

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Sincronização de receptoras no diestro para
utilização em programa de Transferência de
Embriões em equinos**

Renata Tenório Ribeiro de Souza

BOTUCATU – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

RENATA TENÓRIO RIBEIRO DE SOUZA

**Sincronização de receptoras no diestro para utilização em
programa de Transferência de Embriões em equinos**

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para a obtenção do
título de mestre.

Orientador: Prof.Dr. José Antônio Dell'Aqua
Junior

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

Souza, Renata Tenório Ribeiro de.

Sincronização de receptoras no diestro para utilização em programa de
transferência de embriões em equinos / Renata Tenório Ribeiro de Souza. -
Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Antônio Dell'aqua Júnior

Capes: 50504002

1. Equino - Reprodução. 2. Transferência de embriões. 3. Reprodução animal.
4. Hormônios progestacionais.

Palavras-chave: Hôrmônio; Receptoras de embrião; Sincronia uterina;
Transferência de embrião.

Nome do Autor: Renata Tenório Ribeiro de Souza

Título: Sincronização de receptoras no diestro para utilização em programa de Transferência de Embriões em equinos

Botucatu, 19 de Julho de 2013.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Antônio Dell' Aqua Júnior

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Prof. Dr. Marcio Teoro Carmo

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais Fernando Tourinho Ribeiro de Souza e Janete Maria Pereira Tenório, aos meus irmãos Fernanda, Amanda e Fernando. Obrigada pelo amor, apoio sem medir esforços para que esse sonho torna-se realidade .
Dedico a todos !!!!

Se podemos sonhar, também podemos tornar nossos sonhos realidade. (Walt Disney)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar força, coragem, saúde e sabedoria para concretização deste sonho.

Aos meus pais Fernando Tourinho Ribeiro de Souza e Janete M. Pereira Tenório por tanta dedicação, exemplo, amor, pelo sacrifício para concluir uma etapa de minha vida e apoiando todas as minhas decisões.

Aos meus irmãos Fernanda, Amanda, Fernando pelo carinho, apoio e por estarem presentes nos meus dias alegrando sempre!!! Sem esquecer dos meus sobrinhos Antônio e Fernando Neto. Amo sem limites!!!

Ao meu namorado João Guilherme pelo apoio nas horas difíceis e por toda ajuda e paciência sempre que foi necessária! Te amo!

Aos meus familiares que de alguma forma torceram por esse objetivo e que sempre estarão ao meu lado.

Ao Professor José Antônio Dell’acqua Junior pelos ensinamentos, paciência e amizade. Obrigada pela confiança.

A equipe D.A. Vida Equine Reproduction, em especial ao Médico Veterinário Adelcio Barbosa da Silva Júnior (Dr Júnior) com quem eu tive a oportunidade de aprender com seus ensinamentos, pelos incentivos, puxões de orelha que me fez crescer como pessoa e profissionalmente. Muito Obrigada!!

Ao Haras Fábio José por permitir o experimento nos seus animais.

Ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu/SP, em nome de todos os seus professores e funcionários.

A Botupharma, Botucatu-SP por ceder todos os hormônios necessários para realizar este experimento.

Aos amigos, Mariana, Juliana, Carol, Amanda e Renato pelo apoio nas horas mais difíceis, e por poder contar com vocês sempre.

A família Bonfanti em especial a Camila, por ter me acolhido como se na minha casa estivesse, pela confiança sempre dando apoio e incentivando a nova jornada!!!

A todos o meu muito Obrigada!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 – FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL	11
2.2- RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO	13
2.3- SELEÇÃO DE RECEPTORAS DE EMBRIÃO	15
2.4- SINCRONIZAÇÃO ENTRE DOADORA E RECEPTORA DE EMBRIÃO.....	16
2.5- FÁRMACOS UTILIZADOS NA MANIPULAÇÃO DO CICLO ESTRAL DA ÉGUA RECEPTORA DE EMBRIÃO	17
2.5.1- PROTOCOLOS COM UTILIZAÇÃO DE ESTRÓGENOS COM PROGESTERONA E PROGESTÁGENOS	17
3. OBJETIVO.....	19
4. REFÊRENCIAS	20
5. TRABALHO CIENTÍFICO.....	26
NORMAS PARA REVISTA	40

SOUZA, R. T. R., **Sincronização de receptoras no diestro para utilização em programa de Transferência de Embriões em equinos**. Botucatu, 2013. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Vários fatores influenciam no resultado da transferência de embrião (TE) em equinos, sendo que a sincronia entre a doadora e a receptora muitas vezes limita o uso da receptora, pois não há sincronia do ambiente uterino e com o estágio do embrião que será transferido. Éguas doadoras de embriões muitas vezes devido ao manejo distintos das receptoras tendem a apresentar ciclos ovulatórios por mais tempo durante a estação reprodutiva. Atualmente, muitos protocolos e terapias possibilitam uma maior recuperação de embriões por ciclo, mesmo de éguas idosas, dessa forma as receptoras desempenham um importante papel na cadeia da TE. Várias estratégias são utilizadas para maximizar o uso de éguas receptoras e com isso aumentar o número de produtos de TE por estação. Com a intenção de sincronizar ou aumentar o tempo de utilização das receptoras durante a estação de monta, pode-se utilizar progesterona e progestágenos, e estrógenos dessa forma, reduz a relação doadora/receptora, gerando uma redução de custo e tempo, além da utilização de éguas não ciclantes com índices de gestação satisfatórios. O presente estudo teve como objetivo estudar o efeito da utilização do estrógeno e progesterona no diestro para maximizar a utilização de receptoras de embrião. Onde foi observado a taxa de prenhez no grupo diestro de 40%, sendo uma alternativa estratégica em programas de TE quando poucas receptoras estiverem disponíveis.

Palavras-chave: Hormônio, Receptoras de embrião, Sincronia uterina, Transferência de embrião

SOUZA, R. T. R. Synchronization of estrus in the recipient for use in program Embryo transfer in horses, Botucatu 2013. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Several factors influence the outcome of embryo transfer (TE) in horses, and the synchrony between donor and recipient often limits the use of the recipient, because there is no synchronization of the uterine environment and the stage of the embryo to be transferred. Mares embryo donors often due to different handling of the recipients tend to have longer ovulatory cycles during the breeding season. Currently many protocols and therapies enable greater recovery of embryos per cycle, even old mares, so the receivers play an important point in the chain of TE. Several strategies are used to maximize the use of recipient mares and thereby increase the number of products per season TE. With the intention of increasing or synchronize the time of use of the receiver during the breeding season may be mentioned progesterone and progestins, estrogens and thus reduces the ratio donor / recipient, resulting in a reduction of cost and time, besides the use mares with ciclantes not satisfactory pregnancy rates. The present study aimed to study the effect of the use of estrogen and progesterone in diestrus to maximize the use of embryo recipients in TE programs.

Keywords: Embryo transfer, Hormone, Receptor embryo, Sync uterine

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento e desenvolvimento do mercado de equinos no país, a busca por melhores resultados de fertilidade nessa espécie vem gerando um maior interesse pelo desenvolvimento e aprimoramento de Biotecnologias da Reprodução.

É notório o crescimento nos últimos anos do interesse pela transferência de embriões (TE) em equinos. Hoje, quase a totalidade das associações de criadores de cavalo reconhecem os benefícios da técnica, permitindo o uso da TE (ALVARENGA, et al., 2008).

A seleção de éguas aptas a serem utilizadas como receptora continua sendo o maior problema em um programa de TE (DOWSETT e WOODWARD; 1989), pois é esta(s) fêmea(s) que irá reconhecer o embrião e fornecer condições necessárias para o seu desenvolvimento (SOUSA, 2006).

O ambiente uterino se altera marcadamente sobre a influência da progesterona e um embrião exposto a um útero assincrônico pode estar sujeito a fatores de desenvolvimento e níveis hormonais não correspondentes à fase na qual ele se encontra (BARNES, 2000).

Nas éguas a sincronização do estro e da ovulação possui uma maior complexidade, quando comparada com outras fêmeas de animais domésticos. Provavelmente isso ocorre devido a longa fase folicular que possuem e pela dificuldade de adequar o controle do crescimento folicular (DOUGLAS, 1986).

Aumentar o período útil de utilização de receptoras (atualmente é de 3 a 9 dias após-ovulação) é sempre um desafio que possibilita redução de custos da técnica de TE (JASKO, 2002).

A utilização de receptoras em condições naturais antes de 4 dias após a ovulação não tem sido recomendada na literatura, observando-se que, a partir do 9º dia, a taxa de prenhez diminui bastante após a transferência, inviabilizando a utilização a partir deste dia. A relação ideal de 1:1 (para cada doadora uma receptora) se mostra como uma interessante alternativa para o melhor aproveitamento das éguas receptoras diminuindo os altos valores da transferência de embriões possibilitando uma difusão maior da técnica (CAIADO et al., 2007).

A utilização de receptoras acíclicas sincronizadas pela reposição hormonal, apresentam taxas de gestação similares a receptoras ciclantes (DELL'AQUA JR. et al., 2009).

Sendo a hipótese desta pesquisa esta ligada a utilização de dose de 17β estradiol em éguas durante o diestro para uma sensibilização dos receptores uterinos para o estradiol, promovendo uma maior irrigação uterina suficiente para mimetização de um estro “fisiológico” que posteriormente com a administração de progesterona natural estaria apta a receber um embrião com uma condição uterina similar a de uma égua ovulada naturalmente. Assim sendo, pode-se maximizar o uso das receptoras no diestro diminuindo a relação doadora/receptora nos programas de TE em equinos.

Em virtude disso, o presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito da utilização do estrógeno e progesterona em receptoras de embrião na fase de diestro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Fisiologia do ciclo estral da égua

O ciclo estral da espécie equina é uma combinação de eventos fisiológicos que ocorrem entre duas fases, estro e diestro, podendo também denominá-la de fase folicular e fase lútea, sendo regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente os hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas e os esteróides secretados pelos ovários (HAFEZ, 2004).

Os equinos são animais poliéstricos estacionais em dias longo de luz, pois a época reprodutiva ocorre na primavera e no verão. Três são os fatores básicos que explicam o caráter estacional dos ciclos estrais nas éguas: nutrição, fotoperíodo e temperatura (ARRUDA, 1990).

A influência da nutrição sobre o ciclo estral é mais evidente na puberdade e no restabelecimento do ciclo estral após o parto. Os animais ingerindo regimes alimentares saudáveis atingem a puberdade em idade mais precoce do que aqueles privados de alimentação (REECE, 2008).

Demonstrou-se que o fotoperíodo (duração de horas luz por dia) pode afetar a reprodução dos mamíferos. Fotoperíodos longos estimulam, e fotoperíodos curtos

inibem a ocorrência de estro nas espécies que se acasalam na primavera e no verão (HAFEZ, 2004; GINTHER *et al.*, 2005, DAELS, 2006).

Nas éguas, a estacionalidade reprodutiva é bem marcante, apresentando períodos de atividade (estação ovulatória) e inatividade reprodutiva (estação anovulatória, anestro) associados com o comprimento de luz/dia (fotoperíodo), condições climáticas e nutricionais (NAGY *et al.*, 2000).

A melatonina indica a duração do fotoperíodo, resultando em resposta do sistema reprodutivo, que varia de acordo com as espécies e a natureza particular de suas estratégias na estação de monta. As éguas entram em anestro no final do outono, por causa da menor quantidade de luz, e os ciclos ovarianos são restabelecidos quando a luz aumenta (DUKES, 1996).

A variação no fotoperíodo talvez seja o sinal ambiental mais importante e que orienta o eixo hipófise-gônada, uma vez que tratamentos como fotoperíodo artificial estimulam desenvolvimento folicular e o início da estação de monta (HAFEZ, 2004). Em éguas um regime de maior luminosidade cerca de um mês antes do início previsto do anestro deve resultar em atividade ovariana contínua. Caso se deseje restabelecer a ciclicidade ovariana numa égua em anestro de inverno, é necessária uma exposição de, no mínimo, dois meses ao fotoperíodo apropriado (DUKES, 1996).

O estro é induzido pela ação dos hormônios estrógenos, que atuam sobre o sistema nervoso central, causando mudanças gradativas no comportamento sexual da égua. O hormônio folículo estimulante (FSH) liberado atua sobre o folículo primário, provocando o seu desenvolvimento nos ovários. O hormônio luteinizante (LH) começa a atuar em conjunto com o FSH na fase final do processo de maturação folicular, resultando na ovulação dos folículos maduros (ANDRADE, 1986).

A fase de estro ou fase folicular, em éguas, é caracterizada pela presença de um folículo com mais de 25 mm de diâmetro no ovário, onde são produzidos elevados níveis de estrógenos pelas células da granulosa (GINTHER, 1992).

As quantidades crescentes de estradiol secretadas pelos folículos ovarianos induzem o comportamento de estro e a elevação dos níveis de LH pela ativação dos seus receptores na célula da granulosa, consequentemente a ovulação e a formação do corpo lúteo (HAFEZ, 1995; MACHADO, 2004).

A elevação dos níveis de estrógenos durante a fase estral é responsável pela instalação do edema uterino; o qual tende a ser diminuído nos dois dias que antecedem a

ovulação (MCKINNON & CARNEVALE, 1993; BURATINI, 1997; MACHADO, 2004).

A fase de diestro ou luteal é caracterizada pelo término das manifestações dos sinais do cio, que ocorrem entre 24h e 48h após a ovulação, resultando da formação do corpo lúteo (NEELY et al., 1989). Nesta fase, a égua torna-se, geralmente, agressiva na presença do garanhão, sendo o grau de agressividade variável de indivíduo para indivíduo (ANDRADE, 1986).

2.2 - Reconhecimento materno da gestação

Após a perda da zona pelúcida, o concepto equino é circundado por uma cápsula acelular glicoprotéica que se forma quando o embrião entra no útero no dia 5, essa cápsula se forma de secreções uterinas e permanece por diversas semanas, podendo ter um papel importante na migração e na proteção do concepto (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Para o sucesso do reconhecimento e manutenção da prenhez, as secreções uterinas são estimuladas pela migração do concepto, que consiste na única fonte de nutriente no período antes da formação definitiva do corialantóide, cuja sua formação não começa antes dos 45 dias de gestação (McDOWELL et al., 1988; SPENCER et al., 2004). Essas substâncias secretadas pelo útero são essenciais para uma adequada suplementação nutricional durante a fase inicial do desenvolvimento embrionário.

A migração transuterina pode ocorrer de 10 a 13 vezes por dia entre os dias 10 a 16 de gestação, a migração da vesícula para frente e para trás entre os cornos uterinos é essencial para inibir a luteólise na égua, entre os dias 8 e 16 de gestação (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Em éguas, existe uma relação entre a secreção de algumas proteínas pelo endométrio associadas às mudanças hormonais durante o ciclo estral e o início da gestação (BRUCK; ANDERSON; et al., 1997).

A produção de prostaglandina E, pelo concepto esta envolvida na estimulação da contratilidade do miométrio, que impulsiona a vesícula ao longo dos cornos uterinos. O aumento do diâmetro da vesícula, do tônus uterino e do espessamento da parede uterina, induzido pela produção de estrógeno pelo concepto, promove a fixação da vesícula no lúmen uterino no dia 16. Quando a vesícula embrionária não pode mais migrar e

encontra-se fixa dentro do corno uterino, contrações do miométrio continuam a causar sua rotação, tanto que o embrião orienta-se para a região ventral da mesma (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Essa PGE2 tem a propriedade de provocar contrações locais e relaxamento da musculatura lisa, atuando na parede da tuba uterina, permitindo assim que o embrião se mova progressivamente com o auxílio do batimento ciliar rítmico, entrando no útero aproximadamente após 24 horas (GASTAL et al., 1998). Desta forma, este estágio de desenvolvimento depende da capacidade secretória de PGE2 pelo embrião (ALLEN, 2001).

A interação entre componentes da via das prostaglandinas e seus receptores e enzimas, devem ser investigada em conjunto, para entender completamente os eventos que acontecem durante o reconhecimento precoce da gestação, como a prevenção de luteólise e manutenção da prenhez. A interação equilibrada entre as enzimas e receptores de prostaglandinas dentro do útero durante o reconhecimento embrionário devem ser mantidos para proporcionar um ambiente adequado para o embrião, que primeiro deve inibir a luteólise e depois prosseguir para o processo de implantação (ATLI et al., 2010).

Na ausência do concepto, a égua retornará ao estro como resultado da luteólise, pela ação da prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$), que é liberada por pulsos intermitentes ao redor dos 12- 14 dias após a ovulação. A migração intrauterina do concepto parece ser necessária para assegurar a frequente interação com o endométrio de modo a suprimir adequadamente a secreção de $PGF2\alpha$ (GAIVÃO & STOUT, 2007).

Os efeitos do concepto dentro do lúmen uterino são locais e não sistêmicos, uma vez que a migração do concepto parece exercer papel essencial na sobrevivência embrionária no início da gestação (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O corpo lúteo (CL) é o local de produção de progesterona, hormônio que promove o encerramento do estro, mantém a égua não receptiva ao macho e prepara o útero para receber o embrião (ARRUDA, 1995). A progesterona é necessária para a interação entre o útero e o embrião. As secreções de proteínas uterinas são aparentemente importantes na nutrição do concepto no início da gestação. A habilidade do endométrio em providir quantidade adequada de secreções depende em grande parte da progesterona (BERGFELT & ADAMS, 2007).

Tanto o corpo lúteo primário, o secundário e a placenta contribuem para o volume total de progesterona durante a gestação. A concentração de progesterona luteínica na circulação periférica está estreitamente relacionada com as modificações morfológicas do corpo lúteo (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A progesterona é uma substância absolutamente necessária para a sobrevivência do embrião na égua, visto que a administração de progesterona em éguas ovariectomizadas torna as mesmas aptas a gestarem (SHIDELER et al., 1982), e a ovariectomia se feita após o 70 dia de gestação, não provoca aborto (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A incidência de morte embrionária antes dos sessenta dias de gestação varia de 2,6% a 24%, apresentando uma média de 8,6%, o que gera grandes prejuízos na criação equina (VANDERWALL, 2008).

A administração profilática de progesterona (P4) exógena em éguas prenhes, em um esforço para melhorar a manutenção da gestação, continua a ser uma prática generalizada mesmo sem evidências científicas que justifiquem sua eficácia. Baixos níveis de progesterona causados pela insuficiência do CL primário têm sido proposto como causa de perda embrionária precoce (ALLEN, 2001) .

2.4 - Seleção de receptoras de embrião

A seleção de éguas aptas para serem receptoras de embrião é um fator decisivo podendo afetar o sucesso da técnica de TE (Vanderwall & Woods, 2007 ;McKinnon & Squires, 2007).

Sendo considerada durante anos como éguas de segunda, com atenção e condições de espaço, sanidade e alimentação limitada e sub-ótimas, especialmente em relação às doadoras, as éguas receptoras ocupam hoje uma posição importante dentro das decisões de um plantel comercial de TE, devendo levar em conta alguns fatores como: o escore corporal, idade (3 a 10 anos), o tipo e o tamanho ideal da receptora (o mais próximo da doadora), condições vulvar e uterina, a habilidade materna (preferência ter sido mãe), avaliação de úbere, docilidade, e a sanidade é fundamental estar em dia, o manejo nutricional é importante pelo fato de que uma égua não alimentada adequadamente vai ter maior dificuldade em ciclar (Alvarenga et al.,2008).

As receptoras necessitam ter um ciclo estral regular e serem livres de alterações uterinas e ovarianas tais como líquido uterino, cistos uterinos, ar e debris no útero, tumores ovarianos ou outras patologias ovarianas, sendo livres de problemas reprodutivos (SQUIRES et al., 1999; CARNEVALE et al., 2000; LOPES, 2002; SQUIRES et al., 2003). Estas análises combinadas com o tônus uterino e cervical determinados pela palpação retal, são os principais critérios utilizados para a seleção da receptora (SQUIRES; McKINNON; SHIDELER, 1988).

De acordo com Squires e Seidel (1995), a melhor égua receptora é aquela que já produziu potros. Outros fatores como a ciclicidade normal também são importantes, pois permitirá maior sucesso no momento da sincronização da ovulação doadora/receptora, a menos que se pretenda utilizar éguas acíclicas tratadas hormonalmente como receptoras.

2.4 - Sincronização entre doadora e receptora de embrião

Diversos tratamentos hormonais têm sido utilizados nos objetivos de sincronização do cio e ovulação na égua, com base em um único hormônio ou na combinação de dois ou mais compostos (ANDRADE, 1986). Um embrião exposto a um útero assincrônico pode estar sujeito a fatores de desenvolvimento e níveis hormonais não correspondentes a fase na qual ele se encontra. Isto pode resultar em mudanças nas taxas de desenvolvimento ou na morte do embrião (BARNES, 2000).

O uso de receptoras em um momento mais precoce do diestro permite um melhor aproveitamento de receptoras (ALONSO, et al., 2010). A janela de +1 (ovulação da receptora 1 dia antes da doadora) -3 (ovulação da receptora 3 dias depois da doadora) deve ser utilizada (SQUIRES, 2006). Fleury et al. (1989), transferiram embriões para 6 éguas que ovularam 3 dias depois da doadora e 3 éguas que ovularam 4 dias depois da doadora, obtendo taxa de prenhez semelhante à das receptoras com menor grau de assincronização. Já Foss et al. (1999), propuseram a utilização de uma janela de assincronia de ovulação maior do que as utilizadas anteriormente, sendo que éguas receptoras -5 (ovulação menos 5 da doadora) apresentaram resultados satisfatórios 5/6 (83,3%). A flexibilidade resultante dessa maior janela de sincronização tornou a seleção de uma receptora mais fácil.

A utilização de receptoras no D3 pós-ovulação pode ser possível, desde que estas apresentem bom tônus uterino na avaliação ginecológica (FLEURY et al., 2006). Caiado et al. (2007), verificaram que o tratamento diário com progesterona iniciado no dia da ovulação da receptora permitiu seu uso já no segundo dia pós ovulação, tendo sido obtidas taxas de prenhez próximas a 70% quando utilizada a progesterona e de 30% quando não utilizada a suplementação.

Receptoras de embrião podem ser utilizadas a partir do terceiro dia pós ovulação, com adequadas taxas de prenhez, sem suplementação exógena de progesterona já que as taxas de prenhez foram similares as éguas nos dias 3 a 8 pós ovulação {D3, 75,90% (83); D4, 71,72% (198); D5, 71,49% (228); D6, 69,36% (173); D7, 76,87% (147), D8, 68,42% (76)}. Além disso, elas tornam-se uma possibilidade interessante quando uma sincronização mais próxima não é possível. Entretanto, uma seleção adequada baseada em determinadas características do útero e tônus é essencial para que estes resultados sejam obtidos (FLEURY et al., 2010).

Outra possibilidade é a utilização de receptoras com ciclo artificial. Esses animais são utilizados aplicando-se estrógeno e progesterona para mimetizar um ciclo natural em éguas no período de transição ou anestro. As taxas de prenhez alcançadas utilizando-se este tipo de receptora foram semelhantes as de éguas ciclantes (10/18, 55,6% VS 400/590 67,8%) (CARNEVALLE et al., 2000).

2.5 - Fármacos utilizados na manipulação do ciclo estral da égua receptora de embrião

Devido a grande variação entre as éguas na duração do estro e no intervalo de ovulação, a indução farmacológica é uma importante ferramenta para o manejo reprodutivo (BEREZOWSKI et al., 2004).

2.5.1. Protocolos com utilização de Estrógenos com Progesterona ou Progestágenos

Segundo Neely (1983), a administração de uma pequena dose de estradiol (0,5 a 1,0 mg) em éguas durante anestro profundo é capaz de induzir sinais de estro dentro de 3 a 6 horas, enquanto que éguas com corpo lúteo funcional sinais de estro não são observados. Por outro lado, a administração de 17 β - estradiol (50mg, Intra-muscular IM) ou de cipionato de estradiol (50mg, IM) no dia seguinte a 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 a prostaglandina (sem progesterona) com o mesmo grau de sincronização de quando administrados em associação com progestágenos (PINTO et al., 2004).

Webel (1975) foi o primeiro pesquisador a reportar o uso de um progestágeno sintético via oral (Altrenogest) em éguas. Desde então, têm-se observado numerosas citações de seu uso.

O uso de P4 LA é extremamente vantajoso, devido à grande trabalho e estresse dos animais associados com as injeções diárias exigidas pelas formas de ação curta (PESSÔA et al., 2004)

Rocha Filho et al. (2004), concluíram que éguas não ciclantes tratadas com progesterona de curta e longa ação por 5 a 8 dias antes da transferência, podem ser usadas com sucesso como receptora de embrião durante o período do ano em que poucas éguas ciclantes estão disponíveis.

Bringel et al. (2003), observaram que a circulação de progesterona foi compatível com os níveis da fase luteal após a injeção de 1500 mg de P4 LA a cada 7 dias em éguas acíclicas, sugerindo que consiste num protocolo seguro para receptoras de embrião em transição.

De acordo com Kaercher (2011) a utilização de receptoras ciclantes e não ciclantes de embrião mostrou sucesso nas taxas de prenhez de 75,0 e 75,9%, respectivamente, no 12° dia de gestação. No entanto, os presentes resultados mostram discrepância em relação aos obtidos por Rocha Filho et al. (2004), não só na diferença entre a porcentagem de prenhez, que se apresentou a mais elevada (85%) no grupo de éguas ciclantes, mas também na porcentagem (53,3%) de éguas não ciclantes. O resultado mostrou diferenças significativas ($P < 0,05$), o que, no entanto, não foi verificado diferença significativa por Rocha Filho et al. (2004), para as taxas de gestação e de mortalidade embrionária após o 12° dia de desenvolvimento embrionário. Podendo suprir a deficiência de éguas receptoras de embrião principalmente no início do período de estação de monta, quando apenas poucas éguas ciclantes estão disponíveis com a utilização de P4 de curta ou longa ação (KAERCHER et al., 2011).

No trabalho de Dell'aqua Jr et al (2009), receptoras não ciclantes foram tratados com 15 mg de benzoato de estradiol (BE) e seguido por uma aplicação de 10 ml de P4 LA contendo 300 mg/ml em 48 horas. Os embriões foram transferidos entre 4 e 10 dias,

após injeção da P4 LA. Após a confirmação da gestação uma nova injeção de 3 g de P4 LA foi feita e repetida a cada 14 dias até 110 dias após o diagnóstico de prenhez. Com base nos resultados do presente estudo, concluíram que a nova formulação de P4 LA contendo 300 mg/ml administrada a cada 14 dias foi eficaz em manter a gestação de éguas receptoras não ciclicas, permitindo um maior intervalo no tratamento e na janela de tempo para transferir os embriões.

Segundo Zerlotti (2012) foi realizado um experimento para comparar os resultados entre receptoras ciclantes e aquelas não ciclantes incluídas em um programa comercial de TE, em um período de 72 horas da ovulação da égua doadora, as receptoras que não estavam ovulando, com folículo ≤ 20 mm e sem corpo lúteo receberam 10 mg de 17 β estradiol, IM. Aproximadamente 48 horas depois, as éguas com edema endometrial significativo receberam 1,5g de progesterona, IM. Todas as receptoras (ovulando ou não) foram mantidas com administrações semanais de 1,5g de progesterona, do momento da transferência até 120 dias de gestação. Não foram observadas diferenças significativas nas taxas de prenhez entre receptoras ciclantes e não ciclantes concluído que esse protocolo pode ser usado em qualquer central de TE.

De acordo com Rodrigues et al. (2012), é de grande importância o acompanhamento das características morfológica do útero e ovário durante o estro. Os efeitos da progesterona sobre as características morfológicas da cérvix e útero são eficazes somente após efeitos estrogênicos (Allen, 2001). Segundo Hughes et al., (1972) é na fase do estro, com a presença do estradiol o principal hormônio ovariano produzido, o responsável pelo aparecimento de edema e tônus uterino característicos, criando também receptores para progesterona e preparando o útero para uma possível gestação.

3. OBJETIVO

O presente estudo teve com objetivo utilizar a combinação dos hormônios 17 β estradiol e progesterona natural em programas de Transferência de Embriões de equinos para sincronização de receptoras ciclantes em diestro.

4 - REFÊRENCIAS

ALLEN,W.R. Luted deficiency and embryo mortality in the mare. **Reprod. Dom. Anim.** 36, p.121-131, 2001.

ALONSO, M.A.; FLEURY, P.D.C.; ALVARENGA, M.A. Utilização de éguas receptoras de embrião três dias (D3) após a ovulação. Em: XI CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 29, 2010, São Paulo, SP. *Anais...* São Paulo: SP, p. 327-28, 2010.

ATLI, M.O.; KURAR, E.; KAYIS, S.A; ASLAN, S.; SEMACAN, A.; CELIK, S.; GUZELOGLU, A. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, 122, p.124-132, 2010.

ALVARENGA, M. A.; CARMO, M. T.; OLIVEIRA, J.V. . **Transferência de embriões na espécie eqüina, Apostila de transferência de embriões na espécie eqüina** Botucatu, SP, 2008.

ANDRADE, **Fisiologia e manejo da reprodução eqüina.** Editora:Lucio Sergio de Andrade, 1986.

ARRUDA, R.P. **Efeitos da idade, desenvolvimento folicular, tamanho e morfoecogenicidade luteinica, níveis de progesterona e técnicas de inoculação, sobre os índices de gestação em receptoras de embriões eqüinos**, 1995, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Tese, São Paulo, 1995.

ARRUDA, R.P. **Manejo Reprodutivo das fêmeas equinas.** In: Semana de Zootecnia, 13. 1990, Pirassununga. In: REPRODUÇÃO E MELHORAMENTO ANIMAL, 1990. p.126

BARNES, F.L. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus.**Theriogenology**, v.53, p.649-658, 2000.

BEREZOWSKI, C.J.; STITCH, K.L.; DACT, D.V.M; WENDT, K.M. Clinical comparison of 3 products available to hasten ovulation in cyclic mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24, n.6, p. 231-233, 2004.

BERGFELT, D.R.; ADAMS, G.P. Ovulation and corpus luteum development, In: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; McKINNON, A.O. **Current therapy in Equine Reproduction**.Saunalers: Philadelphia, cap. 1, p1-13, 2007.

BRINGEL, B.A.; JACOB, 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. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.27, p.498-500, 2003.

BRUCK, I.; ANDERSON, G.A.; HYLAND J.H. The influence of progesterone-induced proteins on glucose metabolism in the early embryos.**Theriogenology**, v 47, p 441- 456. 1997.

BURATINI JR. J. **Avaliação da dinâmica folicular em éguas da raça Mangalarga Marchador utilizando ultrasonografia e as concentrações plasmáticas de Progesterona e hormônios Luteinizante**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista UNESP-Botucatu, p. 27-39, 1997.

CAIADO, J.R.; FONSECA, F.A.; SILVA, J.F.S.; FONTES, R.S.. Tratamento de éguas receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.360-368, 2007.

CARNEVALLE, E.M.; RAMIREZ, R.J.; SQUIRES, E.L. ;ALVARERNGA, M.A. ; VANDERWALL, D.K. ; Mc CUE, P.M. Factores affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.54, p 965-979, 2000.

DAELS, P.F. Management of spring transition. In:8 AAEP ANNUAL RESORT SYMPOSIUM, Italy. **Anais...** Italy 2006.

DELL'AQUA, J.A.; CHAVES, M.M.C.; MEDEIROS, A.S.L.; DELL'AQUA, C.P.F.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Use of a new formulation of long acting progesterone in non cycling recipient mares, **Weva**, 321, 2009.

DOUGLAS, R.H. **Equine embryo transfer**. In: MORROW, D.A. Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 71-73.

DOWSETT, M.A.; WOODWARD, R.A.; BODERO, D.A. A study of nonsurgical embryo transfer in the mare. **Theriogenology**, v.31, 1989. p 631-642.

DUKES, H. H. **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11^a ed. Editora Guanabara/Koogan. Rio de Janeiro. 1996.

FLEURY, P.D.C.; ALONSO, M.A.; BALIEIRO, J.C.C. Avaliação da receptora: efeito de características uterinas e tempo de ovulação. In: XVIII Reunião anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Araxá. **Acta Scientiae Veterinariae**, v34 (supl.1). p.502, 2006.

FLEURY, J.J.; COSTA NETO, J.B.F.; ALVARENGA, M.A. Results from an embryo transfer programme in Brazil. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.8, p.73-79, 1989.

FOSS, R.; WIRTH, N.; SCHILTZ, P.; JONES, J. Nonsurgical embryo transfer in a private practice. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v.45, p. 210-212, 1999.

GAIVÃO, M.M.F.; STOUT, T.A.E. Maternal recognition of pregnancy in the mare- a mini review. **Revista Lusófona Ciência e Medicina Veterinária**, p.5-9, 2007.

GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; TORRES, C.A.; GINTHER, O.J. Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares. **Theriogenology** 50, p. 989-999, 1998.

GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare: basics and applied aspects**. 2^a ed. Michigan, U.S.A: Equiservices Publishing, 1992. Bibliografia recomendada: 204. ISBN 978-0964007215.

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, 2005.

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

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7^a ed. Editora Manole. Barueri-SP. 2004.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, D. H.; EVANS, J.W. Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners, 1972.** 119-152.

KAERCHER F. ; SIQUEIRA M. ; MERCADANTE, A.; FIGUEIREDO, T.; WEISS, R.R.; SIQUEIRA, F.; KOZICKI, L.E. Embryo transfer in no cycling Crioula and Quarter horse breeds treated with estradiol cipionate and long-acting progesterone, **Braz. arco. biol. tecno.** Vol 54 n6. Curitiba, novembro/dezembro, 2011.

JASKO, D.J. Comparison of pregnancy rates following nonsurgical transfer of day 8 equine embryos using various transfer devices. **Theriogenology**, v.58, p.713-715, 2002.

LOPES, E.P. **Desmistificando a transferência de embriões.** Top 2000 Mangalarga Marchador. v.1, n.1, p.6, 2002.

MACHADO, M.S. **Avaliação da dinâmica folicular em éguas superovuladas com extrato de pituitária equina e FSH equino purificado.** Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2004.

MCDOWELL, K.J., SHARP, D.C; GRUBAUGH, W.; THATCHER, W.W.; WILCOX, C.J. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. **Biol. Reprod.**39, p.340-348, 1988.

MCKINNON, A.O.; CARNEVALE, E.M. Ultrasonography. In : Mckinnon, A.O. **Equine Reproduction.**, p.211-220. 1993.

MCKINNON A.O.; SQUIRES E.L. 2007. **Embryo transfer and related technologies**, p.319-334. In: Current Therapy Equine Reproduction. Saunders, Missouri.

NAGY, P., GUILLAUME, D. ; DAELS, P. **Seasonality in mares.** **Animal Reproduction Science**, v.60-61, 2000. p. 245-262.

NEELY, D.P. **Reproductive endocrinology and fertility in the mare.** In: Huges JP (Ed). Equine reproduction. Nutley, NJ: 1983, p 50-52.

NEELY, D.P; KIU, I. K.M.; HILLMAN, R.B. **Reproduccion Equina**. Heemisferio Sur, 1989. p.178

PESSOA, M.A.; ROCHA FILHO, A. N.; CARMO, M. T. **Comparison between short and long acting progesterone for treatment of non-cycling embryo recipient mares**.In: International Symposium on Equine Embryo Transfer, 6, 2004, Rio de Janeiro. Proceedings... Rio de Janeiro: R & W Communications, p. 85-87.

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

REECE, W. O. **Anatomia Funcional e Fisiologia dos Animais Domésticos**. 3ª ed. Editora Roca, 2008.

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

RODRIGUES, T.G.; CAIADO, J.R.C.; FAGUNDES, B.; SILVA, J.F.S. Uso de Progesterona de longa ação e inovulação de éguas no segundo dia após a ovulação. **Acta Biomedica Brasiliensia** / Volume 3/ nº 1/ Junho de 2012.

SHIDELER, R.K.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J. L.; EIKENBERRY, D.J.; PICKETT B.W. Progestagen therapy of ovariectomized pregnant of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.32, p 459-464, 1982.

SOUSA, F.A.C. **Efeitos da gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre as características reprodutivas de fêmeas eqüinas candidatas a receptoras de embriões** – Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 2006.

SPENCER, T.E.; BURGHART, R.C.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Anim. Reprod.Sci** 82-83: p. 537-550,

SQUIRES E.L. **Management of donors and recipients.**In: **Congresso Multisocietá italianan veterinari per equini**, 7, bologna, 2006.

SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; MCCUE P.M.; BRUEMMER, J.E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology** , v.59, p.151-170, 2003.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology** , Los Altos, v. 51, p. 91 – 104, 1999.

SQUIRES, E.L.; McKINNON A.O.; SHIDELER, R.K. Use of ultrasonography in reproductive management of mares. **Theriogenology**, v.29, p.55-70, 1988.

SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E. Collection and transfer of equine reproduction. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, Colorado State University, Fort Collins, n. 8, Jan, 1995.p 32-38

VANDERWALL, D.K. Early embryonic loss in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.11, p.691-702, 2008.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses, p. 211- 219 . In:YOUNGQUIST, R. S.; THRELFALL, W. R. (Ed.). **Current therapy in large animal theriogenology**. Philadelphia : Saunders, 2007, p. 211 – 219.

WEBEL, S.K. Estrous control in horses with a progestin. **Journal of Animal Science**, v.41, p. 385, 1975.

ZERLOTTI, M, **Como selecionar e preparar éguas receptoras para a transfêrencia de embrioes**, Em: XIII CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ,suplemento III vol. 41, 2012 Campinas, SP. Anais... Campinas :SP, 2012.

5 – Trabalho Científico

Trabalho enviado para a revista Veterinária e Zootecnia no dia 26/08/2013.

Sincronização de receptoras no diestro para utilização em programa de Transferência de Embriões em equinos

Renata Tenório Ribeiro de Souza¹

João Guilherme de Góis Fontes²

Mariana Furtado Zorzetto³

Adelcio Barbosa da Silva Júnior⁴

Frederico Ozanam Papa⁵

Marco Antônio Alvarenga⁵

José Antônio Dell'aqua Júnior⁵

renatatenorio@hotmail.com.br; telefone (79) 3211 7429; Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP: 18618-000 Botucatu-SP.

¹ Mestranda em Reprodução Animal pelo Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP: 18618-000, Botucatu-SP.

² Mestre em Alimentação e nutrição de ruminantes. Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão - SE

³ Doutoranda em Reprodução Animal pelo Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP: 18618-000, Botucatu-SP.

⁴ Médico Veterinário responsável pela D.A. Vida Equine Reproduction, Aracaju- SE

⁵ Professor do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP: 18618-000, Botucatu-SP.

Sincronização de receptoras no diestro para utilização em programa de Transferência de Embriões em equinos

Resumo

Um dos grandes problemas da técnica de transferência de embriões continua sendo a seleção de éguas aptas para serem utilizadas como receptoras de embrião e aumentar o seu período de utilização é sempre um desafio. Já sabendo que a utilização de receptoras acíclicas sincronizadas pela reposição hormonal apresenta taxas de gestação similares a receptoras ciclantes. O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da utilização do estrógeno e progesterona em receptoras de embrião na fase de diestro. Foram utilizadas 60 éguas divididas em três grupos experimentais, sendo grupo controle, grupo acíclicas preparadas com a administração de 20mg de 17 β estradiol e 3g de Progesterona Natural injetável em veículo de liberação lenta e o grupo diestro receptoras entre o D8 e D14 do ciclo estral (diestro) preparadas com a administração de 50mg de 17 β estradiol e 3g de Progesterona Natural injetável em veículo de liberação lenta. Sendo avaliada a porcentagem de prenhez e valor médio e desvio padrão do grau máximo de edema uterino de receptoras que ficaram prenhes ou ficaram vazias nos diferentes grupos, porcentagem de receptoras do grupo diestro que apresentaram grau de edema uterino e taxa de prenhez em relação ao grau de edema, média e desvio padrão do grau de edema uterino e números de animais em relação ao dia do início do protocolo e respectiva taxa de prenhez das éguas do grupo diestro. Os dois protocolos de sincronização no grupo controle e grupo acíclicas com 80% de prenhez foram eficazes para a preparação de éguas como receptoras de embrião. O protocolo utilizado no grupo diestro obteve a taxa de gestação de 40% podendo ser uma alternativa estratégica em um programa de TE, desde que a receptora se encontre após o D10 do diestro e apresente grau de edema uterino superior a 2, após a aplicação do 17 β estradiol.

Palavras chaves: Diestro, Estradiol, Progesterona, Sincronização, Transferência de embrião.

1 **Synchronization of estrus in the recipient for use in program embryo transfer in horses**

3 Abstract

4 A major problem of the technique of embryo transfer remains the selection of suitable
5 mares to be used as embryo recipients and increase their usage period is always a
6 challenge. Knowing that the use of acyclic receptor synchronized by hormone
7 replacement shows pregnancy rates similar to receiving ciclantes aimed to the present
8 work was to study the effect of the use of estrogen and progesterone in embryo
9 recipients in diestrus to its best advantage. 60 mares were used divided into three
10 experimental groups and control group, acyclic prepared with the administration of 20
11 mg of 17β estradiol and 3g of Natural Progesterone injection in vehicle slow release and
12 the group receiving diestrus between D8 and D14 of the estrous cycle (diestrus)
13 prepared by administering 50 mg of 17β estradiol, and 3g natural progesterone
14 injection in slow release vehicle. Being evaluated pregnancy rate and mean value and
15 standard deviation of the maximum degree of uterine edema of recipients who were
16 pregnant or became empty in the different groups, the percentage of recipients diestrus
17 group that showed uterine edema and pregnancy rate in relation to the degree edema,
18 mean and standard deviation of the degree of uterine edema and numbers of animals in
19 relation to the day of the beginning of the protocol and rate of pregnancy in mares group
20 diestrus. The two synchronization protocols in the control group and acyclic were
21 effective for the preparation of mares as embryo recipients. The protocol used in
22 diestrus group may be an alternative strategy in a program TE, provided the receptor is
23 found after D10 diestrus and present uterine edema grade greater than 2, after
24 application of 17β estradiol.

26 **Keywords: Diestrus, Embryo Transfer, Estradiol, Progesterone, Synchronization**

La sincronización del estro en el receptor para su uso en la transferencia de embriones programa en caballos

Resumen

Un problema importante de la técnica de transferencia de embriones sigue siendo la selección de yeguas adecuados para ser utilizados como receptoras de embriones y aumentar su periodo de uso es siempre un desafío. Sabiendo que el uso del receptor acíclico sincronizado por reemplazo hormonal muestra las tasas de embarazo similares a recibiendo ciclantes destinados a este trabajo fue estudiar el efecto del uso de los estrógenos y la progesterona en los receptores de embriones en el diestro a su mejor ventaja. 60 yeguas que se dividieron en tres grupos experimentales y el grupo de control, acíclicos preparado con la administración de 20 mg de 17β estradiol y 3 g de inyección de progesterona natural en el vehículo de liberación lenta y el grupo que recibió el diestro entre D8 y D14 del ciclo estral (diestro) preparado por la administración de 50 mg de estradiol y 17 de inyección de progesterona natural 3g β en un vehículo de liberación lenta. Siendo evaluado tasa de embarazo y el valor y la desviación estándar del máximo grado de edema uterino de los receptores que estaban embarazadas o se convirtieron en vacío en los diferentes grupos de media, el porcentaje de receptores grupo diestro que mostró edema uterino y la tasa de embarazo en relación con el grado edema, media y desviación estándar del grado de edema uterino y el número de animales en relación con el día del comienzo del protocolo y la velocidad de la gestación en yeguas diestro grupo. Los dos protocolos de sincronización en el grupo de control y acíclicos fueron eficaces para la preparación de yeguas como receptoras de embriones. El protocolo utilizado en el grupo diestro puede ser una estrategia alternativa en un programa de TE, siempre y cuando el receptor se encuentra después de D10 diestro y presente edema uterino de grado mayor que 2, después de la aplicación de 17β estradiol.

Palabras clave: Diestro, Estradiol, Progesterona, Sincronización, Transferencia de embriones.

1 **Introdução**

2 Sendo notório o crescimento e desenvolvimento do mercado de equinos no país,
3 a busca por melhores resultado de fertilidade na espécie vem aumentando assim como
4 interesse pela técnica de transferência de embriões (TE).

5 A seleção de éguas aptas a serem utilizadas como receptora continua sendo o
6 maior problema em um programa de TE (DOWSETT e WOODWARD; 1989),
7 aumentar o período útil de utilização de receptoras é sempre um desafio que possibilita
8 recompensas na redução de custos da técnica de TE (JASKO, 2002).

9 A relação ideal de 1:1 (para cada doadora uma receptora) se mostra como uma
10 interessante alternativa para o melhor aproveitamento das éguas receptoras diminuindo
11 os altos valores da transferência de embriões possibilitando a técnica se difundir mais
12 rapidamente (CAIADO, 2007).

13 A utilização de receptoras acíclicas sincronizadas pela reposição hormonal
14 apresentam taxas de gestação similares a receptoras ciclantes (DELL'AQUA JR. et al.,
15 2009).

16 A égua ciclante se encontra apta a receber um embrião até o nono dia após sua
17 ovulação, assim sendo, para a receptora estar apta novamente para uma TE, seria
18 necessário mais oito a dez dias em média para ela ovular (após aplicação de luteolítico)
19 e no mínimo mais 3 ou 4 após a ovulação para apresentar condição uterina adequada
20 para utilizada como receptora. Desta forma, são 12 a 15 dias em que a receptora fica
21 indisponível no lote. A diminuição desse intervalo pode ser uma alternativa para
22 minimizar os custos inerentes à manutenção das receptoras.

23 Em virtude disso, o presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito da
24 utilização do estrógeno e progesterona em receptoras de embrião na fase de diestro.

25

26 **2. Material e Métodos**

27

28 **2.1. Local da Pesquisa**

29

30 O experimento foi conduzido durante a estação reprodutiva 2012/2013, junto a
31 Central de Reprodução Equina - D.A. Vida Equine Reproduction, localizada no Haras
32 Fábio José, Lagarto-SE, latitude -10°55'02'' e longitude -37° 39'00''.

33

2.2. Animais e Divisão dos Grupos Experimentais

Foi utilizado um total de 60 éguas mestiças como receptoras com idade entre 4 e 10 anos, escore corporal classificado em bom e regular, não possuindo quaisquer anormalidades no trato reprodutivo que pudessem ser detectadas por exame de palpação retal, citologia uterina ou ultrassonografia transretal. Destas, 40 éguas estavam em plena atividade reprodutiva e 20 em anestro. Seis garanhões com fertilidade comprovada foram utilizados como doadores de sêmen para a realização das inseminações de 15 éguas puras da raça Quarto de Milha entre 6 e 12 anos, utilizadas como Doadoras para obtenção dos embriões. Todos os animais eram mantidos em sistema de confinamento com acesso a água, silagem de milho e sal mineral à vontade, tendo sua alimentação complementada com ração comercial peletizada.

Grupos experimentais:

Todas as éguas tiveram seu ciclo estral acompanhado através de palpação retal e ultrassonografia para determinação da fase estral que se encontravam estro: crescimento folicular e presença de edema uterino avaliado em escore de 0 a 3 sendo 0 ausente e 3 máximo observação efetuada entre a bifurcação dos cornos uterinos. No diestro: presença do corpo lúteo ou anestro: inatividade ovariana. A ultra-sonografia foi realizada com auxílio de ultra-som Mindrayn 4900, com transdutor de 5 MHZ. Foram testados os seguintes grupos:

Grupo Controle: 20 receptoras cíclicas ovuladas que foram inovuladas entre os dias 3 a 8 do ciclo estral, onde o D0 é o dia da ovulação. Tiveram seu ciclo acompanhado através de palpação retal e ultrassonografia. Ao atingirem folículo de aproximadamente 35 mm e presença de edema endometrial mínimo grau 2 foram induzidas com 1,0 mg de acetato de deslorelina I.M.

Grupo Acíclicas: 20 receptoras foram preparadas com a administração de 20mg de 17 β estradiol no dia da ovulação da Doadora e dois dias após, o escore do edema uterino era avaliado e então recebiam uma administração de 3g de Progesterona Natural injetável em veículo de liberação lenta, e foram inovuladas entre os dias 3 a 8 a partir da aplicação da progesterona.

1 **Grupo Cíclicas em Diestro:** 20 receptoras cíclicas entre o D8 e o D14 do ciclo estral
2 (Diestro), foram preparadas com a administração de 50mg de 17β estradiol no dia da
3 ovulação da Doadora e dois dias após, o escore do edema uterino era avaliado e então
4 recebiam uma administração de 3g de Progesterona Natural injetável em veículo de
5 liberação lenta, e foram inovuladas entre os dias 3 a 8 a partir da aplicação da
6 progesterona.

7 **2.3. Delineamento Experimental**

10 **2.3.1. Produção dos embriões**

11 A colheita do sêmen foi realizada com auxílio de uma vagina artificial, o
12 ejaculado filtrado, os parâmetros espermáticos aferidos e o sêmen diluído na proporção
13 de 1:1 com extensor a base de leite desnatado (Botu-Sêmen[®]). Após 24 horas da
14 indução da ovulação as éguas foram inseminadas com 1×10^9 de espermatozoides
15 moveis. A colheita dos embriões foi realizada no oitavo dia pós ovulação realizada com
16 auxílio de uma sonda de Foley modelo Bivona[®] (Bivona Medical Technologies,. Gary,
17 IN, EUA) acoplada a um frasco de Ringer com Lactato de Sódio (J.P. Indústria
18 Farmacêutica – Ribeirão Preto- SP). Sendo realizados três lavados uterinos de um
19 litro/lavado para recuperação do embrião.

20 Os embriões obtidos foram classificados em escala de 1 a 5, de acordo com
21 McKinnon e Squires (1988), em excelentes, bons, regulares, ruins e ovócitos não
22 fecundados com auxílio de microscópio esterioscópico. Apenas os embriões
23 considerados excelentes e bons foram transferidos.

25 **2.3.2. Diagnóstico de Gestação**

26 Quatro a seis dias após a inovulação foi efetuado o diagnóstico de gestação
27 através de ultrassonografia. Nos grupos das éguas acíclicas e cíclicas em diestro na
28 confirmação da prenhez foi administrado mais uma aplicação de 3g de progesterona
29 natural injetável em veículo de liberação lenta, e reaplicações a cada 14 dias até os 110
30 dias de gestação para manutenção da gestação.

32 **2.4. Análise Estatística**

1 Para análise das porcentagens de gestação entre os grupos estudados foi utilizado
 2 o teste de Fisher. E o teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey para as demais
 3 variáveis. A incidência do edema uterino em relação ao dia do início do tratamento no
 4 grupo de animais do diestro foi obitido pelo boxplot gerado pelo programa estatístico R.
 5 Todas as estatísticas efetuadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

7 3. Resultados

8 Em relação à taxa de prenhez observada após a inovulação nos diferentes grupos
 9 estudados foi verificado que os grupos controle e de receptoras acíclicas apresentaram
 10 valores similares e significativamente maiores aos do grupo de éguas em diestro. O
 11 mesmo padrão estatístico também foi encontrado em relação ao grau máximo de edema
 12 uterino das receptoras que se tornaram prenhes após a inovulação ou ficaram vazias.
 13 Dados visualizados na tabela 1.

14
 15 Tabela 1: Porcentagem de prenhez e valor médio e desvio padrão do grau máximo de
 16 edema de receptoras que se tornaram prenhes ou ficaram vazias nos diferentes grupos
 17 de receptoras controle, acíclicas e diestro.

	Grupo Controle	Grupo Acíclicas	Grupo Diestro	Valor de p
Taxa de Prenhez	16/20 (80%) ^a	16/20 (80%) ^a	8/20 (40%) ^b	p=0,02
Edema Prenhas	3±0 ^a	3±0 ^a	2,7±0,4 ^b	p=0,004
Edema Vazias	3±0 ^a	3±0 ^a	0,2±0,8 ^b	p=0,0001

18 *Edema uterino avaliado em escore (0-3), sendo 0 ausente e 3 máximo.

19 ^{ab} Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

20
 21 No grupo experimental efetuado durante o diestro foi observado grande
 22 influência da taxa de gestação sobre a quantidade de edema uterino observado antes da
 23 administração da progesterona. Esse fato pode ser visualizado na tabela 2, onde 60%
 24 das éguas que apresentaram edema uterino graus 0 e 1, nenhuma se tornou gestante após
 25 a inovulação, já os outros 40% que apresentaram edema uterino graus 2 e 3 no mesmo
 26 período, todos 100% mantiveram a prenhez.

27
 28
 29

1 Tabela 2: Porcentagem de receptoras do grupo em diestro que apresentaram grau de
2 edema uterino entre 0 e 1 ou 2 e 3 e taxa de prenhez em relação ao grau de edema.

Grau Edema Uterino	% Receptoras	Taxa de prenhez
0-1	(12/20) 60% ^a	(0/12) 0% ^a
2-3	(8/20) 40% ^a	(8/8) 100% ^b

3 *Edema uterino avaliado em escore (0-3), sendo 0 ausente e 3 máximo.

4 ^{ab} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (p< 0,05).

5

6 O grau de edema uterino apresentou grande variação no grupo dos animais em
7 diestro após a aplicação do 17 β estradiol, esse fato contribuiu na obtenção de diferentes
8 taxas de prenhez em relação ao dia do início do tratamento e ao grau de edema uterino
9 promovido, dados visualizados na tabela 3. A concentração dos maiores índices de
10 edema uterino nesse grupo foi evidenciada a partir do D10 e se mostrou mais constante
11 ao se aproximar do D14, dados demonstrados na figura 1.

12

13 Tabela 3: Média e desvio padrão do grau de edema uterino e números de animais em
14 relação ao dia do início do protocolo e respectiva taxa de prenhez das éguas receptoras
15 do grupo em diestro.

Início do protocolo	n	Edema uterino	Taxa de Prenhez (%)
D8	2	0 \pm 0	(0/2) 0
D9	5	0,4 \pm 0,5	(0/5) 0
D10	8	1,7 \pm 1,5	(5/8) 62,5
D11	0	----	----
D12	4	1,5 \pm 0,7	(2/4) 50,0
D13	0	----	----
D14	1	3 \pm 0	(1/1) 100

16 *Edema uterino avaliado em escore (0-3), sendo 0 ausente e 3 máximo.

17

18

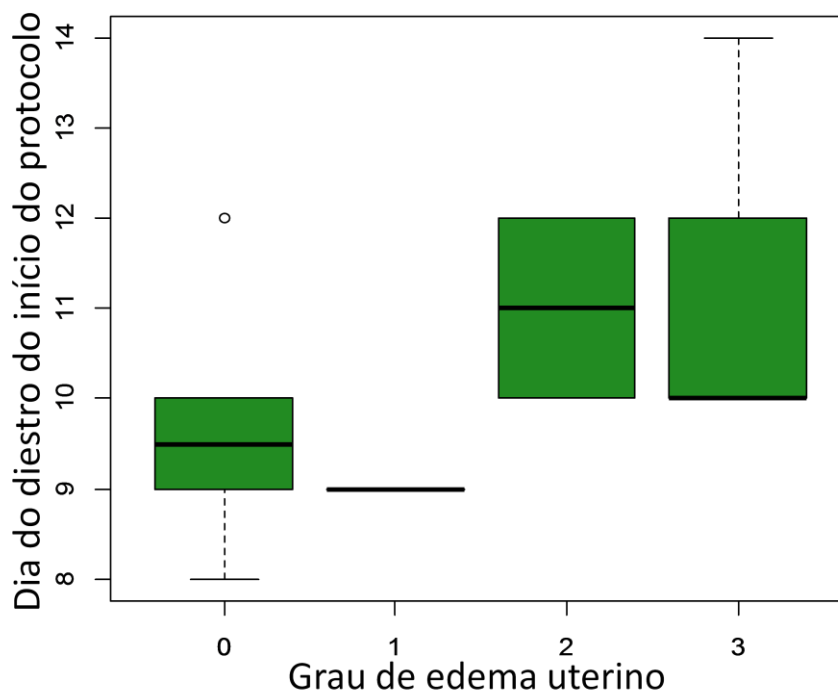
19

20

21

22

23



1 Figura 1: Gráfico ilustrativo da incidência de edema uterino em relação ao dia do início
 2 do tratamento no grupo de animais em diestro.

3

4 **5. Discussão**

5 O presente trabalho utilizou a técnica não cirúrgica e teve índice de
 6 aproximadamente 62% de taxa de prenhez, valores superiores aos encontrados por
 7 Squires et al. (1982) e Iuliano et al. (1985) ambos de 46% demonstrando assim o
 8 aprimoramento da técnica de transferência não cirúrgica que devido a sua simplicidade
 9 se tornou o método mais utilizado na TE (HINRICHS, 1993).

10 Na nossa pesquisa foram comparados protocolos de sincronização de receptoras
 11 de embriões equinos para maximizar seu aproveitamento. Tendo como resultado de
 12 80% na taxa de prenhez no grupo controle e no grupo anestro, já no grupo de receptoras
 13 no diestro tratadas a taxa de prenhez foi de 40%. Esses dados corroboram com os
 14 achados de Rocha Filho et al. (2004), Carnevale et al. (2005), Stout et al. (2006), Caiado
 15 et al. (2007), Kaercher et al. (2011), que também não observaram diferença estatística
 16 entre o grupo ciclante e o grupo em anestro, sendo uma possibilidade já colocada em
 17 prática por muitos médicos veterinários.

18 Como normalmente as éguas durante o período de diestro a partir do dia 8
 19 permanecem sem utilidade reprodutiva até o próximo ciclo, o uso desse protocolo nos
 20 traz uma nova perspectiva para estes animais, tornando-os uma boa alternativa quando

1 há poucas éguas receptoras disponíveis, confirmando assim uma boa alternativa de
2 sincronização de receptoras de embriões, porém necessitando de mais pesquisas com a
3 utilização deste protocolo, não deixando de considerar o resultado de 40% encontrado
4 na pesquisa, pois estas receptoras não teriam como ser utilizadas mais rapidamente
5 aguardando assim um novo ciclo estral.

6 A utilização de estrógeno e a avaliação do edema uterino após a aplicação se faz
7 necessária, já que a elevação dos níveis de estrógenos durante a fase estral é responsável
8 pela instalação do edema uterino (MCKINNON & CARNEVALE, 1993; BURATINI,
9 1997; MACHADO, 2004). Esse fato pode ser evidenciado, haja vista que a maioria dos
10 animais que se tornaram prenhes no grupo iniciado no diestro apresentavam edema
11 uterino 2 ou 3.

12 Foi observado que o edema uterino promoveu uma modificação do ambiente
13 uterino que se mostrou fundamental para obtenção de resultados satisfatórios no grupo
14 de diestro, pois 40% das éguas que foram utilizadas no protocolo, demonstraram edema
15 de graus 2 e 3, e apresentaram 100% de prenhez, o mesmo não foi evidenciado em 60%
16 das éguas desse grupo, pois provavelmente até aproximadamente o décimo dia do
17 diestro os receptores para ligação do 17β estradiol não estão ativos, já que nesse período
18 o grau de edema uterino gerado foi baixo ou ausente culminando com taxas de prenhez
19 embrionária deficiente.

20 Uma alternativa interessante a ser testada nessa fase seria aplicação de um
21 agente luteolítico, que possivelmente possa contribuir com a queda aguda da P4 e
22 consequentemente ativar os receptores estrogênicos, pois segundo Allen, (2001), os
23 efeitos da progesterona sobre as características morfológicas da cérvix e útero são
24 eficazes somente após efeitos estrogênicos. De acordo com Hughes *et al.*, (1972) na
25 fase do estro, a presença do estradiol é o principal hormônio ovariano produzido, sendo
26 o responsável pelo aparecimento de edema e tônus uterino característicos, criando
27 também receptores para progesterona e preparando o endométrio para uma possível
28 gestação.

29 O edema uterino pelo efeito do estrógeno só se faz necessário antes da aplicação
30 da progesterona, pesquisadores afirmam que éguas receptoras de embriões que
31 apresentam edema endometrial no quinto dia pós-ovulação não devem ser utilizadas
32 neste ciclo (SQUIRES *et al.*, 2003; SQUIRES; MCCUE; VANDERWALL, 1999).

1 Samper (1997) afirma que o edema uterino é um indicador confiável da competência
2 estrogênica do folículo dominante.

3 O efeito da progesterona em resposta ao edema uterino provocado pelo
4 estrógeno, no qual a presença do edema durante o período inicial de gestação reflete
5 uma baixa produção de progesterona (PELEHACH et al. 2002). Segundo Hayes et al.
6 (1985), baixas concentrações de estrógeno tem maior importância do que altas
7 concentrações de progesterona no desenvolvimento do endométrio homogêneo
8 característico do diestro.

9 O fato de que os animais que estavam em uma fase do diestro mais tardia após o
10 D10 apresentaram uma boa manifestação de edema uterino e conseqüentemente altas
11 taxas de prenhez, apresentaram uma nova opção de utilização nos programas de TE,
12 haja vista a consistência dessa observada na compilação dos resultados.

13

14 **6. Conclusão**

15

16 O protocolo utilizado no Grupo em Diestro pode ser uma alternativa estratégica
17 em programas de TE, desde que a receptora se encontre após o D10 do diestro e
18 apresente grau de edema uterino superior a 2 após a aplicação do 17 β estradiol.

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

1 **Refêrencias**

- 2 ALLEN, W. R. (2001). Luteal deficiency and mortality in the mare. **Rep. Dom.**
3 **Animal.**, 36: 121-131.
- 4 BURATINI JR. J. **Avaliação da dinâmica folicular em éguas da raça Mangalarga**
5 **Marchador utilizando ultrasonografia e as concentrações plasmáticas de**
6 **Progesterona e hormônios Luteinizante.** Dissertação de mestrado, Universidade
7 Estadual Paulista UNESP-Botucatu, p. 27-39, 1997.
- 8 CAIADO, J.R.; FONSECA, F.A.; SILVA, J.F.S.; FONTES, R.S.. Tratamento de éguas
9 receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação, **Revista**
10 **Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.360-368, 2007.
- 11 CARNEVALE, E. M.; COUTINHO DA SILVA, M. A.; PANZANI, D.; STOKES,
12 J.E.; SQUIRES, E.L. Factors affecting the success of oocyte transfer in clinical program
13 for subfertile mares. **Theriogenology**, v. 64, p 519 – 527, 2005.
- 14 DELL’AQUA, J.A.; CHAVES, M.M.C.; MEDEIROS, A.S.L.; DELL’AQUA, C.P.F.;
15 PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Use of a new formulation of long acting
16 progesterone in non cycling recipient mares, **Weva**, 321, 2009.
- 17 DOWSETT, M.A.; WOODWARD, R.A.; BODERO, D.A. A study of nonsurgical
18 embryo transfer in the mare. **Theriogenology**, v.31, 1989. p 631-642.
- 19 HAYES, K.E.N., PIERSON, R. A. Effects of estrus cycle and season on ultrasonic
20 uterine anatomy in mares. **Theriogenology**, v.24, p.465-477, 1985.
- 21 HINRICHS, K. Embryo transfer in the mare: a status report. **Animal Reproduction**
22 **Science**. Amsterdam, v. 33, n 1 p.227-240, Oct 1993.
- 23 HUGHES, J. P.; STABENFELDT, D. H.; EVANS, J. W. (1972). Clinical and endocrine
24 aspects of the estrous cycle of the mare. **Proceedings of the American Association of**
25 **Equine Practitioners**. 119-152.
- 26 IULIANO, M. F., SQUIRES, E. L.; COOK, V.M. Effect of age of equine embryos and
27 method of transfer on pregnancy rate. **Journal of Animal Science**, Champaign, v 60, n
28 1, p 258 – 263, jan. 1985.

- 1 KAERCHER F.; SIQUEIRA M.; MERCADANTE, A.; FIGUEIREDO, T.; WEISS,
2 R.R.; SIQUEIRA, F.; KOZICKI, L.E. Embryo transfer in no cycling Crioula and
3 Quarter horse breeds treated with estradiol cypionate and long-acting progesterone,
4 **Braz. arco. biol. tecno.** Vol 54 n6. Curitiba, novembro/dezembro, 2011.
- 5 JASKO, D.J. Comparison of pregnancy rates following nonsurgical transfer of day 8
6 equine embryos using various transfer devices. **Theriogenology**, v.58, p.713-715, 2002.
- 7 MACHADO, M.S. **Avaliação da dinâmica folicular em éguas superovuladas com**
8 **extrato de pituitária equina e FSH equino purificado.** Botucatu, 2004.
- 9 MCKINNON, A.O.; CARNEVALE, E.M. Ultrasonography. In : Mckinnon, A.O.
10 **Equine Reproduction.**, p.211-220. 1993.
- 11 MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo
12 transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy
13 maintenance. **Theriogenology**, v.29, p1055 – 1063, 1988.
- 14 PELEHACH, L.M.; GREAVES, H.E.; PORTER, M.B.; DESVOUGERS, A. The role of
15 estrogen and progesterone in the induction and dissipation of uterine edema in mares.
16 **Theriogenology**, v 58, p 441- 444, 2002.
- 17 ROCHA FILHO, N.A.; PESSÔA, M.A.; GIOSO, M.M.; ALVARENGA, M.A. Transfer
18 of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting
19 progesterone. **Anim Reprod Sci**, v.1, p 91-95, 2004.
- 20 SAMPER, J. C. Ultrasonographic appearance and the pattern of uterine edema to time
21 ovulation in mares. **Proceedings of American Association Equine Practice.** V.43, p
22 189 – 191, 1997.
- 23 SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; MCCUE P.M.; BRUEMMER, J.E. Embryo
24 technologies in the horse. **Theriogenology** , v.59, p.151-170, 2003.
- 25 SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine
26 embryo transfer. **Theriogenology** , Los Altos, v. 51, p. 91 – 104, 1999.

1 SQUIRES, E. L.; IULIANO, M. F.; SHIDELER, R.K. Factores affecting the sucess of
2 surgical and nonsurgical equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 17. N 1, p. 35-41,
3 1982.

4 STOUT , T. A.E. Equine embryo transfer : review of developing potential. **Equine**
5 **Veterinary Journal**. V. 38, n. 5, p 467 – 478, 2006.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1 Normas da revista Veterinária e Zootecnia

2

3 Diretrizes para Autores

4 • Artigos Científicos

5 Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

6 **1. Página de rosto, com:** Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol,
7 fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e
8 centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da
9 pesquisa, como primeira chamada de rodapé;

10 Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação,
11 encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho,
12 antes das referências, a data de aprovação.

13

14 **2. Página com resumo, abstract e resumen:** Tanto o resumo, como o abstract e o
15 resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no
16 máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia,
17 resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e
18 espaço simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução
19 fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o
20 resumo em português, inglês e espanhol.

21 Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave
22 que identifiquem o conteúdo do texto.

23

24 **3. A estrutura do artigo deverá conter:**

25

26 **Introdução:** Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à
27 literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os
28 objetivos do trabalho.

29

30 **Material e Métodos:** Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de
31 forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos
32 utilizados, inclusive os estatísticos.

33

1 **Resultados:** Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem
2 interpretações e comparações. Poderá ser sob a forma de tabelas, no máximo de cinco,
3 ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas
4 de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas
5 Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a forma de figuras, nos casos de
6 gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no
7 máximo de seis, e citadas no texto como Figura.

8
9 **Discussão:** Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com
10 a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e
11 a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

12
13 **Conclusões:** É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

14
15 **Referências:** Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver
16 (<http://www.icmje.org/>).

17
18 Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos,
19 Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias,
20 desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço simples, mantendo margens
21 de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho
22 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de
23 identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a
24 contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas no
25 decorrer do texto. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no
26 formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são
27 válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais
28 devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

29