VARNER, D.D. Equine Reproduction. 2^o Ed. Blackwell Publishing, 2011, cap.178, p.1704-1715.

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

SILVA, E.S.M. et al. 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, p.169 - 181, 2014b.

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

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

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, p. 1527-1543, 1995.

SQUIRES, E.L.; GINTHER, O.J. Follicular and luteal development in pregnant mares. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.23, p. 429-433, 1975.

THORBURN, G.D. A speculative view of parturition in the mare. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.14, p.41-49, 1993.

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

WADA-HIRAIKE, O.W. et al. Role of estrogen receptor β in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor $\beta^{-/-}$ mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.48, p. 18350-18355, 2006.

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

WEEDMAN, B.J. et al. Comparison of circulating estradiol-17 β and folliculogenesis during the breeding season, autumn transition and anestrus in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 13, n. 9, 1993.

WEISER, M.J.; FORADORI, C.D.; HANDA, R.J. Estrogen receptor beta in the brain: From form to function. **Brain Research Reviews**, v. 57, p.309-320, 2008.

WEN, D.X. et al. The A and B Isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. **Molecular and Cellular Biology**, p. 8356-8364, 1994.

WU, W.X. et al. 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, p. 762-768, 1996.

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, p.403-411, 1979.

Capítulo 2

O artigo a seguir foi redigido de acordo com as normas do periódico científico Theriogenology: <https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691x/guide-for-authors>

Administração de progesterona em éguas acíclicas: efeitos na expressão dos receptores endometriais de estrógeno e progesterona

L.F.S. Maciel^a, E.S.M.Silva^b, J.P.Oliveira-Filho^a, S.C.Fritsch^a, R.S.Rossi^a, J.A.C. Lourenção^a, C.Meira^a.

^aFaculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu-SP

^bCentro Universitário do Triângulo - UNITRI, Uberlândia-MG.

RESUMO

A progesterona (P4) é frequentemente utilizada, após a administração de estradiol, para preparo de éguas acíclicas sazonais (anestro ou transição) como receptoras de embrião, entretanto estudos anteriores relatam gestação de éguas acíclicas sazonais tratadas somente com P4. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão gênica e proteica dos receptores de estrógeno alfa (ER α), estrógeno beta (ER β) e progesterona (PR) no endométrio de éguas acíclicas sazonais tratadas com progesterona de longa ação (P4LA). Foram utilizadas oito éguas durante a fase de anestro sazonal, nas quais foram realizadas biópsias uterinas imediatamente antes e cinco dias após a administração de 1,5 g de P4LA. Coletas de sangue foram realizadas diariamente para dosagem da concentração plasmática de P4. Para avaliação da expressão proteica dos receptores foi realizada a técnica de imunoistoquímica (IHQ) e o percentual da área imunomarcada foi determinado pelo *software* de análise de imagens ImageJ. As abundâncias dos transcritos para ER α (ESR1), ER β (ESR2) e PR (PGR) foram determinadas por RT-qPCR. Os ER α apresentaram maior expressão proteica ($p < 0,05$) após a administração de P4LA, porém não houve alteração da abundância dos mRNA que codificam esse gene ($p > 0,05$). Quanto aos ER β , foi observada tendência a menor expressão proteica ($p = 0,07$) e inibição da expressão gênica ($p < 0,05$) após o tratamento, já os PR não apresentaram alteração ($p > 0,05$). A concentração plasmática de P4 apresentou maior concentração 24 horas após a aplicação de P4LA (D1) com posterior declínio desses valores ($p < 0,05$). A dose de 1,5 g de

P4LA atingiu as concentrações mínimas de P4 necessárias para o estabelecimento e manutenção da gestação.

Palavras-chave: Equinos, anestro, protocolos hormonais.

1.Introdução

As éguas são poliétricas estacionais de dias longos, ou seja, apresentam máxima atividade ovariana na primavera e verão. No inverno essa atividade é reduzida, caracterizando a fase de anestro sazonal [1]. O início da estação reprodutiva na primavera depende de diversos fatores fisiológicos e ambientais, tais como idade, raça, condição corporal e principalmente o fotoperíodo [2,3]. Porém, a baixa oferta de alimentos durante o período de transição (inverno-primavera) e o manejo diferenciado entre doadoras e receptoras faz com que as doadoras iniciem a atividade cíclica mais cedo na estação reprodutiva enquanto as receptoras continuam em anestro [4]. Dessa forma, existe um reduzido número de receptoras cíclicas disponíveis nessa fase. Para se estabelecer a gestação em receptoras acíclicas sazonais (anestro ou transição), atualmente utilizam-se estrógenos seguidos de progestágenos na maioria dos protocolos hormonais, uma vez que foi demonstrado que o estrógeno estimula o aumento dos receptores para estrógeno e progesterona (P4) no endométrio de éguas cíclicas [5,6].

Os progestágenos são aplicados nas éguas receptoras acíclicas sazonais ou ovariectomizadas utilizadas em programas de transferência de embrião (TE) em equinos a fim de estabelecer e manter a gestação [7,8,9,10,11,12]. A utilização de produtos progestacionais (naturais ou sintéticos) possibilita a indução de mudanças endometriais similares as que ocorrem nas éguas após a ovulação, viabilizando o uso de éguas acíclicas sazonais como receptoras de embriões [13].

Nos anos 80, foram utilizadas éguas acíclicas ovariectomizadas como receptoras. Os autores realizaram ovariectomias, no mínimo, três semanas antes da transferência de embriões, com objetivo de reduzir o manejo com rufiações e palpações transretais, normalmente realizados em receptoras cíclicas [7,8,9]. Apenas os progestágenos foram utilizados para o preparo de receptoras acíclicas ovariectomizadas, o tratamento foi realizado com 300 mg

de altrenogest (progestágeno sintético), diariamente, cinco dias antes da TE e resultou em uma taxa de prenhez de 75% (3 gestações de 4 transferências) [7]. Em outro estudo foi testada a eficácia de diferentes doses dos progestágenos, os animais receberam 22 mg e 66 mg de altrenogest e 300 mg de P4 oleosa, diariamente por cinco a seis dias antes da TE. As taxas de prenhez obtidas foram 16% (1/6), 33%(2/6) e 40% (2/5), respectivamente [8] Os autores afirmam que uma baixa dose (22mg) do progestágeno pode não ser suficiente para preparação do ambiente uterino para receber o embrião [8].

O tratamento com estradiol (E2) por diferentes períodos associado a P4 também foi utilizado para o preparo de éguas receptoras ovariectomizadas [11]. No primeiro tratamento administrou-se E2 três a cinco dias até a ovulação da doadora e 300 mg de P4 injetável diariamente após ovulação da doadora. O segundo tratamento foi similar ao primeiro, porém a aplicação de E2 foi contínua até o dia 20 após ovulação da doadora. E o terceiro protocolo também foi similar ao primeiro, porém com uma dose de 0,044 mg/kg de altrenogest. As taxas de prenhez encontradas foram semelhantes às descritas em estudos que utilizaram somente progestágenos [7], com variação de 70 a 80% entre os grupos (7/10, 8/10, 14/20). Porém, um fato interessante é que a dose de 0,044 mg/kg de altrenogest utilizada em um animal com peso de 500 kg [11], equivale a 22 mg do progestágeno, dose considerada baixa em estudos anteriores [8]. Assim, pode ser que o período de tratamento com E2 não seja a condição primordial para iniciar e manter a gestação, mas a administração prévia de E2 tenha influência na preparação do útero para receber o embrião.

O uso de receptoras acíclicas sazonais dispensa a realização de cirurgia, tornando-se uma opção vantajosa. Tanto éguas ovariectomizadas, quanto acíclicas sazonais, podem ser utilizadas com sucesso como receptoras de embriões [12]. Em estudos com éguas acíclicas sazonais em transição de primavera, foram encontradas taxas de gestação similares a de cíclicas, administrando somente altrenogest (Regumate®, 0,044 mg/Kg) diariamente por cinco a sete dias antes da TE e mantidos até os 120 dias de gestação [10]. Possivelmente, no período de transição de primavera as éguas já apresentavam concentrações mínimas de estrógeno, suficientes para estimular a expressão dos receptores endometriais de estrógeno e P4.

Há relatos do estabelecimento da gestação em receptoras acíclicas sazonais tratadas com a P4, porém não foi relatado o efeito somente desse hormônio sobre a expressão gênica e proteica dos receptores endometriais de estrógeno e P4. Ao contrário do estrógeno, a P4 secretada pelo corpo lúteo após a ovulação inibe a expressão proteica dos receptores endometriais de estrógeno e P4 durante o diestro. E nos primeiros dias de gestação observa-se também uma menor expressão proteica dos PR, principalmente no epitélio luminal e glandular [14]. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da administração de P4 sobre a expressão gênica e proteica dos receptores endometriais de estrógeno e P4 de éguas acíclicas sazonais e avaliar o perfil da concentração plasmática de P4 após o tratamento.

2. Material e métodos

2.1 Animais e grupo experimental

Foram utilizadas oito éguas mestiças, entre quatro e quinze anos de idade, em anestro sazonal, sem alterações degenerativas e/ou inflamatórias no endométrio, previamente avaliadas por citologia e biópsias uterinas. Foram consideradas éguas em anestro aquelas avaliadas no período de menor luminosidade do ano (solstício de inverno) que apresentaram folículos com diâmetro menor que 15 mm, ausência de corpo lúteo (CL) e concentração plasmática de P4 menor que 1ng/mL em três avaliações consecutivas com intervalo de sete dias. Os animais foram selecionados de acordo com avaliações histológicas de inflamação e fibrose endometrial [15], sendo incluídas apenas as éguas classificadas como grau I (endométrio normal) ou IIA (Inflamação leve e /ou fibrose). As éguas foram mantidas em feno coast-cross (*Cynodon dactylon*) com água e sal mineral *ad libitum*. O experimento foi conduzido durante o mês de Julho no Centro de biotecnologia em reprodução eqüina (CERBEC)- Fazenda Lageado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu-São Paulo, Brasil. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Unesp-Botucatu, protocolo número 100/2016.

2.2 Tratamento hormonal, coleta de sangue e dosagem de progesterona

Os animais foram avaliados imediatamente antes (D0) e cinco dias após (D5) o tratamento com 1,5 g de P4 longa ação (P4LA, Sincrogest®-Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil).

Coletas de sangue foram realizadas diariamente por venopunção da jugular, do D0 ao D5 para dosagem da concentração plasmática de P4. As amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados, centrifugadas a 600g por 10 minutos para obtenção de plasma e armazenadas a -20°C até o ensaio hormonal.

A concentração plasmática de P4 foi determinada por radioimunoensaio (RIA) utilizando kit comercial (RIA Progesterone, Beckman Coulter, Brea, California, USA), seguindo a orientação do fabricante. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 13,4%.

2.3 Biópsias uterinas

Com o auxílio de pinças de biópsia uterina (Botupharma®, Botucatu, SP, Brasil), amostras foram colhidas imediatamente antes da aplicação da P4LA (D0) e no D5. Cada fragmento foi dividido em duas partes, sendo um acondicionado em formol tamponado 10% para realização de imunoistoquímica (IHQ) e outro em nitrogênio líquido para avaliação por RT-qPCR.

2.4 Imunoistoquímica

Os fragmentos uterinos foram fixados em formol tamponado 10% por 24 horas e posteriormente mantidos em álcool 70% até o momento do processamento. As amostras foram incluídas em parafina e cortadas em secções de 4 µm. As secções de parafina foram desparafinizadas e reidratadas em diluições seriadas de xilol e álcool. Para recuperação antigênica as lâminas foram colocadas por 30 minutos em solução de citrato pH 6. As peroxidases endógenas foram inibidas utilizando 8% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em metanol por 20 minutos. Em seguida, incubadas em leite em pó desnatado por 1 hora a 27°C, para minimizar anticorpos de ligação inespecíficos. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para PR (diluição - 1:100, mouse monoclonal PR-2C5, Invitrogen), ERα (diluição - 1:100, mouse monoclonal SC-311, Santa Cruz Biotechnology) e ERβ (diluição 1:100, mouse

monoclonal PPG5-10, Abcam) por 18 horas. Posteriormente o material foi incubado com anticorpo secundário (N-Histofine Simple Stain® - Nichirei Biosciences Inc.) por 30 minutos a 27°C, lavado em solução tampão pH 7,4 e revelado com cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina - Liquid DAB Cromogen® – Dako – USA) por 3 minutos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer por 1 minuto e 20 segundos, lavadas em água corrente por 5 minutos, desidratadas em álcool e xilol e montadas.

2.5 Quantificação da área imunomarcada e imunolocalização

A quantificação da imunomarcagem foi realizada utilizando o software de processamento de imagem ImageJ (Wayne Rasband no National Institute of Mental Health, USA). O ImageJ utiliza um algoritmo para calcular as áreas imunomarcadas pelo cromógeno DAB, baseado na absorção vermelho-verde-azul (RGB) específica para a imunomarcagem avaliada, o que gera um valor correspondente à quantidade de antígeno ligado ao cromógeno [16,17].

As imagens foram obtidas por meio do fotomicroscópio (Zeiss Axio II, Carl Zeiss MicroImaging, Alemanha) utilizando o aumento de 400x. Foram avaliadas cinco secções de cada lâmina de cada animal em cada momento (D0 e D5). O valor da área imunomarcada foi obtido pela divisão do valor da área selecionada pela área total de cada secção. A média obtida das cinco mensurações encontradas foi transformada em porcentagem, resultando no percentual da área marcada. A partir dessas imagens também foi avaliada a imunolocalização dos ER α , ER β e PR nos epitélios glandular e luminal e estroma uterinos.

2.5. Expressão dos genes ESR1, ESR2 e PGR por RT-PCR em tempo real

O RNA foi extraído utilizando Trizol (Trizol® Reagent, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), seguindo recomendações do fabricante, e diluído em 40 μ L de água livre de RNase. Uma amostra de 1 μ L RNA foi testada para pureza (A260/280) e a concentração por espectrofotometria (NanoDrop ND1000®). As amostras de RNA foram tratadas com RNase-free DNase I (Ambion®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) por 30 min a 37° C, seguido do tratamento com o reagente DNase Inactivation (temperatura ambiente por 2 min). A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria e as amostras

tratadas foram normalizadas com água livre de endonucleases. A síntese do cDNA foi realizada com 2400 ng do total de RNA por 40 µL de reação utilizando hexâmeros aleatórios e o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Primers específicos para receptores de estrogênio alfa (ESR1), estrogênio beta (ESR2), progesterona (PGR), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH) e beta-2-microglobulina (B2M), foram selecionados com base em *primers* previamente validados para endométrio de égua [18,19]. A eficiência dos *primers* variou de 93,8% a 99,3% (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências de primers e número de acesso ao gene utilizado para transcrição dos receptores de estrogênio alfa (ESR1), estrogênio beta (ESR2), progesterona (PGR), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH) e beta-2-microglobulina (B2M).

Gene	Número de acesso	Sequência do primer (5'-3')	Tamanho do produto (bp)
ERS1 ¹	NM 001081772	Forward: TCCATGGAGCACCCAGGAAAC Reverse: CGGAGCCGAGATGACGTAGCC	125
ERS2 ¹	XM 001915519	Forward: TCCTGAATGCTGTGACCGAC Reverse: GTGCCTGACGTGAGAAAGGA	116
PGR ¹	XM 001498494	Forward: CTTCCCCGACTGCGCGTACC Reverse: TTGTGTGGCTGGAAGTCGCCG	81
GADPH ¹	NM_00116381	Forward: AGAAGGAGAAAGGCCCTCAG Reverse: GGAAACTGTGGAGGTCAGGA	87
B2M ²	NM_00108252	Forward: GTGTTCCGAAGGTTTCAGGTT Reverse: ATTTCAATCTCAGGCGGATG	102

¹ *Primers* validados para endométrio de égua de acordo com Silva et al.(2014).

² *Primers* validados para endométrio de égua de acordo com Klein et al.(2011).

As reações de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas em duplicatas, utilizando volume final de 20 µL, sendo 2 µL de cDNA; 10 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA); 1 µL de cada *primer* (forward e reverse); e água livre de endonuclease q.s.p. A RT-qPCR foi realizada no 7500 fast Real Time PCR systems (Applied Biosystems®), com as seguintes condições de termociclagem: 10 min a 95°C (desnaturação inicial) seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (anelamento/extensão).

As alterações na expressão dos genes foram calculadas pela média do ciclo de quantificação (Ct) e em seguida normalizadas para o gene endógeno de referência B2M, gene mais estável, para gerar valores delta Ct (Δ Ct). O GAPDH também foi utilizado como gene endógeno de referência, mas em nossas condições experimentais o B2M foi o gene mais estável como demonstrado pelos resultados do *software* NormFinder (B2M= 0.372; GAPDH=0.458).

2.6. Análise estatística

Foi utilizado o teste de postos sinalizados de Wilcoxon para comparar a porcentagem da área imunomarcada no ImageJ e os valores de Δ Ct entre os momentos (D0 e D5) para os ER α , ER β e PR. Estatísticas descritivas foram geradas para avaliação da concentração de progesterona ao longo dos momentos, antes e após a administração de P4LA (D0= 0h, D1=24h, D2=48h, D3=72h, D4=96h, D5=120h). Um modelo de medidas repetidas para dados não paramétricos (teste de Friedman) foi utilizado para comparar a concentração de progesterona entre os momentos antes (D0) e após (D5) a sua administração. Todas as variáveis foram transformadas em log para análise. Os dados foram apresentados como médias geométricas com intervalos de confiança para demonstrar valores na escala original. As análises foram realizadas em GraphPad 5 (GraphPad Software, 2014) com nível de significância de 0,05.

3. Resultados

3.1 Quantificação da área imunomarcada e imunolocalização

Os ER α apresentaram maior expressão proteica após o tratamento com P4 ($p<0,05$), já os ER β apresentaram tendência a menor marcação ($p=0,07$) (Figuras 1 a e b, respectivamente). Quanto aos PR, não foi observada variação nos diferentes momentos ($p>0,05$; Figura 1 c). Os ER α e ER β apresentaram menor imunomarcagem nas células do estroma uterino quando comparados aos epitélios luminal e glandular, antes (Figuras 2a e 2c, respectivamente) e cinco dias após o tratamento com P4LA (Figuras 2b e 2d, respectivamente). Já os

PR apresentaram imunomarcação em todos os tipos celulares, sem alteração após a aplicação de P4LA (Figuras 2e e 2f).

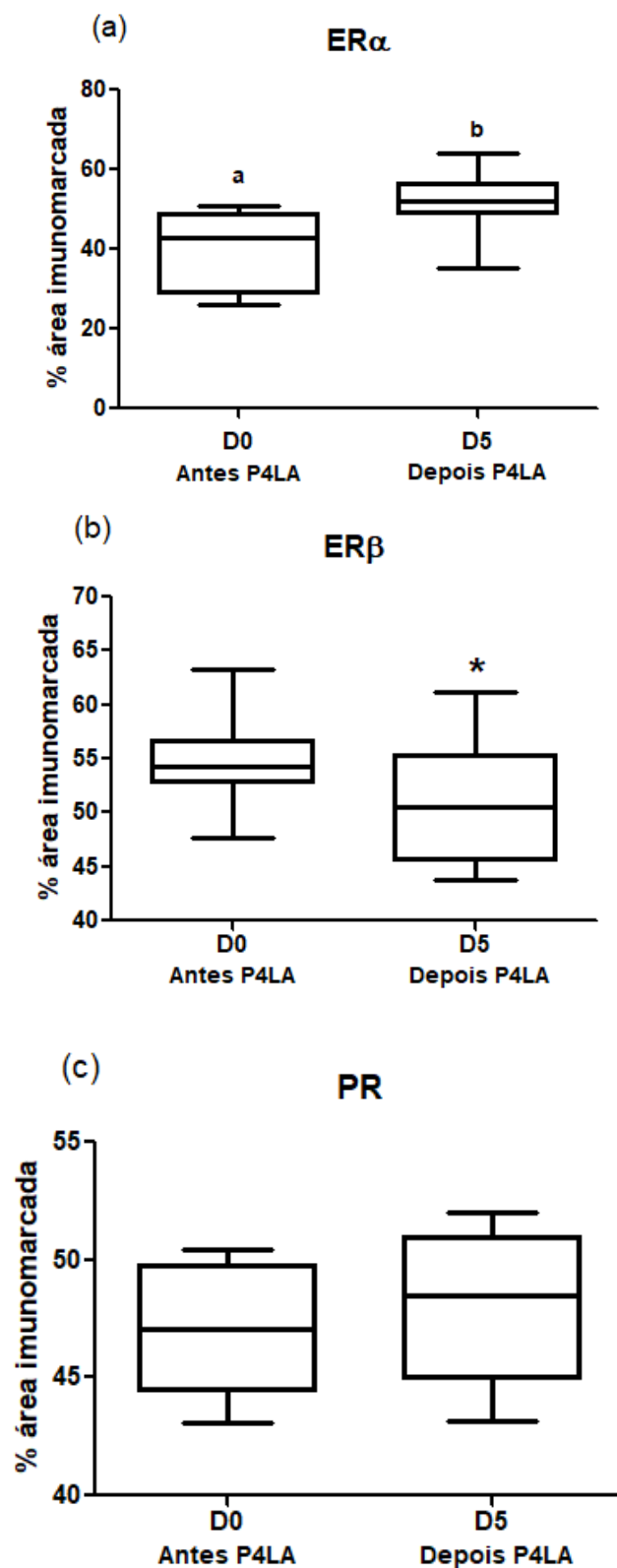


Figura 1. Alterações observadas na análise de imagens pelo *software* ImageJ nos dias relativos ao tratamento com P4LA, por meio da porcentagem da área imunomarcada dos ER α (a), ER β (b) e PR (c) antes a administração de 1,5 g de P4LA (D0) e cinco dias após (D5). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). (*) indica tendência ($p < 0,1$).

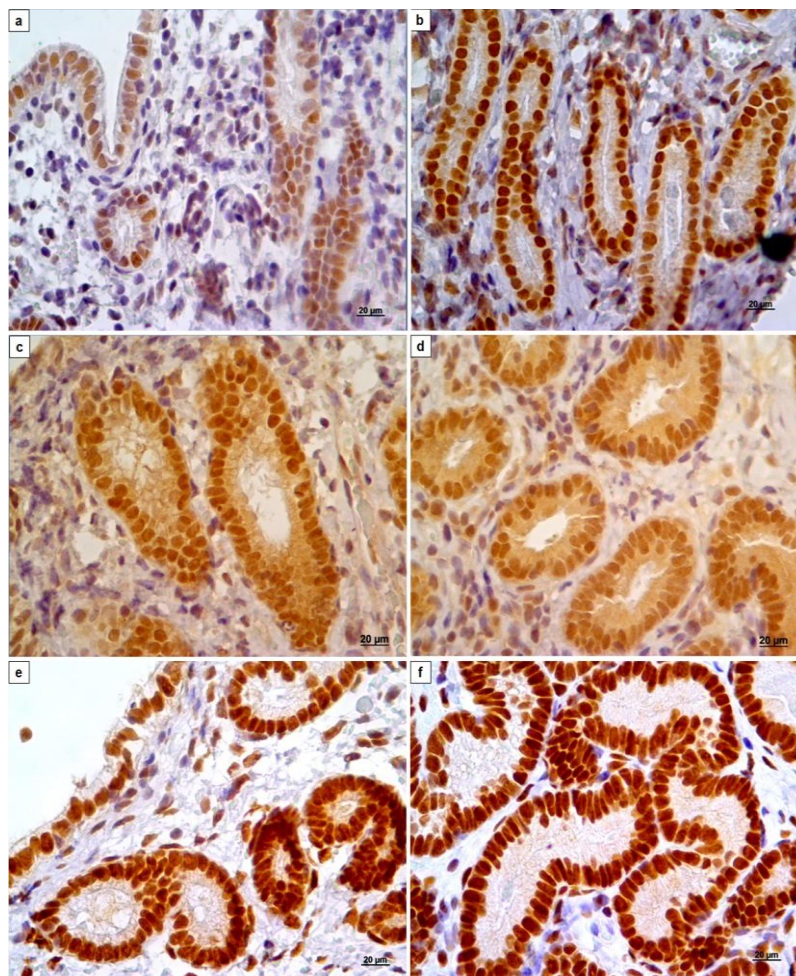


Figura 2. Imagens representativas da imunolocalização dos ER α (a,b), ER β (c,d) e PR (e,f) no endométrio equino. As figuras a,c,e mostram a localização das imunomarcações antes da administração de 1,5g de P4LA e as figuras b,d,f cinco dias após o tratamento. Barra de escala=20 μ m

3.2 Mudanças na abundância dos transcritos para ER α , ER β e PR.

Após o tratamento com P4LA, não foram observadas alterações na abundância dos transcritos para ER α e PR ($p>0,05$) (Figuras 3 a e c, respectivamente). Vale ressaltar que quatro dos oito animais utilizados apresentaram aumento da expressão do gene ESR1 no D5, porém devido ao baixo número de animais utilizados, não houve diferença estatística. Em relação ao ESR2, foi observada menor expressão gênica após a administração de P4LA ($p<0,05$) (Figura 3 b).

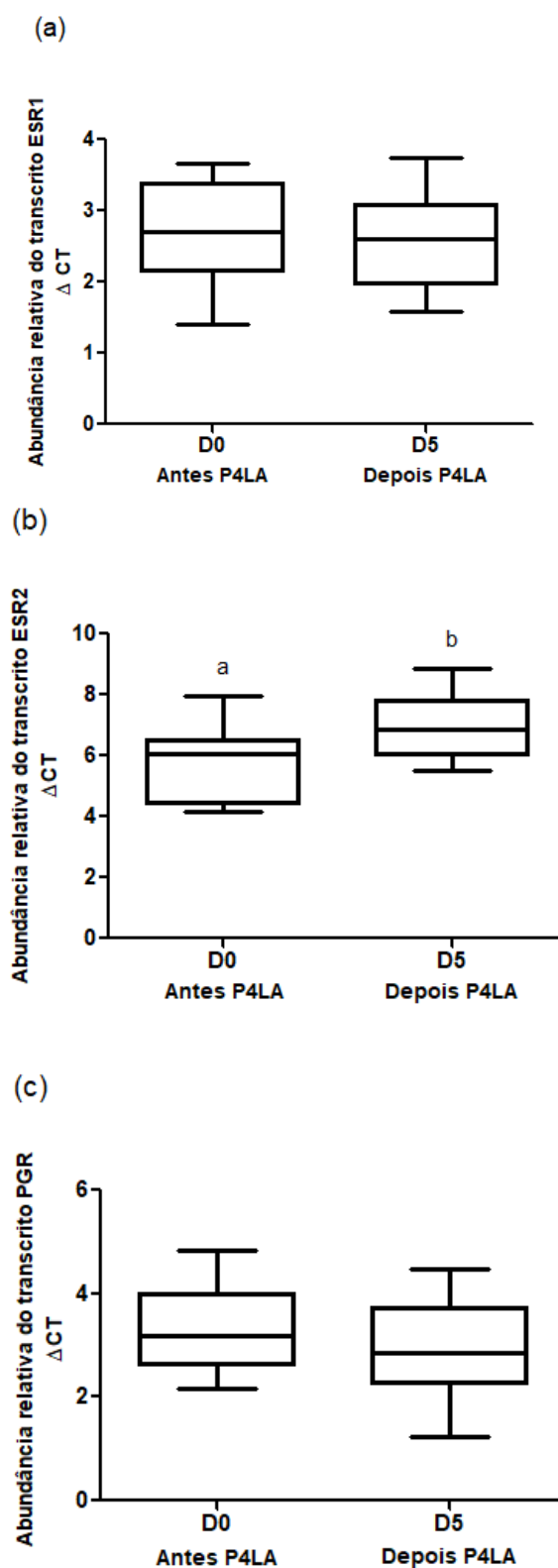


Figura 3. Mudanças relativas na abundância dos transcritos para ESR1 (a), ESR2 (b) e PGR (c) antes da administração de 1,5g de P4LA (D0) e cinco dias após (D5). Dados expressos como a mediana do ΔCT em relação à expressão do gene de referência (B2M). Menores valores de ΔCT representam maior expressão dos mRNA dos genes escolhidos (ESR1, ESR2 e PGR). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

3.3 Concentrações plasmáticas de progesterona

Níveis máximos de P4 foram observados 24 horas após a administração de P4LA (D1), com decréscimo gradual cinco dias após o tratamento (D5). Houve diferença estatística entre os momentos D1 e D5 ($p<0,05$), representados na figura 4.

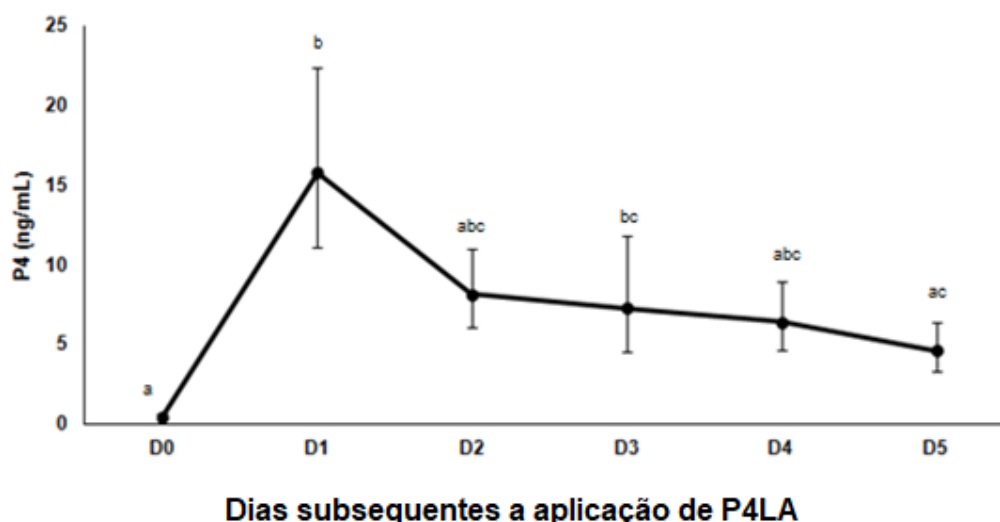


Figura 4. Concentrações plasmáticas de progesterona antes da administração de P4LA (D0) e nos momentos subsequentes: D1=24h, D2=48h, D3=72h, D4=96h e D5=120h. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).

4. Discussão

No presente trabalho foram observadas alterações na imunomarcacão dos ER α após o tratamento com P4LA, similares ao descrito em estudos que utilizaram estrógeno seguido de P4 em éguas acíclicas sazonais [20], que observaram aumento da imunomarcacão dos ER α cinco dias após o tratamento com P4LA. Entretanto os resultados encontrados diferem dos observados em éguas cíclicas no diestro [14, 19, 21]. Éguas cíclicas apresentam alta expressão gênica e proteica dos ER durante o estro, momento em que os níveis de estrógeno são altos, porém no início e meio do diestro há uma redução da expressão gênica e proteica desse receptor, em decorrência dos crescentes níveis de P4 [14, 19, 21, 22].

Acreditamos que as alterações observadas no percentual da área imunomarcada do ER α esteja relacionada ao perfil plasmático de P4 encontrado. Éguas em diestro apresentam máxima concentração de P4 entre o 6^a e 8^a dias após a ovulação e se mantém elevada até o início da luteólise [23,24]. As concentrações de P4 chegam a 12 a 14 ng/mL [23,24] e por isso há inibição da expressão proteica dos ER e PR [14, 19,20, 21,22].

No presente trabalho foi observado um pico na concentração de P4, 24 horas após a administração de P4LA com diminuição gradual cinco dias após o tratamento. As altas concentrações de P4 podem justificar a menor porcentagem de área imunomarcada dos ER β após o tratamento com P4, mas, possivelmente, a concentração plasmática de P4 no D5 não foi suficiente para inibir a expressão proteica dos ER α . Estudos em ratas relatam que a expressão proteica do ER α pode ser dependente de P4, já que tal receptor foi considerado regulável no epitélio glandular após o tratamento com estrógeno seguido de P4 [25]. E, apesar de apresentarem homologia estrutural, principalmente na região de ligação ao DNA, os ER α e ER β podem apresentar estabilidade diferencial do mRNA e/ou da proteína e por isso podem ser observadas diferenças entre a expressão gênica e proteica destas isoformas [26]. Em humanos foram observadas diferenças na expressão proteica desses receptores em diversos tecidos, como, placenta, próstata e tecido mamário íntegro e com células cancerosas [26, 27,28], assim, como observado no presente trabalho no qual encontramos diferenças na expressão proteica dos ER α e ER β após o tratamento com P4LA. Diferente do observado nos ER α e ER β , a expressão proteica dos PR após o tratamento com P4LA não apresentou alterações, semelhante ao descrito em vacas ovariectomizadas tratadas com dispositivo intravaginal de P4 (1,9 g de P4, PRID) por 12 dias e ovelhas ovariectomizadas tratadas com esponja intravaginal de P4 (0,3 g de P4, Carter Holt Harvey Plastic Products) por 10 dias [30,31].

Os ER apresentam forte imunomarcagem nos epitélios luminal, glandular e de forte a moderada no estroma durante o estro [14,21,22]. Já no diestro há uma menor marcação no estroma [22], assim como observamos antes e após o tratamento com P4LA. Em éguas acíclicas tratadas com 2,5 g de benzoato de estradiol seguido de uma única aplicação de 1,5 g de P4LA, foi observado um aumento da imunomarcagem dos ER após a administração de P4LA

principalmente no citoplasma das glândulas endometriais [20]. Já em vacas ovariectomizadas tratadas somente com dispositivo intravaginal de P4 por 12 dias (1,9 g P4, PRID), os ER apresentaram fraca marcação nas células do estroma após o tratamento [30]. Os PR apresentam forte marcação em todos os tipos celulares durante o estro [14, 19]. Durante o diestro foi relatada uma diminuição na imunomarcação apenas nas células do estroma [22], o que não foi observado em éguas tratadas com estrógeno seguido de P4 [20] e no presente trabalho.

Durante o estro de diversas espécies [14, 19,22, 32] observa-se um aumento na abundância dos mRNAs que codificam os ER e PR, uma vez que foi demonstrado que o estrógeno estimula a expressão desses receptores [6,22]. A P4, por sua vez inibe a expressão gênica dos ER e de seus próprios receptores [14,21,22], como observado no presente trabalho, no qual houve inibição da expressão gênica dos ESR2. Porém, a expressão gênica dos ESR2 ainda é pouco entendida. Em éguas acíclicas tratadas com estrógeno seguido de P4 houve uma diminuição na abundância dos transcritos para esse gene após a aplicação de benzoato de estradiol e a administração de P4 não afetou sua expressão [20]. Sabe-se que a administração de P4 pode não alterar a expressão gênica dos ER e PR, como descrito em vacas e ovelhas ovariectomizadas tratadas com dispositivos intravaginais de P4 [30,31] e observado na abundância dos mRNA para os genes ESR1 e PGR neste trabalho.

A taxa de produção celular dos mRNAs pode ser inferior a de proteínas, geralmente uma célula de mamífero produz duas cópias de mRNA por hora, enquanto produz dez cópias de proteínas correspondentes ao mRNA na mesma fração de tempo [33,34]. Além disso, os mRNAs são mais instáveis do que as proteínas, são rapidamente metabolizados, já que apresentam meia vida mais curta de, aproximadamente, 2.6 a 7 horas, enquanto as proteínas apresentam em torno de 46 horas [33,34]. Possivelmente, o mRNA para o gene ESR1 tenha sido metabolizado antes da proteína do ER α , visto que foram observados diferenças na expressão gênica e proteica desse receptor.

É possível que outros fatores estejam envolvidos na expressão gênica e proteica dos ER e PR, não só os níveis circulantes de estrógeno e P4 [5]. Uma vez que, observamos a expressão proteica dos ER e PR antes da

administração de P4LA, semelhante ao descrito em éguas em anestro [5,20] e vacas ovariectomizadas [30], o que pode indicar a possibilidade de uma regulação parácrina da expressão desses receptores [5] ou que a ausência de *down regulation*, devido às baixas concentrações hormonais observadas no anestro, não é suficiente para inibir a expressão proteica desses receptores.

A dose de 1,5 g de P4LA pode ser considerada suficiente para manter a gestação em éguas acíclicas sazonais utilizadas como receptoras de embrião, já que tal dose fornece concentrações plasmáticas de P4 semelhantes ao observado em éguas cíclicas durante o diestro [35,36], embora o perfil hormonal seja diferente. Sabe-se que concentrações plasmáticas mínimas de 2,5 ng/mL [36] a 4 ng/mL [37] de P4 são suficientes para manter a gestação. No presente estudo, os níveis de P4 encontrados no D5, momento em que geralmente realiza-se a transferência de embrião [38,39,40], são suficientes para manutenção da gestação. Em estudos que avaliaram o perfil plasmático de P4 após administração de P4LA em éguas acíclicas, foram obtidas concentrações plasmáticas máximas em torno de 18 ng/mL 24 horas após o tratamento com diminuição gradual cinco dias após o tratamento [20,35]. Assim, é aconselhada a administração de uma nova dose de P4LA no dia da TE, para garantir que os níveis de P4 mantenham-se adequados para o estabelecimento da gestação.

Concluimos, que a dose de 1,5g de P4LA pode ser considerada eficaz em atingir os níveis mínimos de P4 necessários para o estabelecimento e manutenção da gestação cinco dias após o início do tratamento. Estudos complementares são necessários para avaliar as taxas de prenhez após a transferência de embriões utilizando éguas acíclicas sazonais tratadas somente com P4LA.

Referências

- [1] Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Brinsko SP, Rigby SL. Manual of Equine Reproduction. 3ª Ed ,Mosby, Elsevier, 2003.
- [2] Ginther OJ. Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects. Second edition. Cross Plains, WI: Equiservices, 1992.
- [3] Nagy P, Guillaume D, Daels P. Seasonality in mares. Animal Reproduction Science 2000; 60:245-62.
- [4] Silva ESM, Frade SCF, Ignácio FS, Pantoja JCF, Puoli Filho JNP, Meira C. Supplementary corpora lutea monitoring allows progestin treatment interruption on day 70 of in non-cyclic recipient mares. Animal Reproduction Science 2014; 144: 122– 28.
- [5] McDowell KJ, Adams MH, Adam CY, Simpson KS. 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 1999; 117:135-42.
- [6] Zavy MT, Mayer R, Vernon MW, Bazer FW, Sharp DC. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 1979; 27:403-11.
- [7] Hinrichs K, Sertich PL, Cummings MR, Kenney MR. Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer. Equine Veterinary Journal 1985; 3:74-5.
- [8] Hinrichs K, Sertich PL, Kenney RM. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. Theriogenology 1986; 26: 455-60.
- [9] Hinrichs K, Kenney RM. Effect of timing of progesterone administration on pregnancy rate after embryo transfer in ovariectomized mares. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 1987; 35:439-43.
- [10] Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwal DK, McCue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. Theriogenology 2000; 54:965-79.
- [11] McKinnon AO, Squires EL, Carnevale EM, Hermeniet MJ. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipient and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. Theriogenology 1988; 29:1055-63.
- [12] Lagneaux D, Palmer E. Embryo transfer in anoestrous recipient mares: attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. Equine Veterinary Journal 1993; 15:107-10.
- [13] Pinto CRF. Progestagens and Progesterone. Equine Reproduction. Second edition. Blackwell Publishing, 2011.

- [14] Hartt LS, Carling SJ, Joyce MM, Johnson GA, Vanderwall DK, Ott TL. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction* 2005; 130: 241-50.
- [15] Kenney RM, Doig PA. Equine endometrial biopsy. 'Current therapy in theriogenology 2'. Philadelphia: WB Saunders. 1986.
- [16] Sysel AM, Valli VE, Nagle RB, Bauer JA. Immunohistochemical Quantification of the Vitamin B12 Transport Protein (TCII), Cell Surface Receptor (TCII-R) and Ki-67 in Human Tumor Xenografts. *Anticancer Research* 2013;33: 4203-12.
- [17] Vrekoussis T, Chaniotis V, Navrozoglou I, Dousias V, Pavlakis K, Stathopoulos EM, Zoras O. Image Analysis of Breast Cancer Immunohistochemistrystained Sections Using ImageJ: An RGB-based Model. *Anticancer Research* 2009; 29: 4995-98.
- [18] Klein C, Rutlant J, Troedsson MHT. Expression stability of putative reference genes in equine endometrial, testicular and conceptus tissues. *BMC Research Notes* 2011; 4: 120-29.
- [19] Silva ESM, Scoggin KE, Canisso IF, Troedsson MHT, Squires EL, Ball BA. 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* 2014;151:169–81.
- [20] Silva ESM, Ignácio FS, Fritsch SC, Zanoni DS, Pantoja JCF, Oliveira-Filho JP, Meira C. Administration of 2.5 mg of estradiol followed by 1,500 mg of progesterone to anovulatory mares promote similar uterine morphology, hormone concentrations and molecular dynamics to those observed in cyclic mares. *Theriogenology* 2017; 97: 159-69.
- [21] Aupperle H, Özgen S, Schoon HA, Schoon D, Hoppen HO.; Sieme H, Tannapfel A. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equine Veterinary Journal* 2000; 32: 228-32.
- [22] Watson ED, Skolnik SB, Zanecosky HZ. Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. *Theriogenology* 1992; 38: 575-80.
- [23] Ginther OJ, Utt MD, Bergfelt DR, Beg MA. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Animal Reproduction Science* 2006; 95:144–50.
- [24] Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Utt MD, Beg MA. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science* 2007; 99: 213–20.
- [25] Tibbets TO, Mendoza-Meneses M, O'Malley BW, Conneely OM. Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biology of Reproduction* 1998;59:1143-52.

- [26] Scobie GA, Macpherson S, Millar MR, Groome NP, Romana PG, Saunders PTK. Human oestrogen receptors: differential expression of ERalpha and beta and the identification of ERbeta variants. *Steroids* 2002; 67: 985–92.
- [27] Pelletier G, El-Alfy M. Immunocytochemical Localization of Estrogen Receptors α and β in the Human Reproductive Organs. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85: 4835-40.
- [28] Royuela M, Miguel MP, Bethencourt FR, Sánchez-Chapado M, Fraile B, Arenas MI, Paniagua R. Estrogen receptors and in the normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *Journal of Endocrinology* 2001; 168: 447–54.
- [29] Saunders PTK, Millar MR, Williams K, Macpherson S, Bayne C, O'Sullivan C, Anderson TJ, Groome NP, Miller WR. Expression of oestrogen receptor beta (ERb1) protein in human breast cancer biopsies. *British Journal of Cancer* 2002; 86: 250 – 56.
- [30] Kimmins S, MacLAREN LA. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 2001;22:742–48.
- [31] 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* 1996; 55: 762-68.
- [32] Spencer TE, Bazer FW. 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* 1995; 53: 1527-43.
- [33] Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 2011; 473: 337-42.
- [34] Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics* 2013; 13: 227-232.
- [35] Silva ESM, Roser JF, Gomes ARC, Fritsch SC, Pantoja JCF, Oliveira-Filho JP, Meira C. Comparison of different regimens of estradiol benzoate treatments followed by long-acting progesterone to prepare noncycling mares as embryo recipients. *Theriogenology* 2016; 86: 1749–56.
- [36] Douglas RH, Burns PJ, Hershman L. Physiological and commercial parameters for producing progeny for subfertile mares by embryo transfer. *Equine Veterinary Journal Suppl* 1985; 3:111-4.
- [37] Shideler RK, Squires EL, Voss JL, Eikenberry DJ, Pickett BW. Progestagen therapy of ovariectomized pregnant mares. *Journal of reproduction and fertility Suppl* 1982; 32:459-64.

[38] Jasko DJ. Comparison of pregnancy rates following nonsurgical transfer of day 8 equine embryos using various transfer devices. *Theriogenology* 2002;58: 713-15.

[39] McKinnon AO. Breeding and its technology - now and the future. *World Trotting Conf. Papers* 1999.

[40] Squires EL, Carnevale EM, McCue PM, Bruemmer JE. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* 2003; 59:151-70.