

GILBERTO GUIMARÃES LOURENÇO

**CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS E TAXA DE GESTAÇÃO
DE ÉGUAS RECEPTORAS DA RAÇA MANGALARGA
MARCHADOR TRATADAS COM GONADOTROFINA
CORIÔNICA HUMANA (hCG)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

L892c
2010

Lourenço, Gilberto Guimarães, 19-
Características reprodutivas e taxa de gestação de éguas
receptoras da raça Mangalarga Marchador tratadas com
Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG). / Gilberto Guimarães
Lourenço. – Viçosa, MG, 2010.
ix, 42f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.36-42.

1. Equino - Reprodução. 2. Transferência de embriões.
3. hCG. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.20824

GILBERTO GUIMARÃES LOURENÇO

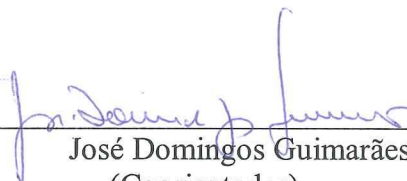
**CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS E TAXA DE GESTAÇÃO
DE ÉGUAS RECEPTORAS DA RAÇA MANGALARGA
MARCHADOR TRATADAS COM GONADOTROFINA
CORIÔNICA HUMANA (hCG)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de dezembro de 2010.



Ciro Alexandre Alves Torres
(Coorientador)



José Domingos Guimarães
(Coorientador)



Eduardo Paulino da Costa



Júlio César Ferraz Jacob



Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Orientador)

Ao meu pai, Sebastião Lourenço (in memoriam), quem primeiro me fez gostar dos cavalos, e especialmente à minha mãe, Carmen Guimarães Lourenço, por nunca ter medido esforços para que eu pudesse me formar e por muitas vezes abrir mão de seus sonhos para realizar os sonhos de seus filhos.

À minha querida esposa, Lívia, que tanto amo, companheira incondicional, incentivadora e paciente. Aos meus irmãos, Gilton, Gisele, Gigi, Vanim e Lado, que tanto me apóiam e torcem por mim e nos quais sempre me espelhei.

Aos cavalos, criaturas inigualáveis que conquistam sem espadas e voam sem asas.

GILBERTO GUIMARÃES LOURENÇO

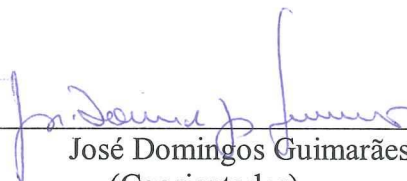
**CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS E TAXA DE GESTAÇÃO
DE ÉGUAS RECEPTORAS DA RAÇA MANGALARGA
MARCHADOR TRATADAS COM GONADOTROFINA
CORIÔNICA HUMANA (hCG)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de dezembro de 2010.



Ciro Alexandre Alves Torres
(Coorientador)



José Domingos Guimarães
(Coorientador)



Eduardo Paulino da Costa



Júlio César Ferraz Jacob



Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter transcorrido tudo bem na realização deste trabalho e por me dar disposição para trabalhar sempre.

Ao professor Giovanni Ribeiro de Carvalho, pela orientação, pela confiança, pelo exemplo de profissional e de ser humano, pela paciência e compreensão e por ter me indicado ao meu primeiro emprego, no qual estou até hoje.

Aos professores participantes da banca examinadora, Prof. Dr. Júlio César Ferraz Jacob, Prof. Dr. Eduardo Paulino da Costa, Prof. Dr. José Domingos Guimarães e Prof. Dr. Ciro Alexandre Alves Torres.

Ao chefe do Setor de Equideocultura da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Fernando Antônio de Freitas, nobre amigo e companheiro, sempre incentivador.

À minha esposa, Lívia Maria Rosa Acha, pelo apoio, pela compreensão, pelo companheirismo e pelo amor, e por ter revisado este trabalho.

À minha família, por entender os momentos de ausência e pelo incentivo constante.

Ao proprietário do Haras Laglória, Sr. Lael Vieira Varella Filho, por ter permitido a realização deste experimento e pela amizade.

Ao amigo Renan Reis Oliveira, por ter participado ativamente na realização deste trabalho, nas coletas de campo e nos exames laboratoriais e pela amizade.

Aos amigos Reno Roldi de Araújo e Rafael Guedes Goretti, pelo compartilhamento de material didático, pela amizade e pelo incentivo.

Aos colegas de mestrado Pedro Ker e Guilherme, pelo companheirismo.

Ao amigo Dr. Gustavo Mendes Gomes (Bigu), pelos ensinamentos.

Ao Sr. Carlos Cardoso, que gentilmente cedeu os kits para análises hormonais.

A todos os funcionários do Haras Laglória, em especial ao Carlos Willians (Carlinho) e ao José Cláudio de Oliveira Filho (Negão), companheiros do dia a dia.

Aos estagiários que estiveram presentes neste período.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Foliculogênese.....	3
2.2 Desenvolvimento folicular.....	3
2.3 Ovulação.....	4
2.4 Corpo lúteo.....	5
2.5 Ciclo estral.....	8
2.6 Progesterona.....	10
2.7 Gonadotrofina coriônica humana.....	11
2.8 Seleção de receptoras de embrião.....	12
2.9 Taxa de gestação.....	13
3 HIPÓTESES.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Local e período.....	15
4.2 Animais.....	15
4.3 Manejo reprodutivo.....	15
4.4 Delineamento experimental.....	16
4.4.1 Grupos experimentais.....	16
4.4.2 Avaliação dos órgãos reprodutivos.....	16
4.4.2.1 Tônus do útero.....	17
4.4.2.2 Tônus da cérvix.....	17
4.4.2.3 Ecotextura uterina.....	17
4.4.2.4 Corpo lúteo.....	18
4.4.2.5 Ovários.....	18
4.4.2.6 Qualidade dos embriões.....	18
4.4.2.7 Diagnóstico de gestação.....	19
4.4.2.8 Assincronia entre doadoras e receptoras.....	19

	Página
4.4.3 Coleta e transferência dos embriões	19
4.4.4 Dosagem hormonal	20
4.4.5 Análises estatísticas.....	20
5 RESULTADOS	22
5.1 Tônus uterino	22
5.2 Edema uterino	22
5.3 Tônus da cérvix.....	23
5.4 Ecogenicidade do CL.....	23
5.5 Diâmetros, perímetro e área do CL.....	24
5.6 Assincronia entre doadoras e receptoras	25
5.7 Qualidade embrionária.....	26
5.8 Progesterona.....	26
5.9 Taxa de prenhez	27
6 DISCUSSÃO	28
5 CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Alfa
β	Beta
μm	Micrômetro
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide desidrogenase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IM	Intramuscular
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
n	Número de unidades experimentais
ng	Nanogramas
P	Nível de significância
P4	Progesterona
PBR	Receptor benzodiazepínico tipo periférico
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PKA	Proteína kinase A
RIA	Radioimunoensaio
SAS	<i>Statistical Analysis System</i> (Sistema de Análise Estatística)
StAR	Proteína esteroidegênica reguladora aguda
TE	Transferência de embriões
UI	Unidades internacionais

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Tônus uterino nos dias 4(D4), 8(D8) e 13(D13) em éguas Mangalarga Marchador tratadas com hCG e controle (solução fisiológica)	22
2 Edema uterino nos dias 4(D4), 8(D8) e 13(D13) em éguas Mangalarga Marchador tratadas com hCG e controle (solução fisiológica)	23
3 Tônus da cérvix nos dias 4(D4), 8(D8) e 13(D13) em éguas Mangalarga Marchador tratadas com hCG e controle (solução fisiológica) e conforme agrupamento de gestantes e não gestantes	23
4 Ecogenicidade do CL nos dias 4(D4), 8(D8) e 13(D13) em éguas Mangalarga Marchador tratadas com hCG e controle (solução fisiológica)	24
5 Diâmetro do CL nos dias 4(D4), 8(D8) e 13(D13) em éguas Mangalarga Marchador tratadas com hCG e controle (solução fisiológica)	24
6 Perímetro do CL nos dias 4(D4), 8(D8) e 13(D13) em éguas Mangalarga Marchador tratadas com hCG e controle (solução fisiológica)	24
7 Área do CL nos dias 4(D4), 8(D8) e 13(D13) em éguas Mangalarga Marchador tratadas com hCG e controle (solução fisiológica)	25
8 Grau de assincronia entre éguas doadoras e receptoras da raça Mangalarga Marchador, conforme os grupos: hCG e solução fisiológica.....	25
9 Distribuição de assincronia entre éguas doadoras e receptoras da raça Mangalarga Marchador nos grupos hCG e solução fisiológica	25
10 Número de embriões de éguas da raça Mangalarga Marchador transferidos em relação à sua classificação (Grau 1, 2 ou 3) nos grupos hCG e solução fisiológica	26
11 Concentração plasmática de progesterona (ng/mL) nos dias 0(D0), 4(D4), 8(D8) e 13(D13) pós-ovulação nos grupos hCG e solução fisiológica	26
12 Número e percentagem de animais gestantes e não gestantes da raça Mangalarga Marchador nos grupos hCG e solução fisiológica	27

RESUMO

LOURENÇO, Gilberto Guimarães, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2010. **Características reprodutivas e taxa de gestação em éguas receptoras da raça Mangalarga Marchador tratadas com gonadotrofina coriônica humana (hCG)**. Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Coorientadores: Ciro Alexandre Alves Torres e José Domingos Guimarães.

Neste estudo avaliou-se a gonadotrofina coriônica humana (hCG), no intuito de melhorar as condições reprodutivas de fêmeas equinas candidatas a receptoras de embriões. No quarto dia após a ovulação (D4), as éguas receptoras foram divididas em dois grupos: G1-controle (n = 24) – administração intramuscular de 2 mL de solução fisiológica e G2 (n = 26) – administração intramuscular de 2.000 UI de hCG (Chorulon[®]). Nos dois grupos foram avaliadas, no D4, D8 e D13, por palpação retal e/ou ultras-sonografia, as seguintes características reprodutivas: tônus uterino, tônus cervical, edema uterino; diâmetro do corpo lúteo (CL), perímetro do CL, área do CL e diâmetro do maior folículo em cada ovário. Além disso, foram avaliados a qualidade dos embriões transferidos e o grau de assincronia entre receptora e doadora. Amostras de sangue das receptoras foram coletadas nos dias D0, D4, D8 e D13, para dosagem de progesterona. Constatou-se maior concentração de progesterona plasmática ($p < 0,05$) no grupo-controle (G1) nos dias D0 e D4, em relação ao tratado (G2), porém nos dias D8 e D13 não houve diferenças significativas entre os grupos. Não foram encontradas diferenças entre os grupos para as características de tônus uterino e cervical, edema e ecotextura uterina, diâmetro, perímetro e área do corpo lúteo ($p > 0,05$). O grau de assincronia entre doadoras e receptoras não diferiu ($p > 0,05$) entre os tratamentos e os embriões que as receptoras receberam tiveram qualidade semelhante ($p > 0,05$). A porcentagem de prenhez foi de 84,6% (22/26) para o grupo tratado e de 75% (18/24) para o grupo-controle, não tendo sido observadas diferenças ($p > 0,05$). Nas condições deste estudo, conclui-se que a hCG não induziu ao aumento na concentração plasmática de progesterona, não elevou a taxa de prenhez dos animais tratados e ainda não induziu a modificações nas características reprodutivas de receptoras equinas em diestro.

ABSTRACT

LOURENÇO, Gilberto Guimarães M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2010. **Reproductive characteristics and pregnancy rates in mares of Mangalarga Marchador breed, treated with hCG.** Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-advisers: Ciro Alexandre Alves Torres and José Domingos Guimarães.

The aim of the present study was to improve reproductive conditions of mares candidates as embryo recipient through hCG (human chorionic gonadotrophin) administration. Four days after ovulation (D4), recipient mares were divided in two groups: G1 – control (n = 24) – administration of 2 mL of physiologic solution (i.m) and G2 – treatment (n = 26) – administration of 2.000 IU of hCG (Chorulon[®]; i.m). Uterine and cervical tonus, uterine echotexture and edema, diameter of corpus luteum (CL), CL circumference and area, and diameter of the largest follicle in each ovary were evaluated in both groups on days 4, 8 and 13 (day 0 = ovulation) by transretal palpation and/or ultrasonography. Additionally, quality of transferred embryos and asynchrony between recipient and donor were also evaluated. Blood samples from recipient mares were collected on D0, D4, D8 and D13 for progesterone assay. Higher concentration of plasmatic progesterone ($p < 0,05$) was observed in G1 on D0 and D4 than in treated group (G2), although no significant difference was observed on D8 and D13 between groups. No difference ($p > 0,05$) were observed between groups for uterine and cervical tonus characteristics, uterine edema and echotexture, diameter, circumference and area of the corpus luteum. The degree of asynchrony between recipients and donors and the quality of embryos transferred to recipients did not differed ($p > 0,05$) between groups. The pregnancy rates were 84,6% (22/26) and 75% (18/24) for treated and control groups, respectively ($p > 0,05$). In conclusion, based on the conditions of the present study, treatment with hCG did not improve plasma progesterone concentration, pregnancy rate of recipient mares and did not change reproductive characteristics of recipient mares in diestrus.

1 INTRODUÇÃO

A equideocultura tem apresentado importância crescente no agronegócio brasileiro. Diferentemente da imagem aristocrata e distante da realidade da maior parte da população, a equideocultura envolve diferentes classes sociais e beneficia milhares de famílias. Um estudo em que a indústria do cavalo no Brasil foi avaliada demonstrou que o rebanho efetivo era de cerca de 8,5 milhões de equinos e 1,2 milhão de muaras e jumentos. Esse segmento agropecuário é responsável pela geração de 600 mil empregos diretos e 3,2 milhões de empregos indiretos (CNA, 2006).

A espécie equina tem lugar importante no agronegócio, sendo utilizada para esporte, lazer e trabalho. Deste modo, para que se atinjam metas comerciais de criação, a otimização nos processos reprodutivos deve ser almejada, desde a forma mais simples, representada pela monta natural, até as diferentes biotécnicas já desenvolvidas.

A utilização de biotecnologias reprodutivas é necessária para alcançar alto potencial genético nos sistemas de criação de equinos. A transferência de embriões (TE) é, sem dúvida, a biotécnica da reprodução aplicada às fêmeas com maior avanço para os criatórios, pois possibilita a produção de mais de um potro por égua ao ano. Além disso, permite que as éguas participem de competições esportivas, o que seria praticamente impossível se elas estivessem gestantes.

Fatores ligados à técnica de coleta, idade (dia da coleta), tamanho e classificação do embrião, idade do corpo lúteo da receptora, bem como o método de transferência, interferem nos índices de recuperação embrionária e de prenhez (FLEURY *et al.*, 2001).

O sucesso de um programa de transferência de embriões depende de diversos fatores: da égua doadora, da égua receptora, do garanhão, da manipulação e manutenção do embrião, da técnica de transferência, das condições climáticas, das condições nutricionais dos animais e, inclusive, da capacidade do técnico. Certamente o fator mais importante está relacionado à égua receptora, pois é esta que irá reconhecer o embrião e fornecer condições necessárias para o seu desenvolvimento.

É fundamental a utilização de éguas receptoras com órgãos genitais em condições adequadas e responsáveis aos estímulos da progesterona, de preferência entre quatro e nove dias após a ovulação.

Atualmente o grande entrave para a maior utilização da técnica de TE pelos criadores são as receptoras. Para cada embrião a ser transferido seria ideal ter três receptoras sincronizadas com a doadora, para serem avaliadas anteriormente à

inovação. Porém, o alto custo da manutenção dessas fêmeas impossibilita muitos criadores utilizarem essa técnica com bons resultados. Além disto, muitas vezes os resultados de campo não são satisfatórios, justamente pelo fato de o técnico não ter opção de escolha de receptoras no dia da transferência.

Visando elevar a taxa de concepção, pesquisadores têm buscado aumentar a produção de progesterona (animais com maiores concentrações de progesterona apresentam maiores taxas de prenhez, tônus uterino e cervical mais elevados e morfoecogenicidade uterina mais homogênea) (CARNEVALE *et al.*, 2000). Para isto tem-se utilizado a aplicação de fármacos, como antiprostaglandínicos, progesterona e, mais recentemente, a hCG e análogos do GnRH. Estes estudos vêm apresentando resultados de grande importância, uma vez que o aumento da eficiência da técnica torna possível diminuir o número de receptoras por embrião inovulado, o que minimiza os custos e permite que maior quantidade de criatórios utilize essa técnica (FLEURY *et al.*, 2007).

Acredita-se que a utilização da hCG em éguas receptoras de embriões possa melhorar as características reprodutivas e aumentar a taxa de concepção para animais tratados no final do estro ou início do diestro (FLEURY *et al.*, 2007).

A hCG em éguas estimula a transformação de células luteais pequenas em grandes, contribuindo assim para o aumento na produção de progesterona (KELLY *et al.*, 1988).

Após a administração de hCG em culturas de células luteais *in vitro* ocorreu aumento na secreção de progesterona (KELLY *et al.*, 1988). Os autores também observaram que a administração de hCG em éguas após a ovulação promoveu aumento da concentração plasmática de progesterona. A progesterona, produzida pelo corpo lúteo, é o hormônio cuja secreção é essencial para o início e a manutenção da gestação em fêmeas equinas (ARRUDA *et al.*, 2001).

A continuidade de estudos que esclareçam ainda mais os mecanismos intrínsecos dos processos fisiológicos relacionados com a transferência de embriões na espécie equina é de suma importância. Assim, será possível explorar de forma racional as características genéticas melhoradoras das doadoras e utilizar éguas de baixo valor zootécnico (receptoras). O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência da gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre características reprodutivas como: tônus uterino e cervical, tamanho e morfoecogenicidade de corpo lúteo, produção plasmática de progesterona, além de taxas de prenhez em éguas receptoras de embriões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Foliculogênese

O crescimento folicular pode ser dividido em dois períodos. A primeira fase ocorre independentemente dos hormônios hipofisários FSH e LH. É quando os folículos primordiais começam a crescer. As células foliculares se multiplicam para se diferenciarem em células da teca e da granulosa. Ao mesmo tempo, os oócitos começam a maturar e aumentar de tamanho. Após algum tempo de crescimento, a secreção do fluido folicular inicia a disjunção das células e o folículo torna-se um folículo antral. Nesse momento seu tamanho será de 0,2 a 0,4 cm (DRIANCOURT *et al.*, 1982).

Nas éguas, os folículos antrais tornam-se sensíveis às gonadotrofinas quando seus diâmetros variam de 5 a 10 mm. Nesse momento inicia-se o segundo estágio do crescimento folicular, chamado de emergência folicular, que ocorre uma ou duas vezes por ciclo na maioria das éguas (CHAVATTE; PALMER, 1998).

A divergência folicular é outro processo que ocorre nas ondas de crescimento. Nesse momento o maior folículo mede cerca de 22-23 mm de diâmetro e o FSH atinge concentrações que são suficientes para manter o crescimento do folículo dominante, mas são muito baixas para sustentar o crescimento dos futuros folículos subordinados, que acabam regredindo (DONADEU; GINTHER, 2003).

Após a divergência folicular, o folículo dominante passa por uma troca na dependência gonadotrópica, ou seja, o folículo que inicialmente foi dependente de FSH passa a ser predominantemente dependente de LH. A aquisição de receptores de LH pelas células da granulosa do folículo dominante, junto com os receptores de FSH remanescentes, permite que o crescimento folicular continue apesar das baixas concentrações de FSH. Os outros folículos tornam-se atrésicos e degeneram lentamente (GINTHER, 1992).

2.2 Desenvolvimento folicular

O crescimento e a maturação folicular representam uma série de transformações subcelulares e moleculares, de forma sequencial, de vários componentes do folículo: o oócito e as células da granulosa e da teca (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Essas

transformações são controladas por diversos fatores intraovarianos, fatores intrafolículos e sinais hormonais, que levam à secreção de andrógenos e estrógenos.

O crescimento folicular envolve a proliferação e a diferenciação induzidas hormonalmente, tanto das células da teca como da granulosa. Esses processos levam à habilidade crescente dos folículos para produzir estradiol e responder às gonadotrofinas. A produção de estradiol pelo folículo induz ao aparecimento de receptores para LH, necessário para a ovulação e luteinização (GINTHER, 1992).

O crescimento e a maturação folicular, a ovulação e a luteinização das células foliculares dependem de padrões apropriados de secreção, concentrações suficientemente elevadas e proporções adequadas de FSH, LH e outros hormônios no soro. Estes hormônios incluem esteroides, prostaglandinas e glicoproteínas (McKINNON; VOSS, 1993).

O desenvolvimento folicular ocorre em ondas. Segundo Ginther (1992), as ondas foliculares podem ser classificadas como maiores, quando apresentam folículos dominantes, e menores, nas quais não se observa dominância folicular. As ondas maiores podem ser primárias, quando o folículo dominante é ovulatório, ou secundárias, quando esse folículo é anovulatório ou dá origem a uma ovulação de diestro.

O FSH tem função essencial no início da formação do antro folicular. Essa gonadotrofina estimula a mitose em células da granulosa e da teca e a formação do fluido folicular. Além disso, o FSH induz à sensibilidade das células da granulosa ao LH (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A inibina é um hormônio glicoproteico que inibe a secreção de FSH pela hipófise. Nos mamíferos a inibina é secretada pelas células da granulosa, e as pesquisas têm demonstrado que em éguas provavelmente a inibina seja o fator de maior influência no controle do FSH (MILLER *et al.*, 1981).

Gastal *et al.* (2000) ressaltam que o LH não está envolvido no início da divergência folicular, pois os folículos não apresentam receptores para este hormônio, no entanto ele é o principal agente responsável pelo crescimento do folículo dominante.

2.3 Ovulação

A ovulação na égua ocorre na fossa ovulatória, que se localiza no bordo côncavo ou ventral do ovário. Um folículo recentemente ovulado é palpado como uma profunda depressão na superfície do ovário e enche-se com sangue oriundo da ruptura dos vasos

da teca interna. As células da granulosa e da teca se luteinizam dentro de 8 a 14 horas após a ovulação (HUGHES, 1972). O processo ovulatório resulta das interações entre o LH e o AMP cíclico, as prostaglandinas e as enzimas proteolíticas. O aumento prolongado do LH, que promove a ovulação, também estimula as células da granulosa a se transformarem em células luteínicas, que invadem e proliferam no coágulo produzido dentro da cavidade folicular, para assim formar o corpo hemorrágico e na sequência o corpo lúteo (GINTHER, 1992).

A progesterona estimula a ação da enzima collagenase na parede folicular e o estradiol aumenta o edema da teca. A $\text{PGF}_{2\alpha}$, secretada pelas células granulosas, também tem efeito sobre a dissolução da parede folicular, participando da ruptura da parede do folículo, e a PGE_2 participa na transformação das células granulosas em células luteínicas. Também ativam o plasminogênio para dar plasmina, que está envolvida na migração celular (PGE_2), e estimulam as contrações ovarianas, que facilitam a ruptura folicular ($\text{PGF}_{2\alpha}$) (GONZÁLEZ, 2002).

Os fatores que regulam a proliferação das células luteínicas pequenas e dos fibroblastos não estão bem caracterizados, porém devem envolver fatores de crescimento fibroblástico (REDMER & REYNOLDS, 1996), hormônio do crescimento (GH) (JUENGEL *et al.*, 1995) e LH. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um mitógeno específico das células endoteliais, é provavelmente o regulador primário da proliferação dessas células no de CL.

Essa organização celular altamente vascularizada permite demanda metabólica intensa, que consome de duas a seis vezes mais oxigênio por unidade de peso que o fígado, os rins ou o coração (DOUGLAS & GINTHER, 1976). Na égua, no entanto, que ovula na fossa ovulatória e desenvolve corpos lúteos secundários durante a prenhez, as células da granulosa e da teca luteinizadas contribuem para a formação do corpo lúteo maduro (McCRACKEN *et al.*, 1999).

2.4 Corpo lúteo

O corpo lúteo (CL) é uma estrutura glandular transitória que inicia seu desenvolvimento no ovário imediatamente após a ovulação (BERTAN, 2006). Segundo Davis e Rueda (2002), a formação do CL resulta do crescimento, da diferenciação, da reorganização e da luteinização das células da teca e da granulosa remanescentes do

folículo ovulatório, na maioria das espécies. O CL tem a capacidade de sintetizar vários hormônios, sendo a progesterona (P4) o principal.

A progesterona, produzida pelo corpo lúteo, é o hormônio cuja secreção é essencial para o início e a manutenção da gestação em fêmeas equinas (ARRUDA *et al.*, 2001). Os autores, comparando a morfoecogenicidade do corpo lúteo e a produção de progesterona, notaram que um dia após a ovulação 52,8% dos corpos lúteos apresentavam pontos ecogênicos e anecoicos com visualização definida. Sugeriram, então, que nesse período há a organização do corpo hemorrágico.

O corpo lúteo equino atinge dimensão média de 29,01mm entre os dias 0 e 9 após a ovulação, com variações detectadas de 25,90 a 31,50 mm dentro do mesmo período (ARRUDA *et al.*, 2001).

O CL é uma estrutura endócrina formada por células luteais esteroidogênicas pequenas e grandes, que associadas aos fibroblastos e à ampla rede de capilares constituem uma estrutura especializada na síntese de progesterona por meio de esteroidogênese (BERTAN *et al.*, 2006). Em éguas, a esteroidogênese pelo corpo lúteo parece estar associada às células da granulosa, pois as células da teca começam a se degenerar momentos antes da ovulação, estando completamente degeneradas em 24 horas. Por outro lado, as células da granulosa sofrem aumento de tamanho e mudanças citológicas caracterizadas pelos efeitos da luteinização, que só irão se completar três dias após a ovulação (NISWENDER; NETT, 1993).

Em estudo realizado por Broadley *et al.* (1994), células luteais obtidas por dissociação mecânica com intensa quantidade de células luteais grandes apresentaram maior ligação com LH do que as células obtidas por dissociação da colagenase, predominando células luteais pequenas. Os autores sugeriram que as células luteais grandes de fêmeas equinas apresentam receptores para o LH.

Kelly *et al.* (1988) observaram aumento na secreção de progesterona após a administração de hCG em culturas de células luteais *in vitro*. Os autores verificaram que a administração de hCG exógeno em éguas após a ovulação leva ao aumento da concentração plasmática de progesterona. Como esse aumento ocorreu somente quatro dias após a primeira aplicação, acredita-se que a elevação na produção de progesterona esteja relacionada a mudanças funcionais no corpo lúteo nesse período.

As células luteais grandes e pequenas apresentam diferenças na sua capacidade esteroidogênica, devendo ser ressaltado que mudanças na distribuição desses grupos

celulares podem afetar dramaticamente a produção de progesterona pelo corpo lúteo (KELLY *et al.*, 1988; BROADLEY *et al.*, 1994).

A hCG em éguas estimula a transformação de células luteais pequenas em grandes, contribuindo assim para o aumento na produção de progesterona (KELLY *et al.*, 1988).

Em bovinos e ovinos, cuja produção de progesterona foi mais bem estudada, o colesterol sintetizado no fígado é transportado na forma de lipoproteínas para todos os tecidos esteroideogênicos (KRISANS, 1996). O colesterol pode chegar às células luteais na forma de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). Em condições normais, a maioria do colesterol utilizado na esteroideogênese é oriunda do sistema circulatório sob a forma de LDL e de HDL (NISWENDER, 2002).

A entrada da LDL para o interior da célula luteal ocorre através de endocitose; o endossomo combina com o lisossomo, no qual o LDL dissocia do receptor, e sua molécula é quebrada, liberando aproximadamente 2.500 moléculas de colesterol livre, disponíveis para a célula (BROWN; GOLDSTEN, 1986).

O HDL extracelular se liga a proteínas do plasma, assim como o colesterol, mas é transportado para o interior da célula por um mecanismo ainda não definido, e que aparentemente não ocorre por endocitose (LESTAVEL; FRUCHART, 1994).

O colesterol livre no interior da célula pode ser utilizado na esteroideogênese, na formação da membrana celular, ou biotransformado em éster de colesterol, que funciona como reserva de colesterol intracelular (JOHNSON *et al.*, 1997).

O fator limitante na esteroideogênese está relacionado com o transporte do colesterol (livre no interior da célula) até a mitocôndria, onde vai ser biotransformado em pregnenolona (STEVENS; LAMBETH, 1993; NISWENDER, 2002). O transporte do colesterol para mitocôndria é realizado principalmente pela proteína esteroideogênica reguladora aguda (STAR) (FITZ *et al.*, 1982).

O LH se liga ao receptor localizado na membrana celular, ativando a adenilato ciclase e promovendo aumento na concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que é responsável pela ativação da proteína kinase A (PKA). Com o aumento da PKA ocorre maior disponibilidade de colesterol celular, pois essa enzima promove a transformação do éster de colesterol em colesterol livre e ácidos graxos por meio da enzima colesterol esterase. A PKA também é responsável pela fosforilação da StAR, que quando fosforilada promove aumento no transporte do colesterol para o interior da membrana mitocondrial, onde a enzima P450_{scc} cliva o colesterol, transformando-o em

pregnenolona, que é transportada para o retículo endoplasmático liso e por ação da enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD) vai dar origem à progesterona (PAPADOPOULUS *et al.*, 1997; NISWENDER *et al.*, 2000; NISWENDER, 2002).

Durante o ciclo estral ocorre extensa angiogênese no CL (HANSEL & BLAIR, 1996), sendo esta neovascularização essencial para o suprimento do substrato necessário para a biossíntese da P4 e para a secreção de outros hormônios esteroides pelas células luteais. Pode-se assumir que a circulação sanguínea exerça papel vital para o funcionamento apropriado do CL (CARR *et al.*, 1982).

A ecogenicidade e o diâmetro do corpo lúteo variam de acordo com o dia do ciclo estral. Em média, grande ecogenicidade é observada nos primeiros seis dias e no final do diestro. Já o tamanho máximo do corpo lúteo é observado durante o meio da fase luteínica, quando há maior produção de progesterona (GINTHER *et al.*, 2009).

A função principal do corpo lúteo é a produção de progesterona. A partir da necessidade prática de determinação da capacidade do corpo lúteo em produzir concentrações adequadas de progesterona, sugeriu-se que a ecogenicidade do corpo lúteo e o seu diâmetro poderiam ser indicativos de seu funcionamento (ARRUDA *et al.*, 2001).

2.5 Ciclo estral

As fêmeas equinas apresentam atividade sexual durante a fase de maior luminosidade do ano, sendo classificadas como monovulatórias poliéstricas estacionais. Elas atingem a maturidade sexual (puberdade) por volta dos dois anos de idade, podendo ser esta alterada pela influência das condições corporais, do peso, da concentração de energia, dos feromônios, da raça e da estação do ano (MCKINNON; VOSS, 1993).

O ciclo estral na égua é definido como o período entre uma ovulação e a próxima (HUGHES *et al.*, 1986), quando acompanhada de sinais de estro e concentração sérica de progesterona menor que 1ng/mL. A ovulação e a liberação do oócito ocorrem aproximadamente em 24 a 48 horas antes do período final de receptividade ao macho (MCKINNON; VOSS, 1993). O ciclo reprodutivo da égua está sujeito à maior variabilidade que o de outros animais domésticos (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O estro é caracterizado pela receptividade da fêmea ao garanhão, pelo relaxamento da cérvix, pela presença de folículo dominante no ovário e pelo edema endometrial. Nesse momento os órgãos genitais são preparados para aceitar e transportar os espermatozoides e é o período em que ocorre a ovulação. O comportamento de estro dura em torno de cinco a sete dias, mas pode variar amplamente de acordo com cada égua (DAELS; HUGHES, 1993).

A elevação das concentrações de estrógenos durante a fase estral é também responsável pela instalação do edema uterino, que tende a diminuir nos dois dias que antecedem à ovulação (MCKINNON; VOSS, 1993).

O diestro é caracterizado por não haver receptividade ao garanhão, pela presença de CL, pelo cérvix firme, fechado, e pela ausência de edema endometrial (concentração sanguínea de progesterona $>2\text{ng/mL}$). As éguas sob influência do estrógeno têm hiperplasia edematosa das pregas endometriais (MALINOWSKY, 2002).

O ciclo estral em éguas tem duração média de $21,7 \pm 3,5$ dias. A fase folicular ou de estro tem duração média de $6,5 \pm 2,6$ dias e a fase luteal ou de diestro, $14,9 \pm 2,8$ dias durante a estação fisiológica de monta (GINTHER, 1992).

Entre os dias 1 e 2 após a ovulação o corpo lúteo em formação começa a produzir progesterona, e quando a concentração plasmática supera 1 ng/mL inicia-se o diestro, desaparecendo as características e o comportamento associados ao estro. A concentração de progesterona é incluída na definição de ciclo estral, porque ocasionalmente ocorrem ovulações no meio do ciclo (ovulações diéstricas), quando as concentrações de progesterona estão elevadas (NEELY *et al.*, 1979).

As alterações notadas na palpação uterina são usadas clínica e experimentalmente para determinar o estágio do ciclo estral nas éguas. Durante o estro, o tônus uterino é relativamente flácido e vai se tornando mais tenso durante o diestro, até por volta do dia 16 a 25 de gestação, quando o útero apresenta sua tensão máxima. Durante o início da gestação o tônus uterino é de suma importância para a fixação e orientação da vesícula embrionária (HAYES; GINTHER, 1986).

Na fase luteal o corpo lúteo produz progesterona em quantidades crescentes do segundo ao décimo dia pós-ovulação. Essa secreção se mantém estável até o 12º dia, quando ocorre queda acentuada nas concentrações plasmáticas de progesterona. O final da fase luteal é marcado pela regressão do CL (luteólise) 14 a 15 dias após a ovulação, quando a égua retorna ao estro (MCKINNON; VOSS, 1993). A luteólise é desencadeada pelo início da produção de estrógeno pelo folículo dominante, que por sua vez aumenta

os receptores de ocitocina no endométrio, e esta induz à síntese de prostaglandina pelo endométrio (GINTHER, 1992).

2.6 Progesterona

A progesterona é o hormônio responsável pela manutenção da gestação. É produzida pelo corpo lúteo e comanda a secreção do fluido uterino. Nos cornos e no corpo uterino são encontradas as maiores concentrações de receptores para progesterona. É por meio desses receptores que a progesterona promove a secreção favorável ao desenvolvimento do embrião. A concentração de progesterona necessária para manutenção da gestação é bastante variável e interfere no metabolismo embrionário, provavelmente por meio da produção de proteínas pelo útero (BALL, 1993).

Dentre as ações fisiológicas da progesterona encontram-se o crescimento das glândulas uterinas e mamárias e a estimulação das glândulas uterinas para secreção do fluido endometrial, que é necessário à nutrição do blastocisto antes da implantação. A progesterona também é necessária para a manutenção da gestação na maioria dos mamíferos, pelo menos durante o terço inicial da gestação. Atua sinergicamente com os estrógenos em diversas funções fisiológicas. Elevados níveis de progesterona inibem o estro e a onda ovulatória de LH, estabelecendo assim a sua importância na regulação do ciclo estral (HAFEZ; HAFEZ, 2004; SPENCER *et al.*, 2004).

A progesterona é o progestágeno natural de maior prevalência, sendo secretada pelas células luteínicas do corpo lúteo, pela placenta e pelas glândulas adrenais. Assim como os andrógenos e os estrógenos, é transportada na corrente circulatória por uma proteína de ligação (NISWENDER, 2002).

Arruda *et al.* (2001), estudando a produção de progesterona e as características de corpos lúteos de éguas em diestro, observaram que as concentrações plasmáticas de P4 foram mais baixas até o terceiro dia após a ovulação, a partir do qual a produção de progesterona se elevou e manteve relativamente constante até o último dia de observação.

No dia seguinte à ovulação, houve a organização do corpo hemorrágico, mas apesar dessa organização a produção de progesterona não foi suficiente para elevar os seus níveis acima de 1 ng/mL (ARRUDA *et al.*, 2001). Nos dias 4 a 8 após a ovulação as concentrações plasmáticas de progesterona alcançaram 3,41 ng/mL, no dia 6 atingiu o

pico de 4,37 e no dia 7 o fenômeno foi acompanhado por uma pequena diminuição não significativa no tamanho dos corpos lúteos.

Acredita-se que altas concentrações de progesterona aumentam a fertilidade, mas um estudo com éguas receptoras de embriões determinou que as concentrações de progesterona não foram diferentes em éguas que mantiveram ou perderam os embriões inovulados (GORETTI, 2005).

2.7 Gonadotrofina coriônica humana

Integram a família dos hormônios glicoproteicos o hormônio luteinizante (LH), o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio tireo-estimulante (TSH), a gonadotrofina coriônica equina (eCG) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG). Segundo Pierce e Parsons (1981), todos os membros dessa família são heterodímeros formados pela associação não covalente de uma subunidade α , comum a todos esses hormônios, com uma subunidade β , que confere especificidade aos diferentes hormônios da família.

A gonadotrofina coriônica humana, um peptídeo placentário, é secretada pelas células trofoblásticas em mulheres gestantes e pode ser facilmente detectada na urina (BOUSFIELD *et al.*, 1994), de onde normalmente é extraída e purificada para elaboração de produtos comerciais. O hCG tem ação agonista aos receptores de LH e estimula a função luteal e a manutenção da gestação em mulheres (MCDONALD, 1988; BOUSFIELD, 1994).

Segundo Ginther (1992), ocorre aumento de 21 vezes no número de receptores para LH no corpo lúteo (CL) e aumento de cinco vezes na afinidade do receptor pelo LH entre os dias 1 e 14 do ciclo estral na égua, o que justifica a ação luteotrófica da hCG nesse período.

De acordo com Newcombe *et al.* (2001), a hCG contribui para prevenção do sinal luteolítico, uma vez que promove o aumento da secreção de proteínas uterinas e da secreção de progesterona pelo corpo lúteo.

Fleury *et al.* (2007), trabalhando com aplicação de hCG para indução da ovulação e no D1, perceberam a antecipação na maturação do CL, refletida na obtenção prematura do platô da concentração plasmática, e o aumento na produção de progesterona, além de proporcionar maior porcentagem de éguas com características reprodutivas desejadas para transferência de embriões.

A administração intramuscular de hCG para éguas no início do diestro resultou em aumento nas concentrações plasmáticas de progesterona por vários dias (KELLY *et al.*, 1988).

2.8 Seleção de receptoras de embrião

As éguas com tônus cervical e uterino mais tenso são as que devem ser selecionadas prioritariamente para receber embrião, segundo Carnevale *et al.* (2000) e Squires *et al.* (2003), pois apresentam melhores taxas de prenhez.

A ecotextura uterina, visualizada por meio de ultrassonografia, está intimamente relacionada às concentrações hormonais da égua (GINTHER; PIERSON, 1984). Durante a fase estrogênica são observadas dobras endometriais, consequência do edema presente no endométrio. Essas são hipocogênicas, ou seja, pouco refletem as ondas lançadas pelo aparelho. Já durante o diestro o útero apresenta-se mais denso ao exame ultrassonográfico (hiperrecogênico), consequência de maior justaposição dos constituintes da parede uterina, ou seja, menor edema (CHEVALIER; PALMER, 1982).

A relação temporal entre o diâmetro dos cornos uterinos e os registros de tônus uterino em éguas prenhas e em diestro indica que o grau de contração do endométrio e a ausência de edema estão relacionados com o aumento do tônus uterino. Acompanhando o aumento do tônus uterino, observa-se o aumento do tônus cervical, necessário para o isolamento do ambiente uterino saudável do ambiente vaginal, que possui flora microbiológica diversificada (GRIFFIN; GINTHER, 1991).

As características da palpação retal e da ultrassonografia do útero e da cérvix de éguas em diestro estão diretamente correlacionadas com a concentração de progesterona (PYCOCK *et al.*, 1995).

Em éguas prenhas foi observada queda gradual da presença de dobras endometriais que atingiram níveis de diestro no dia 3 pós-ovulação, e assim permaneceram até o dia 12. Padrões irregulares foram observados entre os dias 14 e 15 e entre os dias 22 e 25 pós-ovulação. Já em éguas não prenhas, padrão similar foi observado até o dia 12 pós-ovulação, em que o aumento gradual das dobras endometriais foi observado devido ao retorno ao estro (GRIFFIN; GINTHER, 1991).

As características palpáveis e ultrassonográficas do útero e do cérvix de éguas em diestro estão diretamente correlacionadas com a concentração de progesterona. Um estudo feito com éguas receptoras de embriões determinou que as concentrações de

progesterona não foram diferentes ($p < 0,05$) em éguas que mantiveram ou perderam os embriões inovulados (McCUE *et al.*, 1999).

2.9 Taxa de gestação

O início da gestação equina envolve aspectos específicos do gênero *Equus*, como reconhecimento materno da gestação, desenvolvimento morfológico do embrião, origem dos anexos fetais, junção feto-maternal, desenvolvimento do âmnio e dos cálices endometriais, além da mobilidade e atividade fetal (GINTHER, 1992).

Carnevale *et al.* (2000) obtiveram taxa de prenhez aos 12 dias, considerando expressivo número de transferências (D0 = dia da ovulação) de 65,7% (419/638).

Lopes (2004), em um estudo de resultados de seis anos de transferência de embriões em diferentes Haras da raça Mangalarga Marchador, relatou taxa média de prenhez aos 15 dias de 73,4% (609/830). O pesquisador relatou que foram observadas diferenças entre estações de monta diferentes, que ele atribuiu a aspectos relacionados com as éguas, o grau de prática do profissional, a qualidade do manejo dos animais nos Haras e as instalações nas diversas fazendas de criação.

Taxa de prenhez semelhante foi observada por Goretti (2005), 74,8% (83/111), em programa comercial de transferência de embriões na Zona da Mata mineira.

Fleury (2002) relatou que de um total de 473 embriões recuperados foram constatadas 388 gestações positivas aos 15 dias (75,6%). Foram observadas, entre 15 e 50 dias de gestação, 26 perdas embrionárias (5,1%). Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) quando comparados os índices de prenhez entre o grupo de embriões transferidos até 1 hora após a coleta (controle) contra o grupo de embriões que foram submetidos à refrigeração por um período de até 18 horas.

Em trabalho realizado na Universidade Federal de Viçosa, comparando a técnica de Injeção Intrauterina e a técnica convencional transcervical de transferência de embriões, Silva (2003) obteve valores de taxas de prenhez muito bons, 76,9% (30/39) e 78,9% (30/38), considerando que apenas embriões excelentes foram transferidos.

3 HIPÓTESES

- O hCG administrado no quarto dia após a ovulação aumenta a taxa de prenhez em éguas receptoras de embriões.
- O hCG aumenta a produção de progesterona em éguas receptoras de embriões.
- O hCG melhora as características reprodutivas (tônus uterino e cervical, morfoecogenicidade do CL, área do CL, edema uterino no dia D4, D8 e D13) de éguas receptoras tratadas no quarto dia do ciclo com hCG.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e período

O estudo foi realizado no Haras Laglória, situado às margens da rodovia BR 116 (21° 07' latitude sul; 42° 21' longitude oeste), na altura do km 695 na cidade de Muriaé, Zona da Mata mineira, e no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, onde foram processadas as análises das amostras coletadas a campo.

Os dados foram coletados nos meses de dezembro a março da estação reprodutiva de 2008/2009.

4.2 Animais

Foram utilizadas 50 fêmeas equinas receptoras de embriões da Raça Mangalarga Marchador, com idades variando de 4 a 15 anos, escore corporal entre 5 e 7, em escala de 0 a 9. As éguas selecionadas estavam com potro ao pé ou haviam parido na última estação de monta, ou eram potras de quatro anos. Os animais utilizados tinham histórico reprodutivo conhecido, com exceção das potras férteis e que não apresentaram nenhuma alteração clínica ou reprodutiva.

4.3 Manejo reprodutivo

As éguas paridas foram mantidas em pastagens de capim mombaça (*Panicum sp.*) e receberam concentrado uma vez ao dia (1,5 kg/cab/dia), com água e sal mineral de boa qualidade *ad libitum*. As éguas solteiras permaneceram em pastagens de grama estrela (*Cynodon plectostachyus*), recebendo capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), 20 kg de massa verde/cab/dia, picado no cocho e concentrado uma vez ao dia (1,5 kg/cab/dia), também com acesso a sal mineral e água *ad libitum*.

Para avaliação reprodutiva, todas as éguas foram examinadas diariamente por palpação transretal e ultrassonografia, sempre no período da manhã. Os dados reprodutivos obtidos foram devidamente anotados em fichas de controle individual.

As éguas paridas foram avaliadas pela primeira vez uma semana após o parto, período em que foi observado crescimento folicular do primeiro ciclo após o parto.

Nesse momento foi realizado o exame ultrassonográfico, a fim de observar se havia presença de líquidos ou lóquios no interior do lúmen uterino ou ainda pontos de ecotextura anormais, o que desqualificaria o animal do experimento.

Todas as éguas foram avaliadas a cada dois ou três dias, até a detecção do estro, por meio do exame ultrassonográfico pela visualização do edema uterino, do tamanho do folicular e das condições de tônus do útero e cérvix. As éguas que estavam em estro e apresentaram folículo ovariano ≥ 35 mm tiveram controle folicular diário até a detecção da ovulação (D0).

Após a ovulação, as candidatas a receptoras de embriões foram avaliadas pela primeira vez no D4, dia em que foi realizada a distribuição entre os tratamentos. Além disso, as éguas foram avaliadas nos dias D8 e D13 do ciclo estral. Amostras de sangue foram colhidas nesses dias e as características reprodutivas foram anotadas.

4.4 Delineamento experimental

4.4.1 Grupos experimentais

Grupo 1 = administração intramuscular (IM) de 2 mL de solução fisiológica no quarto dia após a ovulação (D4) N = 24.

Grupo 2 = administração intramuscular (IM) de 2.000 UI (2 mL) de gonadotrofina coriônica humana – hCG (CHORULON[®]) no quarto dia após a ovulação (D4) N = 26.

4.4.2 Avaliação dos órgãos reprodutivos

A partir de um folículo de 35 mm de diâmetro, as receptoras foram avaliadas diariamente e as ovulações anotadas à medida que foram ocorrendo, portanto a ordem de ovulação das éguas foi absolutamente aleatória. A partir da data da ovulação foi determinada a data do D4 (considerando como D0 o dia da ovulação), momento em que foi realizada a primeira avaliação no diestro.

Todas as receptoras foram avaliadas no D4, D8 e D13, quanto às seguintes características reprodutivas: tônus uterino, tônus cervical, ecotextura uterina, edema uterino, diâmetro do CL, perímetro do CL, área do CL e diâmetro do maior folículo em

cada ovário. Além disso, foram avaliados a qualidade dos embriões transferidos e o grau de assincronia entre receptora e doadora.

No dia D4 foram selecionadas as receptoras consideradas aptas a receber embriões, por meio de uma avaliação subjetiva. Os animais que apresentaram melhores características de diestro pela avaliação dos órgãos reprodutivos foram considerados mais apropriados para receber embriões. Aquelas éguas consideradas inaptas receberam uma dose de agente luteolítico (Lutalyse[®]).

Foi adotada uma sequência alternada, em que a primeira égua sorteada, das selecionadas naquele dia, foi colocada no G1, a segunda no G2, a terceira no G1 novamente, e assim sucessivamente.

As receptoras foram utilizadas para a transferência de embrião do D4 ao D8, sendo apenas uma utilizada no D9. Desta forma, houve assincronia de -1 a +4 dias em relação ao dia de ovulação das doadoras.

À medida que as coletas de embriões foram realizadas, as éguas receptoras foram sendo utilizadas de acordo com sorteio prévio.

4.4.2.1 Tônus do útero

Foi avaliado por palpação transretal pela compressão digital, cuja classificação variou de 0 a 3, na qual a classificação 0 correspondeu ao útero sem tônus, flácido, 1 pouco tônus, 2 tônus moderado e a classificação 3 correspondeu ao útero firme, com tônus máximo.

4.4.2.2 Tônus da cérvix

Foi avaliado por palpação transretal, pela compressão digital, cuja classificação variou de 1 a 4, na qual a classificação 1 correspondeu à cérvix sem tônus, flácida, considerada aberta, 2 pouco tônus, 3 tônus moderado e a classificação 4 correspondeu à cérvix firme, considerada fechada, com tônus máximo.

4.4.2.3 Ecotextura uterina

A ecotextura uterina foi avaliada por meio de ultrassonografia transretal, utilizando-se um aparelho de ultrassom equipado com transdutor linear de 6 MHz

(Falcon 100[®], Pie Medical). Foi classificada por meio de sistema de escores, variando de 0 a 3, no qual o escore 0 indica uma ecotextura bastante homogênea, característica de diestro (ausência total de edema, útero sem pregas endometriais), 1 pouco edema, 2 edema moderado e o escore 3 uma ecotextura bastante heterogênea, característica de estro (edema endometrial intenso com pregas endometriais bastante evidentes).

4.4.2.4 Corpo lúteo

As características do corpo lúteo foram avaliadas com o uso do ultras-som. A ecogenicidade do CL foi avaliada e seus valores variaram de 1 (grau de menor ecogenicidade) a 4 (grau de maior ecogenicidade). Foram também medidos o maior diâmetro, o perímetro e a área do CL.

4.4.2.5 Ovários

Nos ovários das éguas receptoras foram observados a presença de um ou mais corpos lúteos e o diâmetro do maior folículo, e ainda se algum dos ovários estava polifolicular, indicando o surgimento ou o crescimento de uma nova onda folicular.

4.4.2.6 Qualidade dos embriões

Os embriões recuperados das éguas doadoras foram analisados ao microscópio estereoscópio e classificados quanto à qualidade em graus de 1 a 5, segundo McKinnon (1992).

Grau 1: EXCELENTE, embrião ideal, esférico, com tamanho das céls, cor e textura uniformes.

Grau 2: BOM, pequenas imperfeições com poucos blastômeros extrusos, forma irregular ou separação do trofoblasto.

Grau 3: RAZOÁVEL, com lesões não muito severas, com presença de blastômeros extrusos, células degeneradas ou blastocele colapsada.

Grau 4: POBRE, com lesões sérias como blastocele colapsada, vários blastômeros extrusos e células degeneradas, mas com aparência viável da massa embrionária.

Grau 5: NÃO FERTILIZADO OU MORTO, oócito não fertilizado ou embrião totalmente degenerado.

4.4.2.7 Diagnóstico de gestação

Todos os embriões transferidos para receptoras que originaram gestações foram visualizados no exame do D13 da receptora. Pelo fato de os embriões recolhidos terem idade média de oito dias e terem sido transferidos para receptoras do D4 ao D9 delas, quando examinados aos 13 dias de ovulação da receptora eles tinham idade de gestação variando de 12 a 17 dias, o que possibilitou sua visualização no útero das receptoras. No momento do diagnóstico de gestação as vesículas embrionárias visualizadas tiveram seus diâmetros mensurados. As éguas gestantes foram examinadas novamente aos 30 e 45 dias de gestação.

4.4.2.8 Assincronia entre doadoras e receptoras

Todos os lavados uterinos foram realizados oito dias após a ovulação da doadora, ou seja, D8. As receptoras avaliadas ovularam um dia antes da doadora (-1), no mesmo dia (0) ou até quatro dias depois da doadora (+4), o que caracterizou em alguns momentos o uso de éguas receptoras que ovularam em dias diferentes da doadora, evidenciando a assincronia.

4.4.3 Coleta e transferência dos embriões

As éguas doadoras foram avaliadas a cada dois dias até a detecção de folículo ≥ 35 mm no(s) ovário(s), e a partir deste momento foram examinadas diariamente. Com a observação do folículo maduro e as características de útero e cérvix adequadas, as éguas doadoras foram inseminadas com sêmen fresco ou resfriado, de garanhões com fertilidade conhecida, com dose mínima de 500 milhões de sptz viáveis, em dias alternados, até a detecção da ovulação.

Oito dias após a ovulação foram procedidos os lavados uterinos das doadoras, utilizando-se solução Ringer com Lactato (Fresenius®). Os lavados foram feitos com volume de 1 litro, repetidos por duas ou três vezes, se necessário. Quando o embrião foi observado no copo coletor, independentemente da fase do lavado, ele foi levado ao

laboratório para manipulação e o lavado uterino finalizado. Quando o embrião não foi visualizado macroscopicamente, o meio recuperado do lavado foi transferido para placa de Petri e o rastreamento realizado ao microscópio estereoscópio. Após sua observação, os embriões foram transferidos para meio de cultivo (Holding Plus, VIGRO[®]) e passado por oito gotas desse meio sucessivamente. Após a manipulação, os embriões foram colocados em placa de Petri menor (40 x 11 mm, TPP), com cerca de 3 mL de meio, e sobre uma placa de aquecimento a 35°C, recobertos por um isopor e mantidos por um período de aproximadamente 30 minutos até a transferência. Após a higienização adequada do períneo da receptora o embrião foi envasado em pipeta para inseminação equina (PROVAR[®], Brasil). A pipeta foi recoberta por camisa sanitária (IMV[®], França) e a deposição feita no útero da receptora pelo método transcervical.

4.4.4 Dosagem hormonal

Para as dosagens de progesterona plasmática das receptoras foram coletadas amostras de sangue por venopunção jugular em tubos providos de vácuo, não heparinizados, nos dias D0, D4, D8 e D13 do ciclo estral, aproximadamente no mesmo horário, sempre no período da manhã.

Após as coletas as amostras de sangue foram identificadas e colocadas em banho-maria a 37°C, por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram retirados do banho e centrifugados a 2.000 rpm por 10 minutos, para extração do soro sanguíneo, que foi transferido para tubos modelo (Ependorffs[®]) devidamente identificados e armazenados a -20°C, até o momento da determinação das concentrações.

As dosagens de progesterona foram realizadas pelo método de Quimiluminescência, utilizando kit Access[®] *Immunoassay Systems Progesterone Reagent (BECKMAN COULTER[®])*, seguindo-se rigorosamente a rotina laboratorial e as recomendações do fabricante.

4.4.5 Análises estatísticas

Os momentos D0 (dia da ovulação), D4, D8 e D13 foram avaliados de forma independente, segundo o modelo estatístico utilizado.

A comparação das médias das variáveis não paramétricas foi submetida ao teste de Willcoxon. As variáveis paramétricas foram avaliadas pela análise de variância

(ANOVA). A taxa de prenhez foi analisada pelo Teste Exato de Fisher. Para todas as análises foi utilizado o Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG).

5 RESULTADOS

5.1 Tônus uterino

Não foram verificadas diferenças entre valores médios nos grupos experimentais ($p > 0,05$), conforme demonstrado na Tabela 1. Pode-se observar que os grupos apresentaram valores muito próximos no primeiro dia de observação (D4), o que demonstra ter havido distribuição normal e homogênea entre os grupos.

Tabela 1 – Tônus uterino nos dias 4(D4), 8(D8) e 13(D13) em éguas Mangalarga Marchador tratadas com hCG e controle (solução fisiológica)

Dia	Tratamento (hCG)	Controle
3	2,0 ± 0,4	2,1 ± 0,3
8	2,1 ± 0,5	2,0 ± 0,3
13	2,2 ± 0,5	2,2 ± 0,5

* $p > 0,05$. Média ± desvio-padrão do tônus uterino, 0 flácido, 1 pouco tônus, 2 moderado e 3 firme.

Nos dias seguintes de observação também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$), fato este que pode ser atribuído a pré-seleção, em que os animais já estavam com tônus significativo, sendo considerados aptos a receber embriões.

Considerando o tônus uterino 2 como aceitável para transferência e o tônus 3 como máximo, 84% (42/50) dos animais apresentaram tônus ≥ 2 no primeiro dia de avaliação (D4).

5.2 Edema uterino

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os valores médios obtidos nos grupos tratamento e controle para essa característica, como observado na Tabela 2.

O edema uterino é uma característica visualizada ao exame ultrassonográfico, principalmente em éguas na fase de estro, sendo indesejável em receptoras no momento de escolha para a transferência do embrião. Na Tabela 2 estão os valores de edema uterino, todos muito baixos, compatíveis com as fêmeas na fase de diestro do ciclo estral. Também não houve diferenças em relação ao edema uterino entre os diferentes dias de observação de ambos os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 2 – Edema uterino nos dias 4(D4), 8(D8) e 13(D13) em éguas Mangalarga Marchador tratadas com hCG e controle (solução fisiológica)

Dia	hCG 2000 UI	Controle
4	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,2
8	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,2
13	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,2

* $p > 0,05$. Média ± desvio-padrão do edema uterino, 0 ausência de edema, 1 pouco edema, 2 moderado e 3 edema máximo.

5.3 Tônus da cérvix

Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os valores médios obtidos nos grupos experimentais para esta característica, conforme observado na Tabela 3. Porém houve aumento dos valores numéricos para os dois grupos entre os dias 4 aos 13. Comparando o tônus cervical entre éguas gestantes e não gestantes, diferenças aparecem somente no dia 13 ($p = 0,01$) como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Tônus da cérvix nos dias 4(D4), 8(D8) e 13(D13) em éguas Mangalarga Marchador tratadas com hCG e controle (solução fisiológica) e conforme agrupamento de gestantes e não gestantes

Dia	hCG 2000 UI	Controle
4	2,9 ± 0,5	2,8 ± 0,7
8	3,3 ± 0,6	3,3 ± 0,7
13	3,6 ± 0,7	3,5 ± 0,7
Dia	Gestantes	Não Gestantes
4	2,9 ± 0,6	2,7 ± 0,6
8	3,3 ± 0,6	3,1 ± 0,5
13	3,7 ± 0,5 ^a	2,9 ± 1,0 ^b

* $p > 0,05$. Média ± desvio-padrão do tônus da cérvix; 0 flácido (aberta); 1 pouco tônus; 2 tonus moderado; e 3 firme (fechada). a, b = valores diferentes na mesma linha são indicados por letras diferentes segundo teste de Wilcoxon ($P = 0,010$).

5.4 Ecogenicidade do CL

Não foram registradas diferenças entre os grupos experimentais ($p > 0,05$), conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Ecogenicidade do CL nos dias 4(D4), 8(D8) e 13(D13) em éguas Mangalarga Marchador tratadas com hCG e controle (solução fisiológica)

Dia	hCG 2000 UI	Controle
4	2,6 ± 0,5	2,6 ± 0,7
8	2,5 ± 0,5	2,6 ± 0,6
13	2,3 ± 0,6	2,3 ± 0,5

* $p > 0,05$. Média ± desvio-padrão da ecogenicidade do CL; 0 hipoecóico; 1 pouco ecogênico; 2 ecogênico; e 3 hiperecogênico.

5.5 Diâmetros, perímetro e área do CL

Não foram registradas diferenças ($p > 0,05$) entre os valores médios dos diâmetros, dos perímetros e das áreas dos CLs, para os grupos do hCG e solução fisiológica.

Os valores de diâmetro, perímetro e área dos CLs dos dois grupos estão listados nas Tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5 – Diâmetro do CL nos dias 4(D4), 8(D8) e 13(D13) em éguas Mangalarga Marchador tratadas com hCG e controle (solução fisiológica)

Dia	hCG 2000 UI	Controle
4	3,26 ± 0,46	3,34 ± 0,67
8	2,86 ± 0,41	2,81 ± 0,47
13	2,62 ± 0,43	2,86 ± 1,35

* $p > 0,05$. Média ± desvio-padrão do diâmetro em cm dos CLs.

Tabela 6 – Perímetro do CL nos dias 4(D4), 8(D8) e 13(D13) em éguas Mangalarga Marchador tratadas com hCG e controle (solução fisiológica)

Dia	hCG 2000 UI	Controle
4	10,1 ± 1,2	10,7 ± 2,1
8	9,0 ± 1,3	9,0 ± 1,3
13	8,6 ± 1,3	8,5 ± 1,1

* $p > 0,05$. Média ± desvio-padrão do perímetro em cm dos CLs.

Tabela 7 – Área do CL nos dias 4(D4), 8(D8) e 13(D13) em éguas Mangalarga Marchador tratadas com hCG e controle (solução fisiológica)

Dia	hCG 2000 UI	Controle
4	8,1 ± 2,0	9,1 ± 4,0
8	6,3 ± 1,7	6,4 ± 2,0
13	5,7 ± 1,6	5,6 ± 1,4

* $p > 0,05$. Média ± desvio-padrão da área em cm^2 dos CLs.

5.6 Assincronia entre doadoras e receptoras

Não houve diferenças ($p > 0,05$) do grau de assincronia entre doadoras e receptoras nos dois grupos, sendo a média de assincronia muito próxima entre os grupos do hCG e da solução salina (controle) (Tabela 8).

Tabela 8 – Grau de assincronia entre éguas doadoras e receptoras da raça Mangalarga Marchador, conforme os grupos: hCG e solução fisiológica

Assincronia	hCG 2000 UI	Controle
Média	2,6 ± 1,6	2,7 ± 1,4

* $p > 0,05$. Média ± desvio-padrão da assincronia, considerando a receptora tendo ovulado um dia antes da doadora (-1), no mesmo dia (0) ou até quatro dias após (+1, +2, +3, ou +4).

Quando os tratamentos foram agrupados, observou-se maior número de éguas receptoras utilizadas com assincronia 2, 3 e 4, 78% (39/50), como demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 – Distribuição de assincronia entre éguas doadoras e receptoras da raça Mangalarga Marchador nos grupos hCG e solução fisiológica

Assincronia	hCG 2000 UI	Controle	Total
-1	1	0	1
0	3	3	6
1	3	2	5
2	3	3	6
3	5	6	11
4	11	10	21
Total	26	24	50

5.7 Qualidade embrionária

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre o número de embriões por classe de qualidade nos grupos estudados, classificados por meio de simples visualização ao estereomicroscópio (Tabela 10).

Tabela 10 – Número de embriões de éguas da raça Mangalarga Marchador transferidos em relação à sua classificação (Grau 1, 2 ou 3) nos grupos hCG e solução fisiológica

Grau	hCG 2000 UI	Controle	Total
1	17	18	35 (70%)
2	9	5	14 (28%)
3	0	1	1 (2%)

Grau 1: EXELENTE. Embrião ideal, esférico, com tamanho das células, cor e textura uniformes; Grau 2: BOM, Pequenas imperfeições com poucos blastômeros extrusos, forma irregular ou separação do trofoblasto; Grau 3: RAZOÁVEL: Com lesões não muito severas, com presença de blastômeros extrusos, células degeneradas ou blastocite colapsada.

A maioria dos embriões recuperados (98% - 49/50) foi classificada como sendo de grau 1 ou grau 2, e apenas um embrião foi classificado como de grau 3.

5.8 Progesterona

A concentração de progesterona plasmática foi mensurada no dia da ovulação das receptoras (D0) e nos demais dias de avaliação: D4, D8 e D13 pós-ovulação (Tabela 11).

Tabela 11 – Concentração plasmática de progesterona (ng/mL) nos dias 0(D0), 4(D4), 8(D8) e 13(D13) pós-ovulação nos grupos hCG e solução fisiológica

Dia	hCG 2000UI	Controle
0	0,23 ± 0,22 ^a	0,44 ± 0,43 ^b
4	3,06 ± 1,94 ^a	4,50 ± 2,96 ^b
8	5,86 ± 4,13	4,12 ± 3,11
13	4,10 ± 2,57	3,09 ± 2,78

a, b = Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$), pela ANOVA. Média ± desvio-padrão da concentração de progesterona (ng/mL).

Houve diferença ($p < 0,05$) entre os valores médios dos grupos hCG e solução fisiológica para concentração de progesterona no dia 0, entretanto os valores permaneceram abaixo de 1 ng/mL.

Também houve diferença ($p < 0,05$) na concentração plasmática de progesterona entre os valores médios nos grupos no segundo dia de coleta (D4). Nos dias seguintes, D8 e D13, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos.

5.9 Taxa de prenhez

O diagnóstico de gestação foi realizado no 13^o dia da receptora (D0 = dia da ovulação) e a égua em que foi visualizada a vesícula embrionária foi considerada gestante.

O número de animais utilizados nos dois grupos está representado na Tabela 12. Não houve diferença ($p > 0,05$) na taxa de prenhez entre os grupos.

Tabela 12 – Número e percentagem de animais gestantes e não gestantes da raça Mangalarga Marchador nos grupos hCG e solução fisiológica

Gestação	hCG 2000 UI	Controle
Positivos	22 (84,6%)	18 (75%)
Negativos	4	6
Total	26	24

6 DISCUSSÃO

O tônus uterino está diretamente correlacionado com a concentração de progesterona plasmática em éguas em diestro e com a taxa de prenhez após a transferência. As melhores taxas são alcançadas quando são utilizadas éguas receptoras com tônus uterino mais intenso (CARNEVALE *et al.*, 2000).

Contatou-se o aumento no tônus uterino do dia 4 ao dia 13, assim comodescrito por Ginther (1992), em que as éguas gestantes aumentam o tônus da ovulação até por volta do 16^o dia de gestação.

Fleury *et al.* (2007), trabalhando com aplicação de hCG para indução da ovulação e avaliação das características reprodutivas de receptoras no sexto dia após a ovulação, não verificaram diferenças entre as coletas médias dos grupos experimentais, entretanto afirmaram que o grupo tratado com hCG apresentou porcentagem maior de éguas com tônus máximo, fato este não observado neste estudo.

Considerando que neste estudo o tônus 2 foi considerado como aceitável para transferência e o tônus 3 como máximo, 84% (42/50) das éguas apresentaram tônus uterino ≥ 2 entre os dois grupos.

Por se tratar de um programa comercial de transferência de embriões, as éguas foram pré-selecionadas antes de serem distribuídas entre tratamento e controle. Portanto, as éguas apresentaram tônus uterino no primeiro dia de avaliação, muitas vezes compatível com tônus de gestação.

Acredita-se que por esse motivo, e por se tratar de uma característica de avaliação subjetiva, não houve diferenças entre os grupos. Entretanto, os valores de tônus uterino estão de acordo com o descrito por outros pesquisadores (SOUSA, 2006; FLEURY, 2007) e refletiram em taxas de prenhez semelhantes às melhores descritas recentemente na raça Mangalarga Marchador (GORETTI, 2005; LOPES, 2010; JACOB *et al.*, 2010).

Outro parâmetro avaliado de forma subjetiva foi a ecotextura uterina. A ecotextura uterina, visualizada por meio de ultrassonografia, está intimamente relacionada às concentrações hormonais da égua (GINTHER; PIERSON, 1984). Durante a fase de diestro o útero apresenta-se mais denso e firme ao exame de palpação, características evidenciadas também ao exame ultrassonográfico (hiperecogênico) (CHEVALIER; PALMER, 1982). As éguas com características de ecotextura mais homogêneas, reflexo de sua condição uterina de tônus firme e denso, além de maior

justaposição dos constituintes da parede uterina, são melhores candidatas a receber embrião e a se tornar gestantes (CHEVALIER; PALMER, 1982). Também não foi constatada diferença entre os grupos ($p > 0,05$) para essa característica, semelhante ao registrado por Sousa (2006).

Goretti (2005), estudando características reprodutivas, perfil proteico da secreção uterina e concentrações séricas de progesterona em éguas da raça Mangalarga Marchador, observou médias de ecogenicidade uterina de $2,64 \pm 0,57$ e $3,25 \pm 0,65$, em uma escala de 0 a 5 para éguas prenhas e não prenhas, respectivamente.

No presente estudo, as éguas de fertilidade conhecida e com boas condições uterinas foram selecionadas para receber os embriões. O fato de elas apresentarem ecotextura mais homogêneas e pequenas variações detectadas não foi considerado estatisticamente significativo.

A característica de edema uterino apresentou valores baixos durante todos os dias de observação, e não foram registradas diferenças entre os grupos ($p > 0,05$). Esses valores de edema considerados baixos, em alguns casos com ausência total de edema, estão de acordo com o observado por Pelehach *et al.* (2000), que relataram diminuição do edema próximo da ovulação, que se manteve assim no diestro. Os autores afirmaram que o estrógeno folicular aumenta os receptores endometriais de progesterona, o que permite que ela atue por meio desses receptores para dissipar o edema. Fazendo uma analogia com o proposto por esses autores, pode-se inferir que éguas com maior concentração de progesterona plasmática apresentam tendência de ter menor quantidade de edema no diestro.

Pelehach *et al.* (2002) relataram o efeito da progesterona em resposta ao edema uterino provocado pelo estrógeno, no qual a presença do edema durante no período inicial de gestação reflete a baixa produção de progesterona. Hayes *et al.* (1985) alegaram que baixas concentrações de estrógeno têm mais importância que altas concentrações de progesterona no desenvolvimento do endométrio homogêneo, característico de diestro. Os valores baixos registrados neste estudo demonstram que éguas com menores edemas uterinos provavelmente apresentam o endométrio mais bem preparado, um ambiente uterino melhor e são melhores candidatas a receptoras de embriões no dia da transferência.

A cérvix encontra-se aberta sob o efeito do estrógeno folicular durante a fase de estro, o que permite a entrada do sêmen e a limpeza uterina pós-cobertura. Com a atuação da progesterona no diestro, a cérvix se fecha e produz uma secreção mucosa,

isolando o útero da vagina. Além disso, o tônus cervical impede a expulsão física do embrião. Em casos de queda nas taxas de progesterona sérica, o embrião, apesar de viável, pode ser expulso pela cérvix aberta. Este fato foi observado em casos de perda embrionária precoce (GINTHER, 1985). No presente estudo não foram encontradas diferenças entre os valores médios dos grupos. Entretanto, houve aumento dos valores numéricos para os dois grupos entre os dias 4 e 13. Se comparados os valores de tônus da cérvix entre os animais que se tornaram gestantes (n = 40) e os animais que não ficaram gestantes (n = 10), foi observada diferença no dia 13 (p = 0,010). Sob taxas de progesterona sérica adequadas, a cérvix encontra-se suficientemente fechada, de modo a não prejudicar o desenvolvimento embrionário.

A função principal do corpo lúteo é a produção de progesterona. A partir da necessidade prática de determinação da capacidade do corpo lúteo em produzir concentrações adequadas de progesterona, sugeriu-se que a ecogenicidade do corpo lúteo e o seu diâmetro poderiam ser indicativos de seu funcionamento (ARRUDA *et al.*, 2001). Os autores ressaltam que a avaliação do desenvolvimento de corpos lúteos pode ser empregada imediatamente no momento do exame, por meio da sua visualização pela ultrassonografia, em que a ecogenicidade, o tamanho, a forma e as características da glândula são observadas. Para as características de ecogenicidade do corpo lúteo, do diâmetro, do perímetro e da área do CL não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais (p > 0,05), porém observou-se pequena diminuição na ecogenicidade e nas dimensões do CL ao longo dos dias de observação, semelhante ao descrito por Ginther *et al.* (2007).

O grau de assincronia entre doadoras e receptoras é muito importante em programas de TE em equinos. Há algum tempo eram selecionadas receptoras com assincronia entre -1 (ovulação um dia antes da doadora) e +3 (ovulação três dias após a doadora), não sendo as taxas de prenhez entre elas diferentes nesse intervalo (IMEL *et al.*, 1981; DOUGLAS, 1982; SQUIRES *et al.*, 1982a; IULIANO *et al.*, 1985).

Jacob *et al.* (2002), em um estudo realizado com expressivo número de animais (n=384), contataram que o grau de assincronia pode ter maior flexibilidade em transferências transcervicais, podendo ser utilizadas receptoras com assincronia -1 a +5, sem interferência significativa nas taxas de prenhez. Mais recentemente, em trabalho publicado com dados de quatro estações reprodutivas e grande número de ciclos (1507) em éguas da raça Mangalarga Marchador, Jacob *et al.* (2010) concluíram que a assincronia entre doadoras e receptoras não necessita ser restrita, como previamente

reportado em equinos e recomendado para outras espécies. Os autores demonstram ainda que elevadas taxas de prenhez (70%, 99/142) podem ser obtidas quando as éguas receptoras ovulam quatro a cinco dias após a doadora.

Lopes *et al.* (2010) obtiveram melhores resultados quando foram utilizadas receptoras que haviam ovulado dois ou três dias após as doadoras ($p < 0,05$) e menores índices quando as receptoras ovularam seis dias após as doadoras ($p < 0,05$), $n = 792$. Entretanto a porcentagem de perdas embrionárias precoces não diferiu em função do intervalo de sincronismo de ovulações entre doadoras e receptoras ($p < 0,05$). Os autores ressaltam que a flexibilidade no sincronismo entre éguas doadoras e receptoras otimiza o uso e o aproveitamento das receptoras, reduzindo custos e facilitando o manejo em fazendas de criação.

Neste trabalho não foi constatada diferença ($p > 0,05$) para a assincronia entre doadoras e receptoras em função do tratamento, sendo a média de assincronia muito próxima entre os grupos. Quando os tratamentos foram agrupados, observou-se maior número de éguas receptoras utilizadas com assincronia +3 e +4, 66% (33/50), ou seja, éguas receptoras que ovularam três e quatro dias após a doadora. As taxas de prenhez para os diferentes graus de assincronia não foram analisadas estatisticamente devido ao pequeno número de observações por grupo. Somando os resultados dos dois grupos, as taxas de prenhez foram de 100% (1/1) para assincronia -1, 100% (6/6) para 0, 60% (3/5) para 1, 83,3% (5/6) para 2, 72,7% (8/11) para 3 e 81% (17/21) para assincronia 4. Apesar do pequeno número de animais e do somatório dos dois grupos, os resultados de prenhez em virtude da assincronia entre doadoras e receptoras estão de acordo com os dados apresentados na literatura (JACOB *et al.*, 2010).

Para escolha da receptora no momento da transferência, uma criteriosa avaliação deve ser procedida por palpação transretal e ultrassonografia (CARNEVALE *et al.*, 2000), além da observação das anotações a respeito das características reprodutivas de estro dessa fêmea. As éguas que durante o estro apresentaram satisfatório edema uterino, adequado relaxamento e abertura de cérvix, além da ausência do acúmulo de fluido ou ar no lúmen uterino, certamente são melhores candidatas a receber embriões (SQUIRES *et al.*, 1988).

Durante o diestro, o tônus uterino e o tônus cervical são verificados por meio da palpação retal. A ultrassonografia completa o exame pela visualização das características dos ovários, pela presença de um ou mais corpos lúteos, além de suas características de ecogenicidade e tamanho (ARRUDA *et al.*, 2001), e a possível

presença de folículos e seus tamanhos. No exame ultrassonográfico do útero são observadas a ecotextura uterina, que deve ser mais homogênea e hiperecoica, a ausência de dobras endometriais e o edema uterino, além da ausência de fluidos, ar ou cistos no interior do útero (GINTHER, 1992). Por meio da observação dessas características, muitos autores classificam as éguas como de primeira, segunda, terceira ou quarta escolha (CARNEVALE *et al.*, 2000; SQUIRES *et al.*, 2003; FLEURY *et al.*, 2007; SOUSA, 2007).

A escolha correta da receptora no momento da transferência do embrião é mais um ponto fundamental no processo de TE, uma vez que é no útero da receptora que ocorrerá a sequência no desenvolvimento embrionário e esta será responsável por levar a gestação a termo.

A qualidade embrionária depende de fatores relacionados com a égua doadora, com fatores intrínsecos do próprio embrião e até mesmo com o modo de coleta. A avaliação morfológica de rotina é um procedimento rápido, não invasivo e requer equipamentos relativamente simples. A avaliação do embrião em programas de TE é visual, sendo necessário um técnico treinado para tal procedimento. Por ser subjetivo esse procedimento depende de treinamento (BUTLER; BIGGERS, 1989; VANDERWALL, 1996). A probabilidade de estabelecimento de prenhez depois da transferência é altamente dependente da qualidade embrionária, (BALL *et al.*, 1989; CARNEY *et al.*, 1991; VANDERWALL, 1996) e da qualidade do ambiente endometrial da receptora (PASCOE *et al.*, 1985).

Em geral, embriões de má qualidade resultam em baixas taxas de prenhez e os de boa qualidade em altas taxas. Em programas de transferência de embriões equinos, as taxas de prenhez, quando transferidos embriões de grau 1 ou 2, foram significativamente maiores comparadas às de embriões de grau 3 ou 4 (McKINNON; SQUIRES, 1988b; CARNEY *et al.*, 1991; CARNEVALE *et al.*, 2000). Foram coletados cento e vinte e dois embriões nas duas estações reprodutivas estudadas, no entanto apenas os embriões classificados em qualidade grau 1 ou 2 foram transferidos (McKINNON; SQUIRES, 1988a). Cento e um embriões (82,79%) atenderam a essa exigência. Não foi encontrada diferença ($P < 0,05$) na qualidade dos embriões recuperados entre as estações estudadas.

Em fazendas de criação normalmente são transferidos embriões de todos os graus, exceto embriões degenerados ou mortos (grau 5). No presente estudo, 98%

(49/50) dos embriões transferidos foram de grau 1 ou 2, não diferindo ($P < 0,05$) a média da qualidade dos embriões entre os dois grupos.

A verdadeira correlação da qualidade embrionária com a possibilidade de prenhez deverá ser mais bem estudada, visto que a avaliação feita a campo é subjetiva e superficial, além de pontual. Adicionalmente, mudanças ou alterações ultraestruturais não são visualizadas no exame ao microscópio estereoscópio e há dependência da qualidade do ambiente uterino.

Alguns autores têm sugerido que a aplicação exógena de hCG em éguas em diestro promove mudança funcional no corpo lúteo, aumentando a concentração plasmática de progesterona (KELLY *et al.*, 1988; WATSON *et al.*, 1995; FLEURY *et al.*, 2007). Além disso, tem sido mostrado que a hCG administrada no dia 5 após a inseminação artificial promove a elevação nas concentrações de progesterona plasmática, aumentando a sobrevivência embrionária e os índices de concepção em vacas leiteiras (BEINDORFF *et al.*, 2009). Segundo os autores, a hCG atua similarmente ao hormônio luteinizante (LH), ligando-se em seus receptores na membrana de pequenas células luteais, ativando o segundo mensageiro, que estimula o aumento da síntese de progesterona. A administração intravenosa de 1.500 UI de hCG a éguas resultou em elevação nas concentrações circulantes de progesterona, o que evidencia que o LH exógeno possa ser luteotrófico para os corpos lúteos equinos (WATSON *et al.*, 1995). Esses autores observaram médias nas concentrações de progesterona plasmática no oitavo dia do ciclo estral de $9,65 \pm 2,21$ ng/mL e $12,63 \pm 3,40$ ng/mL, antes e depois da aplicação de hCG, respectivamente. Tem sido descrito que ocorre aumento no número e na afinidade para os receptores de LH nas células luteais equinas entre os dias 1 e 14, entretanto este estudo no diestro não emprega o LH diretamente, e sim os seus análogos, no caso o hCG (GINTHER, 2007).

Fonseca e Tôrres (2005), trabalhando com fêmeas caprinas de duas raças diferentes, tratadas no quinto dia após cobertura com 250 UI de hCG, observaram aumento de 72 e 33% na concentração plasmática de progesterona do dia 7 ao 13 e manutenção dos níveis elevados do dia 13 ao 45 da gestação.

Sousa (2006), em estudo com éguas receptoras de embriões e aplicação de hCG para indução da ovulação, observou que os grupos tratados com hCG (G2 e G3) apresentaram no dia da ovulação (D0) e no quarto dia pós-ovulação (D4) concentração plasmática de progesterona superior à do grupo-controle (G1) no dia da ovulação (D0),

e no quarto dia pós-ovulação (D4). No entanto, os grupos tratados não diferiram entre si.

No presente estudo, nas éguas receptoras que receberam uma dose de hCG (2000 UI) no quarto dia após a ovulação, não foram observadas diferenças para produção de progesterona entre os animais tratados e não tratados. Acredita-se que a não observação de aumento na produção de progesterona pode ser devido ao dia de tratamento, ao número de animais utilizados ou até mesmo às condições de pré-seleção dos animais que foram estabelecidas. Também, a hCG pode ter sido mais eficiente em promover a luteinização de células foliculares do folículo maduro pré-ovulatório (BEEHAN *et al.*, 2010) e em antecipar o pico de produção de progesterona, aumentando assim a concentração de progesterona plasmática nesse período. Entretanto a produção média de progesterona corrobora com os valores observados por Arruda *et al.* (2001).

Watson e Sertich (1990) não constataram aumento na produção de progesterona em células luteais equinas cultivadas *in vitro* quando acrescentaram LH a essa cultura. Os autores alegam que a provável justificativa para o resultado obtido foi as condições da cultura celular.

Quando a taxa de prenhez foi avaliada, não foram observadas diferenças entre os valores médios dos grupos. A porcentagem de éguas prenhes no grupo tratado (hCG) foi de 84,6% (22/26) e no grupo-controle (solução fisiológica) foi de 75% (18/24). Apesar de não ter havido diferenças, os valores de prenhez estão de acordo com os recentemente citados na literatura (GORETTI, 2005; SOUSA, 2006; FLEURY *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2010; JACOB *et al.*, 2010) e considerados satisfatórios para programas de TE.

7 CONCLUSÕES

A hCG aplicada a receptoras de embriões equinos no diestro não foi eficiente em melhorar suas características reprodutivas para receberem embriões, melhorar a produção de progesterona ou mesmo aumentar as taxas de prenhez após a transferência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA, R. P.; VISINTIN J. A.; FLEURY, J. J.; GARCIA, A. R.; MADUREIRA, E. H.; CELEGHINI, E. C. C.; NEVES NETO, J. R. Existem relações entre o tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões eqüinos? *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 38, p. 233-239, 2001.
- BALL, B. A.; LITTLE, T. V.; WEBER, J. A.; WOOD, G. L. Survival of day-4 embryos from young, normal and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. *J. Reprod. Fertil.*, v. 85, p. 187-209, 1989.
- BALL, B. A. Embryonic death in mares. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. p. 517-531.
- BEEHAN, D. P.; LYLE, S. K.; LEN, J.; STAEMPFLI, S. A.; EILTS, B. E. Investigation of preovulatory serum progesterone increase after hCG treatment in mares. *Animal Reproduction Science*, v. 121, p. 49-50, 2010.
- BEINDORFF, N.; HONNENS, A.; PENNO, Y.; PAUL, V.; BOLLWEIN, H. Effects of human chorionic gonadotropin on luteal blood flow and progesterone secretion in cows and in vitro-microdialyzed corpora lútea. *Theriogenology*, v. 72, p. 528-534, 2009.
- BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H.; TRALDI, A. S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 43, n. 6, p. 824-840, 2006.
- BOUSFIELD, G. R.; PERRY, W. M.; WARD, D. N. Gonadotropins, chemistry and biosynthesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.) *The physiology of reproduction*. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. cap. 30.
- BROADLEY, C.; MENZIES, G. S.; BRAMLEY, T. A.; WATSON, E. D. Isolation of cell populations from the mare corpus luteum: comparison of collagenase and mechanical dispersion. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 102, p. 7-15, 1994.
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, v. 232, p. 34-47, 1986.
- BUTLER, J. E.; BIGGERS, J. D. Assessing the viability of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology*, v. 31, p. 115-126, 1989.
- CARNEVALE, E. M.; RAMIREZ, E. L.; SQUIRES, E. L. *et al.* Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, v. 54, p. 965-979, 2000.

- CARNEY, N. J.; SQUIRES, E. L.; COOK, V. M.; SEIDEL JR., G. R.; JASKO, D. J. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. *Theriogenology*, v. 36, p. 23-32, 1991.
- CARR, B. R. *et al.* The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the corpus luteum. *Fertility and Sterility*, v. 38, p. 303-311, 1982.
- CHAVATTE, P.; PALMER, E. Induction of ovulation in the mare. *Equine Veterinary Education*, v. 10, n. 1, p. 26-30, 1998.
- CHEVALIER, F.; PALMER, E. Ultrasonic echography in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 32, p. 423-430, 1982. (Supply)
- CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL – CNA. *Estudo do complexo do agronegócio do cavalo no Brasil*. Brasília: CNA, 2006.
- DAELS, P. F.; HUGHES, J. P. The normal estrous cycle. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.) *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 121-132.
- DAVIS, J. S.; RUEDA, B. R. The corpus luteum, an ovarion structure with maternal instincts and suicidal tendencies. *Frontiers in Bioscience*, v. 7, p. 1949-1978, 2002.
- DONADEU, F. X.; GINTHER, O. J. Interactions of follicular factors and season in the regulation of circulating concentrations of gonadotrophins in mares. *Reproduction*, v. 125, p. 743-750, 2003.
- DOUGLAS, R. H. Some aspects of equine embryo transfer. *Journal of Reproduction and Fertility*, p. 405-408, 1982. (Suppl. 32)
- DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Concentration of prostaglandin F_{2α} in uterine venous plasma of anesthetized mares during estrous cycle and early pregnancy. *Prostaglandins*, p. 11-251, 1976
- DRIANCOURT, M. A. *et al.* Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. *Reproduction on Nutrition Development*, v. 22, p. 1035-1047, 1982.
- FITZ, A.; MAYAN, M. H.; SAWYER, H. R.; NISWENDER, G. D. Characterization of two steroidogenic cell type in the ovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, v. 27, p. 703-711, 1982.
- FLEURY, J. J.; PINTO, A. J.; MARQUES, A.; LIMA, C. G.; ARRUDA, R. P. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em eqüinos da raça Mangalarga. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 38, n. 1, p. 29-33, 2001.

FLEURY, J. J.; FLEURY, P. D. C.; LANDIN-ALVARENGA, F. C. Effect of embryo diameter and storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham's F-10 with HEPES Buffer at a temperature of 15-18 °C – preliminary results. *Theriogenology*, v. 58, p. 749-750, 2002.

FLEURY, P. D. C.; ALONSO, M. A.; SOUSA, F. A. C.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar características reprodutivas de receptoras de embriões equinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 31, n. 1, p. 27-31, 2007.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A. Administration of hCG 5 days after breeding and reproductive performance in nulliparous dairy goats. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 40, p. 495-499, 2005.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; NOGUEIRA, G. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Temporal interrelationship among luteolysis, FSH, and LH, concentrations, and follicle deviation in mares. *Theriogenology*, v. 53, p. 925-940, 2000.

GINTHER, O. J.; PIERSON, R. A. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. *Theriogenology*, v. 21, p. 505-516, 1984.

GINTHER, O. J. Embryonic loss in mares: incidence, time of occurrence, and hormonal involvement. *Theriogenology*, v. 23, p. 77-89, 1985.

GINTHER, O. J. *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects*. 2. ed. Wisconsin: Equiserves, Cross Plains, 1992. 642 p.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; UTT, M. D. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science*, v. 99, p. 213-220, 2007.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; COOPER, D. A. Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17 β -estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 114, p. 311-317. 2009.

GONZÁLEZ, F.H.D. *Introdução à endocrinologia veterinária*. Endocrinologia da Reprodução. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/favet/bioquímica>>. Porto Alegre, p. 47-65, 2002.

GORETTI, R. G. *Transferência de embriões equinos 48h após a aplicação de luteolítico: concentração sérica de progesterona e de proteínas do fluido uterino*. 2005. 47 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2005.

GRIFFIN, P. J.; GINTHER, O. J. Dynamics of uterine diameter and endometrial morphology during the estrous cycle and early pregnancy in mares. *Animal Reproduction Science*, 25, 133-142, 1991.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. *Reprodução*. 7. ed. Barieri: Manole, 2004. 513 p.

HANSEL, W.; BLAIR, R. M. Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. *Theriogenology*, v. 45, p. 1267-1294, 1996.

HAYES, K. E. N.; PIERSON, R. A.; SCRABA, S. T.; GINTHER, O. J. Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. *Theriogenology*, v. 24, p. 465-477, 1985.

HAYES, K. E. N.; GINTHER, O. J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. *Theriogenology*, v. 25, p. 581-590, 1986.

HUGHES, J. P. Estrous cycle and ovulation in the mare. *Journal of the American Veterinary Medical Association – F.A.V.M.A.*, v. 161, p. 1367-1374, 1972

HUGHES, J. P.; COUTO, M. A.; STABENFELD, G. H. Luteal Phase Ovulation: What are the options? *Theriogenology*, v. 26, p. 123-125, 1986.

IMEL, K. J.; SQUIRES, E. L.; ELSDEN, R. P.; SHIDELER, R. K. Collection and transfer of equine embryos. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 179, p. 987-91, 1981.

IULIANO, M. S.; SQUIRES, E. L.; COOK, V M. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. *J. Anim. Sci.*, v. 60, n. 1, p. 258-263, 1985.

JACOB, J. C. F.; DOMINGUES, I. B.; GASTAL, E. L. The impact of degree of synchrony between donors and recipients in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 545, 2002.

JACOB, J. C. F.; SANTOS, G. O.; OLIVEIRA, J. P.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. Evaluation of reproductive parameters in a commercial equine embryo transfer program. *Animal Reproduction Science*, v. 121S, p.305-306, 2010.

JOHNSON, W. J.; PHILLIPS, M. C.; ROTHBLAT, G. H. Lipoproteins and cellular cholesterol homeostasis. *Sub-Cellular Biochemistry*, v. 28, p. 235-276, 1997.

JUENGEL, J. L.; MEBERG, B. M.; TURZILLO, A .M.; NETT, T. M.; NISWENDER, G. D. Hormonal regulation of mRNA encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. *Endocrinology*, v. 136, p. 5423-5429, 1995.

KELLY, C. M.; HOYER, P. B.; WISE, M. E. In-vitro and in-vivo responsiveness of the corpus luteum of the mare to gonadotropin stimulation. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 84, p. 593-600, 1988.

KRISANS, S. K. Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 804, p. 142-164, 1996.

LESTAVEL, S.; FRUCHART, J. C. Lipoprotein receptors. *Cellular and Molecular Biology*, v. 40, p. 4461-4481, 1994.

LOPES, E. P. *Parâmetros reprodutivos de éguas Mangalarga Marchador em projeto comercial de transferência de embriões*. 2004. 49 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

LOPES, E. P.; SIQUEIRA, J. B.; PINHO, R. O.; GUIMARÃES, J. D.; ROCHA, A. N.; CARVALHO, G. R.; TORRES, C. A. A. Reproductive parameters of mangalarga marchador mares in a commercial embryo transfer programme. *Reprod Dom. Anim.*, v. 46, p. 261-267, 2010.

MALINOWSKY, K. *Recent advances in reproduction in horses*. 2002. Disponível em: <<http://www.rce.rutgers.edu/pubs/pdfs/fs717>>. Acesso em: 26 mar. 2013.

McCRACKEN, J. A.; EDWARD, E. C.; LAMSA, J. C. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.*, v. 79, n. 2, p. 263-323, 1999.

McCUE, P. M.; VANDERWALL, D. K.; KEITH, S. L. Equine embryo transfer: influence of endogenous progesterone concentration in recipients on pregnancy outcome. *Theriogenology*, v. 51, p. 267, 1999.

McDONALD, L. E. Hormones of the pituitary gland. In: BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. (Ed.) *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 6. ed. Iowa: Iowa State University Press, 1988.

McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Morphologic assessment of the equine embryo. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 192, p. 401-406, 1988a.

McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Equine embryo transfer. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, v. 4, p. 305-333, 1988b.

McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine reproduction*. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1993, 1115 p.

MILLER, K. F.; WESSON, J. A.; GINTHER, O. J. Interaction of estradiol and nonsteroidal follicular fluid substance in the regulation of gonadotropin secretion in the mare. *Biology Reproduction*, v. 24, p. 354-358, 1981.

NEELY, D. P.; KINDAHL, H.; STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. E.; HUGHES, J. P. Prostaglandin release patterns in mares. Physiological, pathophysiological and therapeutic responses. *Journal of Reproduction and Fertility*, p. 181-189, 1979. (Supplement 27).

NEWCOMBE, J. R.; MARTINEZ, T. A.; PETERS, A. R. The effect of gonadotropin releasing hormone analog, buserelin, on pregnancy rates in horse and pony mares. *Theriogenology*, v. 55, p. 1619-1631, 2001.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, K. M.; MCINTUSH, E. W. Mechanism controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, v. 80, p. 1-29, 2000.

NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*, v. 123, p. 333-339, 2002.

NISWENDER, G. D.; NETT, T. M. Luteal Phase. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.) *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, Cap. 18, p. 172-175, 1993.

PAPADOPOULOS, V.; AMRI, H.; BOUJRAD, N.; CASCIO, C.; CULTY, M.; GARNIER, M.; HARDWICK, M.; LI, H.; VIDIC, B.; BROWN, S. A.; REVERSA, J. L.; BERNASSAU, J. M.; DRIEU, K. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids*, v. 62, p. 21-28, 1997.

PASCOE, D. R.; LIU, I. K. M.; SPENSLEY, M. S.; HUGHES, J. P. Effect of endometrial pathology on the success of non-surgical embryo transfer. *Equine Vet. J.*, p. 108-110, 1985. (Suppl. 3)

PELEHACH, L. M.; SHARP, D. C.; PORTER, M. B.; DIXON, L. N.; MCDOWELL, K. J. Role of oestrogen and progesterone in the control of uterine edema in pony mares. *Biol. Reprod.*, v. 62, p. 386, 2000. (Suppl.)

PELEHACH, L. M.; GREAVES, H. E.; PORTER, M. B.; DESVOUSGES, A.; SHARP, D. C. The role of estrogen and progesterone in the induction and dissipation of uterine edema in mares. *Theriogenology*, v. 58, p. 441-444, 2002.

PIERCE, J. G.; PARSONS, T. F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, v. 50, p. 465-495, 1981.

PYCOCK, J. F.; DIELEMAN, S.; DRIFJHOUT, P. *et al.* Correlation of plasma concentrations of progesterone and oestradiol with ultrasound characteristics of the uterus and duration of oestrous behavior in the cycling mare. *Reproduction of Domestic Animals*, v. 30, p. 224-227, 1995.

REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. *Rev. Reprod.*, v. 1, p. 182-192, 1996.

SILVA, L. A. *Técnica ultra-sonográfica de injeção intra-uterina para transferência de embriões em equinos*. 2003. 49 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003. 49 p.

SISTEMA DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS E GENÉTICA (SAEG), UFV, Central de Processamento de Dados, Viçosa-MG, 1999.

SOUZA, F. A. C. *Efeitos da gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre as características reprodutivas de fêmeas equinas candidatas a receptoras de embriões*. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2006.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F.W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 2-10, 2004.

SQUIRES, E. L.; IMEL, K. J.; IULIANO, M. F.; SHIDELER, R. K. Factors affecting reproductive efficiency in equine embryo transfer programme. *J. Reprod. Fertil.*, p. 409-414, 1982a. (Suppl. 32)

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

SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; McCUE, P. M.; BRUEMER, J. E. Embryo technologies in horses. *Theriogenology*, v. 59, p. 151-170, 2003.

STEVENS, V. L.; XU, T.; LAMBETH, J. D. Cholesterol trafficking in steroidogenic cells: reversible cycloheximide-dependent accumulation of cholesterol in a progesteronic pool. *European Journal of Biochemistry*, v. 216, p. 557-563, 1993.

VANDERWALL, D. K. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, v. 12, n. 1, p. 61-84, 1996.

WATSON, E. D.; COLSTON, M.; BROADLEY, C. LH and progesterone concentrations during diestrus in the mare and the effect of hCG. *Theriogenology*, v. 43, p. 1325, 1995.

WATSON, E. D.; SERTICH, P. L. Secretion of prostaglandins and progesterone by cells from corpora lutea of mare. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 88, p. 223-229, 1990.