

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**  
**Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**"EFEITO DO eCG SOBRE PARÂMETROS OVARIANOS E ENDOMETRIAIS  
ASSOCIADO A PROTOCOLO HORMONAL DE ANTECIPAÇÃO DA CICLICIDADE  
EM ÉGUAS"**

**ANA CAROLINA BAHIA TEIXEIRA**

Belo Horizonte 2024  
Escola de Veterinária – UFMG

**ANA CAROLINA BAHIA TEIXEIRA**

**"EFEITO DO eCG SOBRE PARÂMETROS OVARIANOS E ENDOMETRIAIS  
ASSOCIADO A PROTOCOLO HORMONAL DE ANTECIPAÇÃO DA CICLICIDADE  
EM ÉGUAS"**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Medicina Veterinária/Ciência Animal em Belo Horizonte, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutor em Reprodução Animal.

Orientador<sup>a</sup>: Letícia Zoccolaro Oliveira

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

## ATA

### ESCOLA DE VETERINÁRIA COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

#### ANA CAROLINA BAHIA TEIXEIRA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração REPRODUÇÃO ANIMAL.

Aprovado(a) em 03 de maio de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Leticia Zoccolaro Oliveira - Orientador(a)

Dr.(a). Erika Cristina Jorge

Dr.(a). Guilherme Pugliesi

Dr.(a). Fabiola de Oliveira Paes Leme

Dr.(a). Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

Dr.(a). Fernanda Saules Ignacio

Dr.(a). Elisa Sant'ana Monteiro da Silva

 Documento assinado eletronicamente por **Leticia Zoccolaro Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 03/05/2024, às 14:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

 Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Professora do Magistério Superior**, em 03/05/2024, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

 Documento assinado eletronicamente por **Erika Cristina Jorge, Professora do Magistério Superior**, em 06/05/2024, às 10:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

 Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Pugliesi, Usuário Externo**, em 06/05/2024, às 10:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

 Documento assinado eletronicamente por **Elisa Sant'ana Monteiro da Silva, Usuária Externa**, em 06/05/2024, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

 Documento assinado eletronicamente por **Fabiola de Oliveira Paes Leme, Professora do Magistério Superior**, em 07/05/2024, às 08:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

 Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Saules Ignácio, Usuária Externa**, em 15/05/2024, às 09:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 3195400 e o código CRC 9FB0B071.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me permitir alcançar os objetivos propostos ao longo desta caminhada. A professora e orientadora Letícia Zoccolaro Oliveira pela orientação, apoio e confiança, se tornando além de mestre exemplo como profissional e ser humano. Agradeço sobretudo pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

Um agradecimento especial a todos os professores e funcionários que me acompanharam durante o doutorado, que me ensinaram não apenas o conhecimento racional, mas a manifestação do caráter e afetividade, e à CAPES, por me conceder a bolsa de estudos.

Agradeço também aos haras parceiros que abriram gentilmente as portas para receber nossos experimentos. Aos professores Fabíola de Oliveira Paes Leme, Erika Cristina Jorge e Renato de Lima Santos, que abraçaram nossa pesquisa contribuindo para as análises laboratoriais realizadas, ao professor Guilherme Pugliesi que com maestria nos forneceu conhecimento necessário para que as avaliações ultrassonográficas modo doppler pudessem se tornar realidade. Um agradecimento especial para minhas companheiras de caminhada Isabelle Cristina e Juliana Horta, que me apoiaram incondicionalmente dividindo conhecimentos sob a mesma orientação. Além de todos os estagiários e amigos que me auxiliaram nesta caminhada.

Um Agradecimento sincero e muito especial a toda minha família, principalmente meus pais, Rogério e Denise, junto a minha irmã Mariana, que deram apoio nos dias difíceis e me fizeram acreditar nos meus sonhos. Ao meu namorado, José Andrés, que acompanhou de perto todo processo experimental e crescimento doutoral, me incentivando em obstáculos ao longo do caminho e compartilhando as alegrias do dia a dia, tornando não só meu ponto de apoio no durante o doutorado, mas meu parceiro de vida.

Enfim, a todos pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

*Conheço pessoas de ação que sempre serão de ação. Sabem por quê? Eu lhes direi por quê.  
Porque sempre terminam aquilo que começam.*

*(autor desconhecido)*

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar as características ovulatórias e lúteas, bem como a expressão gênica uterina e a morfologia endometrial, em éguas de transição que receberam gonadotrofina coriônica equina (eCG) como parte de um protocolo de indução de ovulação com hCG baseado em progesterona (P4) durante o período de inverno tardio. Nos experimentos I (n=23) e II (n=8), um total de 31 éguas mestiças tiveram dispositivo liberador intravaginal de P4 (2,0g) implantado por dez dias. Após a remoção do dispositivo P4, o crescimento folicular foi monitorado, com éguas recebendo 500 UI de eCG (Grupo eCG) ou 2,5 ml de solução salina (Grupo Controle) quando o folículo ovariano dominante (FD) atingisse 30 mm de diâmetro. Em ambos os grupos, a gonadotrofina coriônica humana (hCG; 2.000 UI) foi administrada assim que um folículo ovulatório (FO)  $\geq$  35mm de diâmetro foi detectado. A ultrassonografia ovariana foi realizada desde o início do protocolo (D0) até 20 dias pós-ovulação. Do 3º ao 20º dia após a ovulação, a ultrassonografia foi realizada no modo Doppler colorido. As concentrações de P4 foram avaliadas por quimioluminescência e foram realizadas biópsias uterinas para avaliar a expressão dos genes ESR1, ESR2, PGR e P19, além de análises histopatológicas. Os dados intergrupos foram comparados por meio de testes T com nível de significância de  $P < 0,05$ . Taxas de crescimento folicular antes ( $P = 0,554$ ) e depois ( $P = 0,257$ ) da remoção do dispositivo P4, taxa de ovulação ( $P = 0,193$ ), tempo até a ovulação ( $P = 0,998$ ), diâmetro OF no momento da ovulação ( $P = 0,618$ ), diâmetro do corpo lúteo (CL) aos 10 dias ( $P = 0,751$ ), 12 dias ( $P = 0,512$ ) e 14 dias ( $P = 0,181$ ) após a ovulação, e níveis séricos de P4 nesses mesmos momentos ( $P = 0,116$ ,  $P = 0,712$ ,  $P=0,895$ , respectivamente), foram semelhantes entre os dois grupos. A perfusão lútea foi reduzida (D10:  $P=0,025$ ; D11:  $P=0,036$ ; D12:  $P=0,0181$ ; D13:  $P=0,0313$ ) no grupo eCG em comparação às éguas controle do décimo ao décimo terceiro dia após a ovulação. Maior diâmetro glandular ( $P= 0,0496$ ) e altura epitelial ( $P= 0,0373$ ) do endométrio foram observados no grupo eCG aos 10 dias após a ovulação, mas não aos 14 dias após a ovulação ( $P=0,7351$  e  $P=0,8495$ , respectivamente). A expressão dos genes ESR1 ( $P=0,003$ ) e P19 ( $P=0,001$ ) foi reduzida no grupo eCG. Concluiu-se que o tratamento com

eCG reduziu a perfusão luteal e reprimiu a expressão de ESR1 e P19 no útero de éguas em transição.

Palavras-chave: corpo lúteo, equino, fertilidade, expressão gênica, útero.

## **Abstract**

The objective of this study was to evaluate ovulatory and luteal characteristics, as well as uterine gene expression and endometrial morphology, in transitional mares that received equine chorionic gonadotropin (eCG) as part of a progesterone (P4)-based hCG ovulation induction protocol during late winter. In experiments I (n=23) and II (n=8), a total of 31 crossbred mares had an intravaginal P4 releasing device (2.0g) implanted for ten days. Following P4 device removal, follicular growth was monitored, with mares receiving either 500 IU of eCG (eCG Group) or 2.5 ml of saline solution (Control Group) once a dominant ovarian follicle (DF) had reached 30mm in diameter. In both groups, human chorionic gonadotropin (hCG; 2.000 IU) was administered as soon as an ovulatory follicle (OF)  $\geq$  35mm in diameter, was detected. Ovarian ultrasonography was performed from the beginning of the protocol (D0) until 20 days post-ovulation. From days 3 to 20 post ovulation, ultrasound was performed using color doppler mode. P4 concentrations were assessed via chemiluminescence, and uterine biopsies were performed in order to assess expression of the ESR1, ESR2, PGR, and P19 genes, in addition to histopathological analyses. Intergroup data were compared using T tests with a significance level of  $P < 0.05$ . Follicular growth rates before ( $P=0.554$ ) and after ( $P=0.257$ ) P4 device removal, ovulation rate ( $P=0.193$ ), time to ovulation ( $P=0.998$ ), OF diameter at the time of ovulation ( $P=0.618$ ), corpus luteum (CL) diameter at 10 days ( $P=0.751$ ), 12 days ( $P=0.512$ ), and 14 days ( $P=0.181$ ) after ovulation, and serum P4 levels at those same times ( $P= 0.116$ ,  $P=0.712$ ,  $P=0.895$ , respectively), were similar between the two groups. Luteal perfusion was decreased (D10:  $P=0.025$ ; D11:  $P=0.036$ ; D12:  $P=0.0181$ ; D13:  $P=0.0313$ ) in the eCG group compared to control mares from the tenth to thirteenth day after ovulation. Greater glandular diameter ( $P= 0.0496$ ) and epithelial

height (P= 0.0373) of endometrium were observed in the eCG group at 10 days after ovulation, but not at 14 days after ovulation (P=0.7351 and P=0.8495, respectively). Expression of ESR1 (P=0.003) and P19 (P=0.001) genes were reduced in the eCG group. It was concluded that the eCG treatment reduced the luteal perfusion and repressed ESR1 and P19 expression in the uterus of transitional mares.

**Keywords:** corpus luteum, equine, fertility, gene expression, uterus.

---

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

<b>FIGURA 01</b>	Corte histológico de égua	52
<b>FIGURA 02</b>	Corte de endométrio mostrando suas estruturas	54
<b>FIGURA 03</b>	Endométrio no anestro	57
<b>FIGURA 04</b>	Edema endometrial	65
<b>FIGURA 05</b>	Ultrassonografia transretal	65
<b>FIGURA 06</b>	Endométrio no início do estro	66
<b>FIGURA 07</b>	Imagem ultrassonográfica do folículo em dominância seguido de edema uterino e posterior ovulação	67
<b>FIGURA 08</b>	Endométrio no diestro	68

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

CL	Corpo Lúteo
E2	Estrógeno
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
FSH	Hormônio folículo estimulante
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
LH	Hormônio luteinizante
P4	Progesterona
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2alfa
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina-1
PAPP-A	Proteína A plasmática associada a prenhez
IGFR-1	Receptor de fator de crescimento semelhante a insulina-1
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
eFSH	FSH equino purificado
ER	Receptores de estrógeno
PR	Receptores de progesterona
ALT	Altrenogest
VEFG	Fator de crescimento do endotélio vascular
P19	Uterocalina

IGFBP2	Proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante a insulina-2
EPS1	Fator inibidor da síntese de prostaglandina
MUC1	Glicoproteínas tipo mucina
SC	<i>Stratum compactum</i>
SS	<i>Stratum Spongiosum</i>
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
PG	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
IL	Interleucinas
PKA	Proteína quinase A
NFkB	Fator nuclear

**SUMÁRIO**

1.0	<b>ANTECIPAÇÃO DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA EM ÉGUAS.....</b>	14
2.0	<b>RELAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS DO CL COM A PRODUÇÃO DE P4, AMBIENTE UTERINO E FERTILIDADE NA ÉGUA.....</b>	36
3.0	<b>MODULAÇÃO DO AMBIENTE UTERINO NAS DIFERENTES FASES DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA (ANESTRO, TRANSIÇÃO E FASE CÍCLICA.</b>	52
4.0	<b>HIPÓTESE.....</b>	75
5.0	<b>OBJETIVOS.....</b>	76
5.1	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	76
5.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	76
6.0	<b>ARTIGO 01: Influence of equine chorionic gonadotropin (eCG) on uterine tissue in transitional mares submitted to na P4-based protocol of ovulation induction with human chorionic gonadotropin (hCG).....</b>	77
7.0	<b>ARTIGO 02: Comparison of serum progesterone levels during intravaginal device insertion in mares.....</b>	114

## Revisão de Literatura

### 1- Antecipação da estação reprodutiva em éguas

As éguas são animais poliéstricos estacionais, influenciadas pelo fotoperíodo com ciclos ovulatórios regulares ocorrendo em resposta ao aumento da duração da luz/dia (Hanlon e Firt, 2012; Satué e Gardón, 2013; Polo *et al.*, 2016). Assim, a depender da localização geográfica, apresenta períodos de atividade reprodutiva, chamada de estação ovulatória com ciclos de estro regulares e períodos de inatividade reprodutiva, chamada de estação anovulatória (Nagy *et al.*, 2000; Ginther *et al.*, 2005; Schutzer, 2014). Desta forma, de maneira geral, o ciclo reprodutivo possui 4 períodos diferentes regulados por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente os hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas e os esteróides sexuais: período de transição primaveril; estação reprodutiva; período de transição de outono e anestro invernal (Satué e Gardón, 2013).

O período de transição de primavera ocorre após o anestro invernal, no início da primavera, com a mudança gradual na luminosidade e duração média de 60 - 80 dias, mas com grande variabilidade tanto em características quanto em duração. Nesse período, as éguas estão retornando a ciclicidade, sendo caracterizado pelo comportamento errático do estro, irregular e longo e também por crescimento e regressão dos folículos ovarianos que falham na ovulação (Hanlon *et al.*, 2010; Hanlon e Firt, 2012; Satué e Gardón, 2013). Ainda, ocorrem secreções crescentes do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e elevação periódica na concentração do hormônio folículo estimulante (FSH), enquanto as concentrações do hormônio luteinizante (LH) permanecem reduzidas até pouco antes da primeira ovulação (Staempfli *et al.*, 2011; Dutra, 2016). Segundo Aurich (2011), as concentrações plasmáticas médias de FSH e o conteúdo hipofisário de FSH são constantes ao longo do ano, enquanto as concentrações plasmáticas médias de LH atingem um máximo no verão, são mais baixas em éguas anovulatórias e quase indetectáveis durante o anestro de inverno.

O aumento do FSH estimula o crescimento folicular com ondas menores de múltiplos folículos de 6 a 21mm de diâmetro, que regridem simultaneamente na ausência de um folículo dominante. Os folículos maiores produzem E2 e inibina, fatores estes

inibitórios ao FSH. Porém, com a ausência de folículos pré-ovulatórios (em situações de carência de LH hipofisário), baixos níveis de E2 e de inibina são visualizados, reduzindo o feedback negativo do FSH, de modo que, os níveis de FSH permanecem elevados. Além disso, a deficiência sazonal de LH resulta não só em menores concentrações de E2, mas também redução de outros fatores presentes no fluido folicular como o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), causando falha ovulatória (Satué e Gardón, 2013).

Durante a fase final do período de transição primaveril, ocorrem ondas foliculares maiores por influência do fotoperíodo quando os folículos alcançam diâmetros similares aos de folículos pré-ovulatórios, com 35mm de diâmetro. Nesse período, a maioria desses folículos sofrem atresia, mas alguns podem atingir tamanhos maiores e dominância folicular sem que ocorra a ovulação, justamente devido aos baixos níveis hormonais de LH nesse período (Aurich, 2011; Satué e Gardón, 2013). Adicionalmente, os folículos dominantes das ondas foliculares anovulatórias da estação de transição primaveril, devido a presença de menores concentrações de LH circulante, apresentam uma camada da teca pouco desenvolvida, escassa vascularização e deficiência na esteroidogênese (Donadeu e Watson, 2007). Portanto, durante o período transicional, os níveis de alguns fatores presentes no fluido folicular reduzem suas concentrações quando comparados a estação de monta, devido a associação temporal de baixo crescimento folicular e consequentes mudanças nos níveis foliculares de fatores como inibina, estradiol, androstenediona e progesterona (Donadeu, 2006).

Embora o FSH incite a expressão de aromatases nas células da granulosa, responsável pela conversão de andrógenos de origem tecal em estradiol, flutuações nas concentrações plasmáticas de FSH (embora menos variável que LH) durante a transição geram instabilidade na produção de esteroides. Ainda, níveis elevados de FSH são necessários para gerar um incremento intrafolicular da proteína A plasmática associada a prenhez (PAPP-A), que por sua vez aumenta a biodisponibilidade local do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) no folículo (Bliss *et al.*, 2010). Em bovinos, a maior produção de IGF-1 pelo folículo em dominância, estimula mitoses das células da granulosa, produção de progesterona, produção de andrógenos induzidos por LH e

produção do estradiol, onde na ausência de um folículo dominante, estes estariam reduzidos (Spicer, 1995). Em equinos, Sticker et al. (1995), relata que a secreção de IGF-1 é um importante fator para o desenvolvimento folicular, onde o tempo entre o primeiro estro acompanhado de ovulação foi menor em éguas ganhando peso corporal daquelas que perderam peso.

Spicer e Geisert (1992), demonstraram que folículos pequenos contêm menor quantidade de IGF-1 em relação a folículos grandes, e que este fator é capaz de estimular as células da granulosa. Estas células por sua vez, possuem uma concentração crescente de RNAm para o receptor de IGF1 (IGFR-1), especialmente durante o desenvolvimento final do folículo. Esses fatores de crescimento estão envolvidos com a proliferação e diferenciação celular (Berisha e Schams, 2005). Desta forma, folículos que se desenvolvem sob estímulo insuficiente de FSH e LH apresentam baixas concentrações intrafoliculares de IGF-1, estando relacionado a falhas ovulatórias (Watson *et al.*, 2004). Por fim, em relação as células foliculares, a teca produz andrógenos em resposta ao LH e as células da granulosa convertem andrógenos em estrógenos em resposta ao FSH, onde baixos níveis de gonadotrofinas levam a menor produção de andrógenos e estrógenos (Bever e Dieleman, 1987). Assim, as baixas concentrações de LH em períodos de transição estacional contribuem para inadequadas produções de fatores angiogênicos e fatores tróficos que sustentam o desenvolvimento dos folículos (Watson e Al-zi'abi, 2002).

A medida que a luminosidade aumenta, retomando gradualmente a liberação de LH e esteroidogênese em folículos anovulatórios, desencadeia-se o evento chave que leva à primeira ovulação (Aurich, 2011).

A informação fotoperiódica têm seu início a partir da captação de luz pela retina, cuja informação é conduzida pelo nervo óptico ao núcleo hipotalâmico supraquiasmático. Os núcleos através das informações recebidas por células especializadas da retina, denominadas 'células ganglionares fotossensíveis' possuem a capacidade de definir o início do dia/noite. Esse relógio intrínseco do núcleo supraquiasmático emite projeções neurais a outras áreas do SNC (Maronde e Stehle, 2007).

Dentre as áreas, a glândula pineal ou epífise que têm sua origem observada como uma evaginação neuroepitelial do teto do terceiro ventrículo sob a extremidade posterior do corpo caloso, localizada no centro do cérebro, também recebe informações provenientes dos núcleos supraquiasmáticos, através do gânglio cervical superior. Tais vias seguem para a medula espinhal e atingem os neurônios vegetativos da coluna intermédio lateral, passando pela cadeia ganglionar cervical e aderidos a carótida interna atingem a glândula. Nestes locais, terminais  $\beta$ -adrenérgicos são visualizados, onde se aderem a receptores de membrana, fazendo com que haja uma ativação do sistema AMP cíclico viabilizando a produção do hormônio melatonina pela glândula pineal. Este neurohormônio é então produzido e secretado durante a noite gerando sinais que controlam as repostas fotoperiódicas sazonais (Nagy *et al.*, 2000; Meronde e Stehle, 2007)

As informações geradas pelos níveis de melatonina, indicam ao animal não apenas a hora do dia, mas a época do ano em que ele se encontra. Nagy et al. (2000), relata o desconhecimento de literatura sobre o local exato de ação da melatonina em equinos, porém apesar de suas funções não serem totalmente conhecidas sabe-se que em dias de menor luminosidade, a secreção de melatonina é ainda estimulada pela norepinefrina secretada pelos neurônios sinápticos pós-ganglionares do gânglio cervical superior. A ação da melatonina é mediada por receptores: MT1, MT2 e MT3, onde em mamíferos os dois primeiros se destacam, sendo pertencentes a família dos receptores ligados a proteínas G. Os receptores MT1 e MT2 são expressos em diversas partes do sistema nervoso central, e quando ativados, possibilitam a interação de moléculas envolvidas na sinalização celular (Witt-enderby *et al.*, 2003). Sendo assim, os receptores permitem que a melatonina exerça vários papéis na reprodução, principalmente desencadeando eventos que afetam (positiva ou negativamente) o hipotálamo e a produção de GnRH (David, 2011).

No caso da égua, o aumento da melatonina em fases de menor luminosidade gera uma resposta inibitória aos neurônios hipotalâmicos secretores de GnRH. Sendo assim em espécies sazonais, a reprodução é então regulada pela melatonina, que ativa seus receptores encontrados em diferentes locais (neurônios hipotalâmicos liberadores de GnRH por exemplo). Este mecanismo sob efeito de estímulos luminosos, reduz a

liberação de norepinefrina na glândula pineal, ocorrendo queda na liberação de melatonina, alavancando a produção de GnRH (Oliveira, 2015).

Após o término da estação de transição primaveril e queda da produção de melatonina, inicia-se a atividade reprodutiva regular, característica da estação ovulatória. O aumento das concentrações de LH permitem que o folículo dominante produza mais E2, se tornando um folículo pré-ovulatório capaz de induzir o pico de LH, levando à primeira ovulação. Essa primeira ovulação indica o início da estação ovulatória na qual começa a atividade cíclica (Satué e Gardón, 2013). Portanto, o fator mais importante para o reinício da atividade ovulatória no final da fase de transição é a ocorrência de picos pré-ovulatórios de LH (Ginther, 2000).

Vários protocolos, incluindo exposição a luz artificial e protocolos hormonais, têm sido usados para antecipar a estação reprodutiva, com o objetivo de produzir partos em início de estação, permitindo mais tempo para treinamento de competição (Hanlon e Firth, 2012; Polo *et al.*, 2016). Além disso, quando as fêmeas ovulam mais precocemente um maior número de ciclos estrais poderá ser trabalhado, o que aumenta o número de éguas prenhes no final da estação de monta (Hanlon *et al.*, 2012). Porém, apesar da exposição de éguas ao fotoperíodo artificial ser uma das principais estratégias utilizadas para antecipar o início da estação reprodutiva (Squires, 2008), a fotoestimulação possui difícil aplicabilidade além de requerer considerável investimento financeiro inicial para preparação da estrutura e manutenção dos animais durante o período de tratamento. Neste sentido, Guillaume *et al.* (2000) concluíram que são necessários 35 dias com 25W de luz branca incandescente durante uma hora/dia, para estimular a atividade reprodutiva. Aurich (2011) cita em seu trabalho que um programa fixo de 15 horas luz começando no início de dezembro (no hemisfério norte) se provou mais eficaz em antecipar o início dos ciclos ovulatórios em comparação com éguas não tratadas com iluminação artificial. Adicionalmente, Schutzer *et al.* (2014) compararam diferentes períodos de duração da exposição a luminosidade artificial, ambos com exposição diária de 5 horas em éguas acíclicas (17:00 às 22:00), durante 35 dias ou 60 dias, sendo 80lux incandescente fria. Os autores concluíram que a fotoestimulação por 35 dias é tão eficaz quanto o protocolo de

60 dias de luz artificial diária, com objetivo de antecipação da ciclicidade de éguas em fase de anestro sazonal, em condições subtropicais.

Uma outra alternativa para acelerar a ovulação em éguas de transição com mínima atividade ovariana considerável é a realização de duas injeções diárias de análogos de GnRH ou FSH equino purificado (eFSH) (Aurich, 2011). Uma grande variedade de trabalhos utilizando regimes de administração repetida ou contínua de GnRH são relatadas como sendo eficientes para estimular a ovulação e crescimento folicular em éguas em estações anovulatórias em períodos de transição. Garcia e Ginther (1975) realizaram o primeiro relato envolvendo a administração diária de GnRH em éguas transicionais, resultando em aumentos transitórios de LH. Além disso, quando testada a infusão de forma constante, a liberação contínua de LH foi visualizada. Em trabalho realizado por Gentry et al. (2002), em éguas em anestro com a administração por 28 dias de um análogo do GnRH, conclui-se que a administração diária deste análogo leva a um aumento imediato das concentrações de gonadotrofinas hipofisárias e que esse aumento de LH e FSH progride com o decorrer do tempo, indicando estimulação da produção e da estocagem dessas gonadotrofinas na hipófise.

Conforme anteriormente mencionado, o eFSH também pode acelerar a ovulação em éguas pois promove o desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório responsivo a indução, ignorando o eixo hipotalâmico-hipofisário, estimulando diretamente o ovário (Raz, 2009). Nesse sentido, Niswender et al. (2004) testaram o uso do eFSH em 10 éguas durante o período de transição, onde aplicações de 12,5mg de eFSH eram realizadas 2x ao dia, iniciando-se quando os folículos apresentavam tamanho  $\geq 25\text{mm}$  até que atingissem  $\geq 35\text{mm}$  de diâmetro, quando era aplicado Gonadotrofina Coriônica humana (hCG). Os autores observaram ovulação em 80% (8/10) das éguas tratadas e concluíram que, embora o tratamento com eFSH tenha sido eficaz em antecipar a primeira ovulação sua obtenção é de difícil acesso pois o fármaco em questão não é produzido comercialmente sendo, por esse motivo, um fator limitante para sua aplicação de maneira rotineira.

Adicionalmente, o tratamento com os antagonistas da dopamina, sulpirida ou domperidona também têm sido usados para induzir a ovulação em éguas em fase de transição (Squires, 2008).

O papel da dopamina na reprodução equina tem sido estudado, indicando que as suas concentrações no fluido cerebrospinal são mais altas em éguas durante estações não ovulatórias quando comparadas a éguas cíclicas. Além disso suas concentrações estão inversamente relacionadas as concentrações de LH (Melrose *et al.*, 1990). Na espécie equina, a dopamina inibe a secreção de prolactina que possui um efeito estimulatório direto sobre os ovários. Nequin *et al.* (1993), em éguas em período de anestro, relata que a prolactina endógena quando aumentada de forma artificial (através do bloqueio de receptores para dopamina ou pela administração exógena de prolactina), promove considerável aumento no crescimento folicular. Semelhantemente, em éguas em anestro, Besognet *et al.* (1997), usando sulpirida ou domperidona (dois antagonistas de dopamina), uma vez ao dia, adiantou o início da atividade reprodutiva nas éguas. Éguas em anestro utilizando 0,5 mg/kg de sulpirida (duas vezes ao dia) apresentaram maiores concentrações de prolactina, que aumenta a sensibilidade dos folículos aos níveis de FSH e LH circulantes, estimulando recrutamento inicial e desenvolvimento de folículos antrais (Daels *et al.*, 2000).

O domperidona, por sua vez, é um antagonista específico de receptores D da dopamina, mas não possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. A dopamina atua como inibidor endógeno de liberação de gonadotrofinas e a utilização de um antagonista do receptor de dopamina potencializa o GnRH (Peter e Yu, 1997). Em trabalho realizado por Brendemuehl e Cross (2000), a administração de domperidona possibilitou um aumento plasmático de prolactina, LH e de estrógeno, porém não foi observada diferenças nas concentrações de FSH entre os animais controle e tratamento.

Uma outra forma de manipulação farmacológica para antecipação da ciclicidade de éguas é a utilização de progestágenos. De acordo com Vigo *et al.* (2011), os progestágenos são esteroides que podem ser sintéticos ou naturais.

A progesterona (P4) é o único progestágeno natural e os progestágenos sintéticos tentam mimetizar o efeito da progesterona, sendo considerados progestinas. A

progesterona e os progestágenos sintéticos, por sua vez, são frequentemente usados para gerenciar o período de transição em éguas (Piette, 2018), embora o sucesso do tratamento com progestina ou progesterona dependa do estágio da fase de transição e do tamanho folicular. De maneira geral, quanto mais avançado o período transicional, mais alta a probabilidade da égua ovular após o tratamento. A administração de progestágenos pode ser realizada por via intramuscular, via oral, via subcutânea ou intravaginal (Pickar, 2018), podendo ser administrada de forma isolada ou em conjunto com outros hormônios. Várias vias de administração de progestágenos sintéticos e naturais, isoladamente ou em combinação com prostaglandinas, GnRH e/ou hCG foram testadas em éguas (Handler *et al.*, 2006).

O uso de P4 em éguas de transição foi primeiro relatado por Niekerk *et al.* (1973) e Aurich (2011), onde a injeção de 100 mg de progesterona oleosa foi administrada diariamente durante sete dias em éguas na fase de transição final, promovendo a ovulação entre seis e sete dias após o final do tratamento. O progestágeno sintético de escolha para maioria dos protocolos é o Altrenogest (ALT), aplicado de forma intramuscular, sendo mais potente ao receptor de P4 do que a própria P4 fisiológica. Em estudo realizado por Mcrobb *et al.* (2008), o Altrenogest foi seis vezes mais potente como andrógeno que a testosterona além de ser uma progestina treze vezes mais potente que a progesterona. Porém, embora esse fármaco se mostre eficaz na sincronização de estro, acelerando a primeira ovulação em éguas de transição e mantendo a gestação na ausência de P4 luteal (Faria *et al.*, 2010; Fedorka, 2019), a aplicação intramuscular de P4 em óleo pode ser, em determinadas situações, de pouca praticabilidade, quando se tem a necessidade de injeções recorrentes (Handler *et al.*, 2006). O ALT de administração oral também pode ser utilizado durante a fase de transição em éguas cíclicas (Handler *et al.*, 2006), com absorção e pico de concentração plasmática após 3 - 6 horas, respectivamente (Canisso *et al.*, 2013). Entretanto, embora igualmente eficaz, é um fármaco de difícil controle de dose diária devido à sua baixa palatabilidade (Negretti *et al.*, 2018).

A indução de estro e ovulação em éguas por meio da utilização de dispositivos intravaginais de P4 baseia-se no efeito inibitório do hormônio no eixo hipotálamo-hipófise durante sua aplicação. Ou seja, ocorre rápido aumento nos níveis de progesterona

com a inserção do dispositivo e, posteriormente, queda no momento da sua retirada. Assim, durante a presença da P4, ocorre redução na secreção de GnRH/LH de modo que, após sua remoção, observa-se aumento na produção e liberação de GnRH pelo hipotálamo e das gonadotrofinas hipofisárias LH e FSH, essenciais para o crescimento folicular e ovulação (Samper *et al.*, 2007). Portanto, protocolos com a utilização de dispositivos intravaginais de P4 nas éguas nos períodos de anestro e transição têm se justificado, uma vez que a P4 não inibe completamente a foliculogênese e promove antecipação da ovulação, possibilitando o início mais precoce do período reprodutivo destes animais (Newcombe *et al.*, 2002). Como mencionado, a P4 tem sua atuação relacionada com a inibição das liberações de pulsos de alta frequência de LH e, portanto, do pico pré-ovulatório do LH (Goodman e Karsch, 1980; Kinder *et al.*, 1996; Kojima *et al.*, 2003). Assim, essa gonadotrofina acumula-se na hipófise. A retirada do dispositivo, por sua vez, leva a queda abrupta de P4 (que então atinge níveis plasmáticos aproximados de 1ng/ml), removendo-se assim o feedback negativo desse esteroide no eixo hipotâmico-hipofisário e, por maior quantidade de gonadotrofinas agora estocadas na hipófise, promove-se então o início do estro (Staempfli *et al.*, 2011).

Quando a concentração de P4 eleva-se, ocorre diminuição dos receptores de estradiol no endométrio. Adicionalmente, com exposição de forma contínua, a P4 gera supressão dos seus próprios receptores (PR) iniciando-se o desbloqueio da síntese de receptores para estrógeno (ER), possibilitando assim aumento de ER no novo estro (Hart *et al.*, 2005). Entretanto, em éguas em anestro tratadas com estradiol e progestinas, as alterações nas expressões gênicas dos ER e PR não foram tão acentuadas quanto as observadas nas éguas cíclicas (Mcdowell *et al.*, 1999).

Os compostos de P4 de longa ação, inclusos os dispositivos intravaginais, têm sido disponibilizados com o intuito de permitir a administração de P4 em uma única dose. Esses compostos de ação prolongada liberam P4 a uma taxa controlada durante um período de 7 a 10 dias, podendo então ser utilizados em uma única dose de maneira simples e de baixo custo (Staempfli *et al.*, 2011; Dutra, 2016). Isso porque o mecanismo de liberação da P4 inserida no dispositivo intravaginal ocorre por difusão passiva, onde a transferência hormonal é proporcional a magnitude do gradiente de concentração através

da membrana, ao coeficiente de lipossolubilidade da P4 e a superfície exposta ao dispositivo. O mecanismo possibilita a liberação lenta do esteroide além de manutenção dos níveis de P4 plasmática por longos períodos. Após a inserção do dispositivo a rápida absorção é relatada, onde como consequência de sua retirada, a queda de P4 acentuada irá ocorrer (Lavy *et al.*, 2006). Portanto, o mecanismo de ação da P4 intravaginal se baseia na hipótese que o intenso aumento (após inserção) e futura queda (após remoção) nos níveis de P4 em éguas nas fases de anestro e transição estacional, possam estimular a produção e liberação de GnRH hipotalâmico e consequentemente aumento de LH e FSH pela hipófise, que têm fundamental importância no estímulo do crescimento folicular e ovulação (Gomes, 2014).

De acordo com Macmillan *et al.* (1990), a liberação de P4 é associada ao tempo de inserção do dispositivo, onde a taxa diária de liberação hormonal varia relativamente pouco quando se compara diferentes dispositivos e entre indivíduos. Em outro relato, Valentim (2004), trabalhando com dispositivos de liberação lenta de P4 em vacas nelore, cita que para cada unidade de P4 (1g) aumentada em um dispositivo intravaginal, a concentração plasmática aumenta 0,513 ng/ml após 24 horas de inserção do mesmo e 0,329 após sete dias de sua permanência. Quando comparado a área de superfície de contato do dispositivo, o mesmo ocorreu, onde para cada 1cm<sup>2</sup> de área de superfície de contato do dispositivo, acrescentaria 0,0343ng/ml nas primeiras 24 horas de inserção e 0,0056ng/ml após sete dias do uso do dispositivo de P4 intravaginal. O relato ainda conclui que há um efeito maior da área de contato do que da dose impregnada no dispositivo sobre as concentrações plasmáticas de P4 logo após a inserção de um dispositivo intravaginal. Porém, ao final do período de permanência do implante, o quadro se inverte e as concentrações plasmáticas de P4 passam a ser mais influenciadas pela dose do que pela superfície de contato.

A progesterona aplicada por via intravaginal, oferece um método relativamente econômico e conveniente de administrar este esteroide, pois evita a necessidade de tratamento diário e/ou injeções (Hanlon e Firth, 2012). Os dispositivos intravaginais projetados para bovinos (CIDR, PRID) têm sido usados *off-label* em éguas e são eficazes na estimulação do crescimento folicular na transição (Hanlon e Firth, 2012). Embora

esses dispositivos não apresentem ampla aceitação, pelo fato de clinicamente estarem associados a desconforto e vaginite (Hanlon *et al.*, 2010), inúmeros trabalhos mostraram que quando há ocorrência da vaginite sua resolução é espontânea, sendo solucionada sem nenhum impacto negativo sobre número de folículos ovarianos, taxas de ovulação, edemas do endométrio e taxas gestacionais, além de não gerar perdas embrionárias em receptoras de embrião (Polasek *et al.*, 2017; Segabinazzi *et al.*, 2021). Além disso, as diferenças nos efeitos adversos em diferentes tratamentos durante o uso do implante intravaginal podem estar relacionadas com a forma de aplicação do mesmo, além da correta higiene, sendo relatado que o uso de sprays com corticosteroides pode reduzir a reação inflamatória (Polasek *et al.*, 2017).

Em trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa, em uma égua foi realizado a inserção de dispositivo intravaginal contendo 2g de P4 (um dispositivo novo de 2g de P4), em um segundo animal a utilização de dois dispositivos novos foi testada (dois dispositivos novos de 2g de P4) e uma terceira égua recebeu um dispositivo de segundo uso (um dispositivo reutilizado de 2g de P4). Em todas as éguas o implante permaneceu por 10 dias e dosagens séricas de P4 foram realizadas. Após seis horas a partir da inserção do implante, os valores de P4 já estavam acima de 1ng/ml, sendo as médias obtidas nas três éguas do estudo (desde o dia da inserção até o dia da retirada do implante) de  $3.27 \pm 0.94$  ng/mL,  $5.11 \pm 2.24$  ng/mL e  $2.78 \pm 0.72$  ng/mL de P4, respectivamente (Teixeira *et al.*, 2023). Essa rápida absorção ocorre devido à alta capacidade absorptiva da mucosa vaginal e o tipo de material utilizado para confecção dos implantes que permite uma difusão passiva do hormônio. Além disso, este mecanismo permite a liberação lenta da P4 fazendo com que os níveis plasmáticos se mantenham por longos períodos com a permanência do dispositivo além da queda acentuada após sua remoção (Lavy *et al.*, 2006).

De acordo com Nett *et al.* (1976), uma concentração circulante mínima de 2ng/ml é necessária durante a permanência do implante intravaginal de P4 para que não ocorra ovulação durante o período de inserção. Este fato possibilitaria o efeito de feedback negativo da P4 com o eixo hipotalâmico-hipofisário e conseqüente bloqueio da liberação cíclica do LH pela hipófise anterior. Neste sentido, Hanlon e colaboradores (2010), em

éguas na estação de transição de primavera submetidas ao implante intravaginal de progesterona por 10 dias, observaram um pico de progesterona ( $3,3 \pm 0,7$  ng/ml) um dia após a sua utilização enquanto as concentrações plasmáticas de LH e FSH foram observadas em declínio. Em bovinos, novilhas nelores submetidas a ovariectomia foram divididas em três grupos experimentais com dispositivos intravaginais de P4 por oito dias. A concentração plasmática de P4 apresentou um pico em seis horas após a inserção dos dispositivos e foi caindo gradativamente durante a sua presença. Duas horas após suas remoções as concentrações já eram inferiores a 1ng/ml, condição que foi essencial para remover o bloqueio da P4 sobre os pulsos de LH, permitindo seu pico, promovendo maturação final folicular o possibilitando a ovulação (Silveira, 2012).

Assim, os protocolos que usam P4 intravaginal se destacam por sua capacidade de sincronizar e/ou antecipar o estro antes da estação reprodutiva (Hanlon e Firth, 2012), visto que, conforme anteriormente mencionado, a P4 liberada pelo dispositivo suprime a secreção do hormônio luteinizante (LH), cujos níveis tendem a subir rapidamente quando o dispositivo é retirado, estimulando o crescimento folicular e a ovulação (Polo *et al.*, 2016). Neste sentido Hanlon e Firth (2012) demonstraram que o uso de P4 intravaginal acelera a data da primeira cobertura em éguas durante a fase de transição e Handler et al. (2006) reportaram que o hormônio sincroniza o estro, estimula as atividades ovarianas e resulta em resultados favoráveis em qualquer época do ano, exceto durante o período de anestro.

Éguas em anestro têm níveis significativamente mais baixos de GnRH e LH devido à biossíntese reduzida desses hormônios durante esse período, de modo que a P4 derivada do dispositivo intravaginal não seria capaz de, por si só, estimular a produção desses hormônios (Handler *et al.*, 2007; Polo *et al.*, 2016). Portanto, os mecanismos de ação da P4 para acelerar a ovulação envolvem aumento da produção e liberação de GnRH hipotalâmico, aumentando os níveis de LH e FSH hipofisários no período de transição mas não garante ocorrência da ovulação em animais em anestro, mesmo em associação com indutores de ovulação (King, 2011). Isso porque animais em anestro estacional apresentam bloqueio do eixo Hipotalâmico-hipofisário-ovariano, por conta do reduzido conteúdo hipotalâmico de GnRH em épocas de baixa luminosidade (inverno) comparadas

a épocas de maior luminosidade (verão). Desta forma, durante o anestro estacional, os folículos são inferiores a 20mm, as concentrações de estradiol são basais, ausência de CL é verificada e devido a este motivo, as concentrações de P4 não excedem 1ng/ml (King, 2011). Devido principalmente à ausência de LH, os folículos se desenvolvem até um diâmetro máximo de 20mm E, além disso, o FSH permanece sendo encontrado na circulação sistêmica, porém em concentrações reduzidas. A diferença na liberação entre ambos hormônios se dá pela produção e liberação constitutiva de FSH, liberado de vesículas secretórias após sua síntese de forma independente de GnRH hipotalâmico, ao passo que o LH necessita de níveis normais de GnRH para sua síntese e liberação (Morresey, 2011).

A associação do uso de Gonadotrofina coriônica humana (hCG) após a retirada do progestágeno pode ser indicado para indução da ovulação do folículo dominante em animais em período de transição (Evans *et al.*, 1982; Cole, 2010; Polo *et al.*, 2016). O hCG é uma molécula produzida pelas vilosidades coriônicas da placenta humana, sendo considerado um hormônio glicoproteico que se organiza em duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , onde a primeira possui uma sequência de aminoácidos igualmente compartilhados a todos os hormônios glicoproteicos (LH, FSH e TSH) e a segunda responsável pela atividade biológica. Essa função biológica é comum entre os hormônios hCG e LH, que possuem 80% de igualdade entre as subunidades  $\beta$ , gerando uma coincidência de ligação de ambas ao mesmo receptor (Laphorn *et al.*, 1994). Por esse motivo, o hCG é o hormônio mais utilizado na indução das ovulações em éguas, principalmente em períodos de transição estacional. Esse hormônio possui alto peso molecular (46.000 daltons) e meia-vida de 36 horas (Cole, 2012). Porém, o uso de forma contínua e repetida da molécula como indutor de ovulação em éguas implica em reduções na sua eficácia, uma vez que a mesma forma anticorpos anti-hCG e por esta razão, recomenda-se utilizar hCG por apenas dois ciclos estrais em cada estação de monta, devendo ser substituído por outros indutores em estros subsequentes (McCUE *et al.*, 2004).

A aplicação de GnRH, por sua vez, como substituto ao hCG, com o objetivo de liberar LH e induzir a ovulação, não é muito eficaz em éguas em período de transição (Gentry e Thompson, 2002; Polo *et al.*, 2016).

A eficiência dos análogos de GnRH e hCG como indutores de ovulação pode estar relacionada ao período de administração, onde o hCG parece ter melhor função no início da temporada reprodutiva, comparado aos análogos de GnRH. Este fato está relacionado ao local de ação do fármaco, onde o hCG atua diretamente no ovário, enquanto os análogos de GnRH estimulam a hipófise anterior a liberar LH (Squires, 2008).

Gastal et al. (2007), relata que o uso de deslorelina como análogo de GnRH no início da estação de monta resulta em menores taxas de ovulação dentro de 48 horas, uma vez que durante a primeira ovulação da estação de monta as éguas possuem menores concentrações hipofisárias de LH. Assim, tanto no início quanto no final da estação reprodutiva, preconiza-se o uso de hCG devido a sua ação direta nos receptores ovarianos de LH, enquanto o análogo de GnRH estimula a liberação de LH pela hipófise, o qual, em determinadas épocas do ano, pode não estar adequadamente estocado na pituitária. Por outro lado, em trabalho realizado por Gomes et al. (2014), não houve diferença entre as taxas de ovulações obtidas com análogos de GnRH (deslorelina) quando comparado ao hCG no período transicional ou na estação ovulatória. Assim, é possível que localização geográfica e escore de condição corporal dos animais a serem trabalhados também influenciem a capacidade de ação dos hormônios aqui citados.

Hanlon et al. (2010) aplicaram um protocolo de 10 dias com o dispositivo intravaginal de P4 especificamente projetado para éguas e observaram crescimento folicular culminando com ovulação dois dias após a remoção do dispositivo em resposta à aplicação de hCG. Posteriormente, Hanlon et al. (2012), realizaram um novo estudo com dispositivo intravaginal liberador de P4 em éguas em fase de transição. No referido estudo foram selecionadas éguas com folículos de 20 a 25 mm de diâmetro para garantir que os animais estivessem no período de transição e não em fase de anestro. A inserção do dispositivo ocorreu no D0 (dia 0) e a remoção no D10 e, quando as éguas apresentaram folículos de 35mm foi aplicado hCG. Os autores concluíram que esse foi um tratamento eficaz na indução de estro e da ovulação em éguas em transição, além de permitir a entrada mais cedo dessas éguas na estação reprodutiva. Adicionalmente, Polo et al. (2016) usaram dois dispositivos libertadores de P4, sendo o primeiro inserido no D0 e removido no D10 e o segundo inserido no D28 e removido no D40 e observaram que o tratamento

utilizado teve influência na atividade ovariana e otimizou o surgimento de novas ondas foliculares, levando éguas que estavam em anestro para fase de transição e ovulação na próxima onda folicular após o fim do protocolo. Foi ainda interessante observar que, após a retirada do primeiro dispositivo, todas as éguas responderam ao crescimento folicular, mas não ovularam, indicando que este teve apenas um efeito de sensibilizar as éguas para o início da atividade ovariana. Após o uso do segundo implante, entretanto, as éguas demonstraram dinâmica folicular e evolução acentuada nos estágios cíclicos subsequentes, com folículos maiores que 25 mm e ocorrência de ovulação na próxima onda folicular.

A P4 pode ainda ser utilizada em associação à prostaglandina  $F2\alpha$  (PGF $2\alpha$ ). De acordo com Randel et al. (1996) e Dutra (2016), a PGF $2\alpha$  pode aumentar o desenvolvimento folicular por aumentar a sensibilidade da hipófise ao GnRH. Em estudos mais recentes, foi demonstrado que a injeção de P4 em conjunto com a aplicação de PGF $2\alpha$  foram mais eficazes do que a aplicação isolada de cada um desses hormônios para iniciar atividade ovariana e aumentar a proporção de éguas em transição primaveril exibindo ciclicidade estral. Com esta combinação, provavelmente o centro pulsátil hipotalâmico de GnRH foi inibido por um período, possibilitando a hipófise secretar FSH/LH posteriormente ao desbloqueio, permitindo um maior desenvolvimento folicular (Botelho, 2012; Dutra, 2016).

Enfatizando a importância da P4 para induzir e/ou acelerar a ciclicidade de éguas, outros estudos revelaram ainda que a aspiração folicular de folículos com diâmetro  $\geq 25$  - 30mm, via transvaginal, guiada por ultrassom pode gerar uma estrutura luteal capaz de produzir P4 em concentrações plasmáticas compatíveis com um CL fisiológico suficiente para normalizar a atividade endócrina nas éguas e com isso, a antecipação da primeira ovulação da estação reprodutiva. Isso se deve ao fato de que a aspiração do fluido de folículos, promove a luteinização dos mesmos, comprovada por aumento de P4 (Mozzaquatro *et al.*, 2012; Dutra, 2016). Em estudo realizado por Aljarrrah (2004), 81,8% das éguas (9/11), em transição primaveril, apresentaram formação luteal após aspiração de folículos com 30mm. A estrutura luteal oriunda da aspiração folicular, produz concentrações de P4 com níveis capazes de inibirem o centro pulsátil hipotalâmico

de GnRH (Dutra, 2016). Assim sendo, vários estudos utilizam a aspiração folicular em equinos tendo como principal motivação o entendimento do desenvolvimento folicular e a indução da emergência de uma nova onda folicular com elevação dos níveis de FSH sendo causados pela inibição da produção de inibina e do estradiol pelo folículo em dominância (Ginther *et al.*, 2005).

Portanto, levando em consideração todas as possibilidades e vantagens de antecipação da estação reprodutiva, além do crescente interesse de aplicações de diversas biotecnologias reprodutivas em equinos, considera-se o controle da sazonalidade e a terapia hormonal como ferramentas de atual interesse para a maximização dos índices reprodutivos e otimização das técnicas ligadas a reprodução equina (Dutra, 2016).

#### **Referências:**

- ALJARRAH, A.H. *Methods to induce earlier onset of cyclicity in transitional mares*. 2004. 65p. Thesis (Master of Science) - Jordan University of Science and Technology, Jordan
- AURICH, C. Reproductive cycles of horses. *Anim. Reprod. Sci.*, v.124, p. 220–228, 2011.
- BRENDEMUEHL, J.P.; CROSS, D.L. Influence of the dopamine antagonist domperidone on the vernal transition in seasonally anoestrous mares. *J. Reprod. Fertil.*, v.56, p.185-93, 2000.
- BERISHA, B.; SCHAMS D. Ovarian function in ruminants. *Dom. Anim. Reprod.*, v.9, p. 305-317, 2005.
- BESOGNET, B.; HANSEN, B.S.; DAELS, P.F. Induction of reproductive function in anestrus mares using a dopamine antagonist. *Theriogenology*, v.47, p.467-80, 1997.
- BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Superovulation of cows with PMSG: variations in plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG and in number of preovulatory follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, v.15, p. 37-52, 1987.
- BLISS, S.P.; NAVRATIL, A.M.; XIE, J. et al. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front. Neuroendocrinol.*, v. 31, p. 322-340, 2010.
- CANISSO, I.F.; BELTAIRE, K.A.; BEDFORD-GUAUS, S.J. Premature luteal regression in a pregnant mare and subsequent pregnancy maintenance with the use of oral altrenogest. *Equine Vet. J.*, v.45, p. 97-100, 2013.

COLE, L.A. hCG, the wonder of today's science. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v. 10, p. 1-18, 2012.

DA SILVEIRA, E.C.; BORTOLLOTTI, L.A.; MOROTTI, F. et al. Plasmatic level of progesterone and pregnancy rate of Nellore cattle synchronized with a new intravaginal progesterone device (Biocowgest®). *Rev. Acad. Ciênc. Anim.*, v. 10, n. 1, p. 73-79, 2012.

DAELS, P.F.; FATONE, S.; HANSEN, B.S. et al. Dopamine antagonist-induced reproductive function in anoestrous mares: gonadotrophin secretion and the effects of environmental cues. *J. Reprod. Fertil.*, v.56, p.173-83, 2000.

DAVID, F.F. *Fotoperíodo artificial no verão pode evitar anestro estacional na égua?* 2010. 41f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DONADEU, F.X. Early indicators of follicular growth during the anovulatory season in mares. *Anim. Reprod. Sci.* v.94, p.179-181, 2006.

DUTRA, G.A. *Indução da ovulação em éguas durante o período de transição primaveril.* 2016. 42f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Medicina Veterinária – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

EVANS, M.J.; IRVINE, C.H.G. Measurement of equine follicle stimulating hormone and luteinizing hormone: response of anestrus mares to gonadotropin releasing hormone. *Biol. Reprod.*, v.15, p.477-84, 1976.

FARIA, D.R.; GRADELA, A. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.34, n.2, p.114-122. 2010.

FARIAS, M.C.; SOUTO, P.F.M.T.; FILHO, M.L.S. et al. Influência da presença de muco e reutilização de dispositivos de progesterona sobre a taxa de concepção em vacas Nelore. *Scientia Plena*, v. 11, n. 4, p.1-4, 2015.

FEDORKA, C.E.; BALL, B.A.; WALKER, O.F. et al. Alteration of the mare's immune system by the synthetic progestin, altrenogest. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.17, n.3, p. 83-91, 2019.

GARCIA, M.C.; GINTHER, O.J. Plasma luteinizing hormone concentration in mares treated with gonadotropin-releasing hormone and estradiol. *Am. J. Vet. Res.*, v.36, p.1581-4, 1975.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; DONADEU, F.X. et al. Temporal relationships among LH, estradiol, and follicle vascularization preceding the first compared with later ovulations during the year in mares. *Anim. Reprod. Sci.*, v.102, p.314–321, 2007.

GENTRY, L.R.; THOMPSON Jr. D.L.; STILZER, A.M. Responses of seasonally anovulatory mares to daily administration of thyrotropin-releasing hormone and (or) gonadotropin-releasing hormone analogue. *J. Anim. Sci.*, v.80, n.1, p.208-13, 2002.

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

GOMES R.G.; OLIVEIRA, R.L.; SCHUTZER, C.G.C. et al. Effect of deslorelin and/or human chorionic gonadotropin on inducing ovulation in mares during the transition period versus ovulatory season. *J. Equine Vet. Sci.*, v.34, p.1140-1142, 2014.

GOODMAN, R.L.; KARSCH, F.J. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: Differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology*, v.107, p.1286-1290, 1980.

GOTTSCHALL, C.S.; ALMEIDA, M.R.; TOLOTTI, F. et al. Avaliação do desempenho reprodutivo de vacas de corte lactantes submetidas à IATF a partir da aplicação do GnRH, da manifestação estral, da reutilização de dispositivos intravaginais e da condição corporal. *Acta Sci. Vet.*, v.40, p.1012-1022, 2012.

GRIMMETT, J.B.; HANLON, D.W.; DURIS, G.F. et al. A new intravaginal progesterone-releasing device (Cue-Mare™) for controlling the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, v.58, p. 585-587, 2002.

HAISENLEDER, D.J.; DALKIN, A.C.; ORTOLANO, G.A. et al. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology*, v. 128, p.509-517, 1991.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7.Ed. Barueri: Manole, 2004. 513p.

HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. São Paulo:Manole,1995. p. 95-114.

HANDLER, J.; SCHÖNLIEB, S.; HOPPEN, H. et al. Seasonal effects on attempts to synchronize estrus and ovulation by intravaginal application of progesterone-releasing device (PRID™) in mares. *Theriogenology*, v. 65, p. 1145-1158, 2006.

HANLON, D.W.; EVANS, M. J.; FIRTH, E.C. Effects of intravaginal progesterone on follicular dynamics and FSH, LH and progesterone concentrations in transitional mares. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 121, p. 32-34, 2010.

HANLON, D.W.; FIRTH, E.C. The reproductive performance of Thoroughbred mares treated with intravaginal progesterone at the start of the breeding season. *Theriogenology*, v. 77, p. 952-958, 2012.

HARTT, L.S.; CARLING, S.J.; JOYCE, M.M. et al. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction*, v. 130, p. 241-250, 2005.

HAZLERIGG, D.G.; WAGNER, G.C. Seasonal photoperiodism in vertebrates: from coincidence to amplitude. *Trends. Endocrinol. Metab.*, v. 17, p. 83-91, 2006.

HOFMAN, M.A. The brains' calendar: neural mechanisms of seasonal timing. *Biol. Rev.*, v.79, p. 61-77, 2004.

KINDER, J.E.; KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G. et al. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J. Anim. Sci.*, v.74, p.1424–1440. 1996.

KING, S. S. *Equine reproduction*. Oxford: Wiley Blackwell, 2011. p. 1732-1753.

KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G.M.; WEHRMAN, M.E. et al. Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. *Anim. Reprod. Sci.*, v.77, p.187–211. 2003.

LAVY, E.; STEINMAN, A.; SOBACK, S. Oral controlled-release formulation in veterinary medicine. *Crit. Rev. Drug. Carrier Syst.*, v.23, n. 3, p.165–204, 2006.

LUNENFELD, B. Historical perspectives in gonadotrophin therapy. *Hum. Reprod. Update*, v. 10, n. 6, p. 453- 467, 2004.

MACMILLAN, K.L.; WASHBURN, S.P.; HENDERSON, H.V. et al. Effects of varying the progesterone content of CIDR intravaginal devices and multiple CIDR treatments on plasma hormone concentrations and residual hormone content. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.*, v. 50, p. 471-472, 1990.

MARONDE, E.; STEHLE, J.H. The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. *Trends Endocrin. Met.*, v. 18, n. 4, p. 142-149, 2007.

MCCUE, P.M.; HUDSON, J.J.; BRUEMMER, J.E. et al. Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. *AAEP Proceedings*, v. 50, p. 510-513, 2004.

McDOWELL, K.J.; ADAMS, M.H.; ADAM C.Y. et al. Changes in equine endometrial oestrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptor mRNAs during the oestrous cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids. *J. Reprod. Fertil.*, v. 117, p. 135-142, 1999.

MCROBB, L.; HANDELSMAN, D.J.; KAZLAUSKAS, R. et al. Structure–activity relationships of synthetic progestins in a yeast-based in vitro androgen bioassay. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 110, n. 1-2, p. 39-47, 2008.

MEDEIROS, S.F.D.; NORMAN, R.J. Human choriogonadotrophin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. *Hum. Reprod. Update*, v.15, n. 1, p. 69-95, 2009.

MELROSE, P.A.; WALKER, R.F.; DOUGLAS, R.H. Dopamine in the cerebrospinal fluid of prepubertal and adult horses. *Brain Behav. Evol.*, v.35, p.98-106, 1990.

MENON, K.M.J.; MENON, B. Structure, function and regulation of gonadotropin receptors – A perspective. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 356, p. 88-97, 2012.

MORRESEY, P.R. *Equine reproduction*. Oxford: Wiley Blackwell, 2011. p. 1601-1607.

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60, p.245-262, 2000.

NEGRETTI, C.; EDMONDS, J.; KUTZLER, M.A. Effects of Long-Acting Injectable Progesterone Given Two Days after Luteolysis on Estrus Suppression in Mares. *J. Vet. Sci. Anim. Husb.*, v.6, n.4, p. 1-6, 2018.

NEQUIN, L.G.; KING, S.S.; JOHNSON, A.L. et al. Prolactin may play a role in stimulating the equine ovary during the spring transition. *J. Equine Vet. Sci.*, v.13, p.631-35, 1993.

NETT, T.M.; CERMAK, D.; BRADEN, T. et al. Pituitary receptors for GnRH and estradiol, and pituitary content of gonadotropins in beef cows. I. Changes during the estrous cycle. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v.4, p. 123-132, 1987.

NETT, T.M.; PICKETT, B.W.; SEIDEL, G.E. et al. Levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrous cycle and early pregnancy in mares. *Biol. Reprod.*, v.14, p.412-415, 1976.

NEWCOMBE, J. R.; HANDLER, J.; KLUG, E. et al. Treatment of transition phase mares with progesterone intravaginally and with deslorelin or hCG to assist ovulations. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 22, n. 2, p. 57-64, 2002.

PETER, R.E.; YU, K.L. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: Basic and applied aspects. *Rev. Fish Biol. Fish.*, v.7, n.2, p.173–197, 1997.

PICKAR, J.H. Progesterone. *Climacteric*, v.21, n.4, p. 305-305, 2018.

- PIETTE, P. The history of natural progesterone, the never-ending story. *Climacteric*, v.21, n.4, p.308-314, 2018.
- POLASEK, T.C.M.; KOZICKI, L.E.; PEDROSA, V.B. et al. Impact of a progesterone-releasing intravaginal device and inflammatory reaction on ovarian activity in embryo-recipient anestrus mares. *Theriogenology*, v.90, p.175-184, 2017.
- POLO, G.; De LIMA, L.G.F.; KOZICKI, L.E.J. Two administrations of an intravaginal progesterone device on the induction of ovarian cyclicity in anestrus mares. *Pferdeheilkunde*, v. 32, p. 217-222, 2016.
- PRESS, M.F.; UDOVE, J.A.; GREENE, G.L. Progesterone receptor distribution in the human endometrium. Analysis using monoclonal antibodies to the human progesterone receptor. *Am. J. Pathol.*, v.131, p. 112-124, 1988.
- PRIETO, G.B.; VELÁZQUEZ, P.M. Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Rev. Fac. Med. UNAM*, v. 45, n. 6, p. 252-257, 2002.
- RAZ, T.; CARLEY, S.; CARD, C. Comparison of the effects of eFSH and deslorelin treatment regimes on ovarian stimulation and embryo production of donor mares in early vernal transition. *Theriogenology*, v. 71, n. 9, p. 1358-1366, 2009.
- SÁ FILHO, M.F.; CRESPILO, A.M.; SANTOS, J.E.P. et al. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.120, p.23-30, 2010.
- SAMPER, J.C.; JENSEN, S.; SERGEANT, J. et al. Timing of induction of ovulation in mares treated with Ovuplant or Chorulon. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 22, p. 320-323, 2002.
- SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. *Current therapy in equine reproduction*. 1<sup>st</sup> Ed. St. Louis Missouri: Saunders, Elsevier Inc, 2007. 492p.
- SATUÉ, K.; GARDÓN, J.C. A Review of the Estrous Cycle and the Neuroendocrine Mechanisms in the Mare. *J. Steroids. Horm. Sci.*, v.4, n.2, p. 1-8, 2013.
- SCHUTZER, C.G.C.; RESENDE, H.L.; PANTOJA, J.C.F. et al. Utilização de diferentes períodos de fotoestimulação em éguas acíclicas para o controle da sazonalidade reprodutiva. *Vet. e Zootec.*, v.21, p.148-153, 2014.
- SEGABINAZZI, L.G.T.M.; ANDRADE, L.R.P.J.; ALVARENGA, M.A. et al. Use of intravaginal progesterone-releasing device results in similar pregnancy rates and losses to long-acting progesterone to synchronize acyclic embryo recipient mares. *Vet. Sci.*, v.8, p.1-14, 2021.

SILVA, J.F.S.; CNOP, F.P.; SÁNCHEZ, R.J.R. et al. Avaliação da dinâmica útero-ovárica da égua sob o efeito de um implante subcutâneo de microcápsulas de polihidroxibutirato contendo progesterona. *Rev. Port. Cienc. Vet.*, v. 101, p. 559-560, 2006.

SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.12, p.223-245, 1995.

SQUIRES, E.L. Hormonal manipulation of the mare: a review. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 28, p. 627-634, 2008.

STAEMPFLI, S.A.; CLAVIER, S.; THOMPSON, D.L. et al. O. Effect of a single injection of long-acting progesterone on the first ovulation in early and late spring transitional mares. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 31, n.1, p. 744-748, 2011.

TEIXEIRA, A. C. B.; RIVEROS, J.A.N.; PEREIRA, I.C. et al. Comparação descritiva de dosagens séricas de progesterona durante inserção de dispositivo intravaginal em éguas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.75, n.5, p.1009-1025, 2023.

TURZILLO, A.M.; NETT, T. M. Regulation of GnRH receptor gene expression in sheep and cattle. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v. 54, p. 75-86, 1999.

VALENTIM, R. *Concentrações plasmáticas de progesterona e eficiência reprodutiva de diferentes dispositivos de liberação lenta de progesterona usados em inseminação artificial em tempo fixo*. 2004. 91f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

VIGO, F.; LUBIANCA, J.N.; CORLETA, H.E. Progestógenos: farmacologia e uso clínico. *Femina*, v. 39, p. 127-137, 2011.

WATSON, E.D.; AL-ZI'ABI, M.O. Characterization of morphology and angiogenesis in follicles of mare during spring transition and the breeding season. *Reproduction*, v.124, p. 227-34, 2002.

WATSON, E.D.; BAE, S.E.; THOMASSEN, R. et al. Insulin-like growth factors-I and -II and insulin-like growth factor-binding protein-2 in dominant equine follicles during spring transition and the ovulatory season. *Reproduction*, v. 128, p. 321-329, 2004.

WINKLER, V.W.; BRORODKIN, S.; WEBEL, S.K. et al. T. In vitro and in vivo considerations of a novel matrix-controlled bovine progesterone-releasing intravaginal device. *J. Pharm. Sci.*, v. 66, p. 816-818, 1977.

## **2- Relação entre as características do CL com a produção de P4, ambiente uterino e fertilidade na égua**

O diestro ou fase lútea, inicia-se no momento da ovulação com a formação do CL, responsável pela síntese de P4 com duração média de 14 a 15 dias, a qual pode ser mais longa no verão (16 dias) e mais curta na primavera ou no outono (13 dias) (Satué, 2013). A luteinização envolve alterações estruturais e funcionais das células da granulosa do folículo ovulatório, que inicialmente produzem estrógeno (E2) e se transformam em células lúteas que produzem P4 (Satué, 2013). Portanto, o corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina temporária, que se forma no ovário após a ovulação. A formação do CL resulta do crescimento, diferenciação, reorganização e luteinização das células da granulosa remanescentes do folículo ovulatório (Bertan *et al.*, 2006).

Após a ovulação, ruptura da membrana folicular e a expulsão do oócito, a parede do folículo ovulado é colapsada e a cavidade invadida por linfa e sangue provenientes dos capilares presentes em grande quantidade no folículo ovulatório, formando o corpo hemorrágico. O corpo hemorrágico, reorganiza-se para formar o CL sob influência de vários fatores angiogênicos e mitogênicos, como o fator de crescimento dos fibroblastos, fator de crescimento I semelhante à insulina, fator de crescimento semelhante à heparina e fator de crescimento endotelial vascular (Bertan *et al.*, 2006). O CL é então, formado por células lúteas e não lúteas (Aurich, 2011), sendo que, na égua, as células lúteas não são de origem tecal se derivando exclusivamente das células da granulosa do folículo pré-ovulatório (Van Niekerk *et al.*, 1975; Aurich, 2011). As células não lúteas são principalmente os vasos sanguíneos e fibroblastos que invadem a cavidade folicular após a ovulação (Satué, 2013), células musculares lisas, macrófagos e células endoteliais que se originam do endotélio vascular do folículo pós-ovulatório enquanto as organelas, substratos e enzimas contidas nas células luteínicas do CL irão determinar sua capacidade em sintetizar P4 (Bertan *et al.*, 2006).

Cabe ainda destacar que o controle luteal, assim como a secreção de P4, é determinado pelo número e afinidade aos receptores de LH durante o período pós-ovulatório, onde nas éguas, o pico de LH atinge concentrações máximas em média um dia pós-ovulação. Porém, as concentrações de LH observadas no meio da fase luteal são

reduzidas e por este motivo é esperado que qualquer alteração no número de receptores de LH e afinidade do receptor ao mesmo, possa controlar a função luteal (Jacob *et al.*, 2009).

Watson *et al.* (2000), ao utilizar um antagonista de GnRH em éguas no oitavo dia de diestro, testou o papel do LH na manutenção do CL. O uso deste antagonista reduziu a secreção de P4, demonstrando o papel do LH no suporte do CL, além de atraso no crescimento folicular e ovulação. A liberação de alta amplitude de LH está diretamente relacionada a produção de P4 e manutenção do CL. Nesse sentido, a permanência luteal, assim como sua atividade prolongada, gera impactos significativos na fertilidade, onde sua insuficiência seria responsável pela redução na produção de P4 do CL primário e falhas no reconhecimento materno da gestação (Mccue e Mckinnow, 2011). Resultados encontrados por Esmeraldino (2012), demonstram a presença de receptores para LH também em tecidos da cervix, oviduto e útero das éguas, além da maior expressão relatada na fase do diestro, sugerindo seu envolvimento na modulação da contração uterina. Já a função e o destino lúteo são controlados por, além de LH, hormônios esteróides, prostaglandinas, óxido nítrico, fatores angiogênicos e antiangiogênicos e numerosas citocinas (Niswender *et al.*, 2000; Ferreira-Dias *et al.*, 2006; Sieme *et al.*, 2015), que serão mais detalhadamente explicados ao longo desta revisão.

O desenvolvimento lúteo é caracterizado por intensa angiogênese, regulada por fatores angiogênicos, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEFG), produzido por células lúteas (Al-zi'abi *et al.*, 2003; Aurich, 2011), que apresenta fundamental importância na formação e manutenção do CL e garante sua nutrição e troca respiratória, indispensáveis para sua viabilidade. As alterações na vascularização do CL estão presentes durante toda a fase lútea, desde o alargamento microvascular durante as fases de desenvolvimento e manutenção da CL até a sua redução que é evidentemente observada no período próximo à luteólise (Ginther, 2017).

No início da fase lútea, as células produtoras de P4 apresentam atividade mitótica pronunciada (Aguilar *et al.*, 2006; Aurich, 2011) e a produção de P4 se inicia logo após a ovulação. Do dia 0 ao dia 5 pós-ovulação ocorre o primeiro estágio de desenvolvimento luteal, de modo que o CL aumenta de tamanho de forma progressiva acompanhado do

aumento da vascularização, ao passo que no dia 8 pós-ovulação a P4 atinge o pico de produção, seguido por um declínio gradual (Sieme *et al.*, 2015). Embora a função do CL esteja sob controle do LH e da P4, a expressão de receptores de P4 só pode ser detectada em células lúteas grandes, mas não em células lúteas pequenas. Este achado, juntamente com uma inconsistência ou falha na detecção de enzimas esteroidogênicas em células lúteas pequenas, levou a sugerir que, na égua, a síntese de P4 é restrita a células lúteas grandes (Costa *et al.*, 2005; Ferreira-Dias *et al.*, 2007; Aurich, 2011). Isto está em contraste com muitas outras espécies, em que ambos os tipos de células lúteas estão envolvidos na produção da P4. A hipótese suportada é que as células luteínicas pequenas equinas são apenas precursoras de células luteínicas grandes que avançam em tamanho e função durante o desenvolvimento do CL (Van Niekerk *et al.*, 1975; Costa *et al.*, 2005, Aurich, 2011). Assim, as células esteroidogênicas luteais sintetizam e liberam P4 na circulação sistêmica com o objetivo de iniciar um processo de quiescência na contratilidade do miométrio e propiciar o desenvolvimento glandular do endométrio. Essas modificações propiciam um meio ambiente uterino adequado para o desenvolvimento do concepto (Bertan *et al.*, 2006).

Desta forma, as células remanescentes da granulosa do folículo ovulatório, que até então sintetizavam estradiol, são reorganizadas para formarem o CL e sintetizarem P4. Para tal mudança de especialidade, ocorre uma diminuição na expressão da enzima P450 aromatase, que converte a androstenediona em estradiol (Bertan *et al.*, 2006). Tal mudança determina o início da luteinização das células da granulosa. Entretanto, para que a P4 seja sintetizada em grande quantidade, além da diferenciação celular, deverá ocorrer um aumento na expressão das enzimas necessárias para a conversão do colesterol em P4 e das proteínas transportadoras de colesterol para o interior da membrana mitocondrial. Assim, o colesterol transportado para membrana mitocondrial interna interage com a enzima P450<sub>scc</sub> que o cliva, transformando-o em pregnenolona sendo este precursor transportado para o retículo endoplasmático liso e, por ação da enzima b-hidroxiesteróide desidrogenase/ $\Delta^5$ ,  $\Delta^4$  isomerase-3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -HSD) é convertido em P4. Assim, a produção de P4 no CL é caracterizada por um aumento na expressão das enzimas que convertem o colesterol em P4 (P-450<sub>scc</sub> e 3 $\beta$ -HSD) e por um decréscimo na expressão

das enzimas que convertem P4 em estrógeno (P450 17 $\alpha$ -hidroxilase e P450 aromatase) (Bertan *et al.*, 2006).

Durante a fase luteal, portanto, o CL aumenta em tamanho e capacidade de liberar P4 e ao longo do desenvolvimento do CL, as concentrações séricas de P4 estão associadas às concentrações de RNAm das proteínas que participam nas diversas etapas de produção da P4 incluindo fatores de crescimento, StAR, enzimas esteroidogênicas (P450scc e 3 $\beta$ -HSD) e receptores para HDL, LDL, LH, GH, dentre outros, de modo que as concentrações de tais componentes ao longo do ciclo estral definem diferentes padrões na síntese de P4 (Bertan *et al.*, 2006).

A P4, por sua vez, realiza diversas funções no sistema reprodutivo das fêmeas tais como regulação da duração do ciclo estral, relaxamento do miométrio, proliferação de células endometriais e manutenção de condições necessárias no útero para o desenvolvimento do concepto (Bertan *et al.*, 2006). Além disso, a P4 induz alterações comportamentais e da genitália tubular, caracterizadas por perda do edema endometrial e impedimento do comportamento de estro (Satué, 2013). Ball e Daels (1997) informam que, no início da gestação, níveis de P4 acima de 2,0 ng/ml são considerados adequados para manter a prenhez ao passo que a insuficiência de P4 pode levar a distúrbios de desenvolvimento embrionários e, caso o CL não produza P4 suficiente ou seja lisado, as perdas gestacionais são relatadas.

Cabe destacar que a expressão proteica dos PR é observada nos núcleos do epitélio luminal glandular e nas células do estroma do endométrio, de modo que a P4 promove aumento do tônus uterino e relaxamento do miométrio, estimula a secreção histotrófica e a interação concepto-maternal (Maciel, 2018). Ou seja, enquanto na fase folicular o estrógeno induz a proliferação de células no endométrio, durante a fase luteal, elevadas concentrações de P4 coíbem a mitose do tecido endometrial, induzem diferenciação do estroma endometrial, estimulam secreção glandular (em associação com o acúmulo de vacúolos basais no epitélio glandular) e promovem liberação de proteínas pelas células endometriais que irão auxiliar o início do desenvolvimento embrionário (Bertan *et al.*, 2006). O estado de quiescência induzido no miométrio pela P4 resulta do decréscimo na captação de cálcio extracelular requerido para a contração das células do miométrio

(Bertan *et al.*,2006) visto que a P4 causa a “down regulation” na expressão dos genes que regulam os canais dependentes de cálcio, dificultando a entrada deste íon na célula. A P4 também inibe a síntese de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, que quando ativados causam contrações no miométrio e assim é capaz de garantir o relaxamento do miométrio durante a gestação (Bertan *et al.*,2006).

Quando administrada P4 em éguas ovariectomizadas, um espessamento uterino (ou tônus característico do diestro) foi relatado, de modo que, durante o diestro, quando o edema desaparece, a densidade tecidual aumenta, e os cornos uterinos ficam mais tubulares e com maior espessura (Ginther, 1992). Por este motivo, na palpação retal, o colo do útero, corpo e cornos uterinos são firmes, estreitos e tubulares sob ação da progesterona, embora o tônus uterino seja menor do que durante a gestação (Satué, 2013).

Grabowska e Kozdrowski (2022) relataram que o desenvolvimento inadequado do edema endometrial durante o estro pode estar associado à menor produção de P4 aos 14 dias após a ovulação. Em éguas cíclicas, a duração do estro manifestada pelo edema endometrial se correlaciona com fertilidade, onde uma correlação positiva entre a duração do estro e as taxas de prenhez é relatada (Mateu-Sanchez *et al.*, 2016). Além disso, a alteração na relação E2:P4 durante a mudança de fases estro para diestro afeta a expressão gênica e endometrial de forma que possibilite um ambiente uterino adequado para o desenvolvimento embrionário (Gebhardt *et al.*, 2012). Em resumo, no período do estro, o E2 presente estimula a expressão de seus próprios receptores e dos PR no endométrio (Silva *et al.*, 2018) e, durante o diestro, com altas concentrações de P4, ocorre a diminuição dos receptores de E2 (ER) (Hartt *et al.*,2005).

De acordo com Silva e colaboradores (2018), a simulação de um estro longo em receptoras acíclicas, ou seja, quando o tempo de exposição ao E2 é maior, há maior expressão de uterocalina, proteína que fornece lipídeos ao embrião na fase inicial de desenvolvimento. Dessa forma os autores concluíram que após uma longa exposição ao estrógeno, a maior expressão de uterocalina poderia contribuir para um endométrio mais receptivo.

A relação da alta produção de P4 e alta fertilidade também se correlacionam com a tonicidade uterina, presente na fase do diestro, como indicam pesquisas que utilizaram

suplementação de P4 em éguas durante estações anovulatórias e ovulatórias (Bonafos *et al.*, 1994). Da mesma forma, correlação entre redução do tônus uterino e baixas taxas de prenhez em receptoras de embriões foi descrita por Carnevalle *et al.* (2000), sendo também detectado altas taxas de perdas embrionárias das receptoras com baixo tônus uterino. Esses estudos corroboram com Hayes e Ginther (1986) que já haviam indicado a importância de um tônus de máxima intensidade para a fertilidade, o qual está diretamente relacionado a altos níveis de P4 associados a altos níveis de E2. Em contrapartida, a tonicidade reduzida pode sinalizar um ambiente uterino quase incompatível com o crescimento e desenvolvimento embrionário.

Portanto, de forma resumida, os níveis de P4 sérica aumentados na fase do diestro são responsáveis por aumento do tônus uterino, tornando os cornos uterinos arredondados, firmes e de caráter tubular (Samper *et al.*, 2007). A P4 assume ainda a importância de possibilitar interações físicas entre o embrião e o útero, tornando possíveis a mobilidade embrionária, orientação e fixação da vesícula embrionária e, portanto, a realização do reconhecimento materno da gestação, além de ser necessária para adequada secreção uterina durante o período pré-implantacional (Bergfelt e Adams, 2007).

Em estudo realizado por Moreira *et al.* (2007), a avaliação das concentrações plasmáticas de P4 demonstraram que doadoras sadias possuíam P4 sérica na fase do diestro com concentrações superiores a 2ng/ml. O mesmo experimento demonstrou duas éguas consideradas subférteis com baixas concentrações de P4, 0,89 e 0,13 ng/ml respectivamente. Carnevalle *et al.* (2000), verificou fortes correlações entre tônus do útero, a concentração de P4 e a taxa de gestação, onde as concentrações circulantes de P4 no dia cinco pós ovulação, foram maiores ( $10.0 \pm 4.2$  ng/mL) em éguas qualificadas como boas receptoras do que as que não foram assim classificadas ( $6.5 \pm 4.3$ ng/ml).

Em todos os mamíferos, o estabelecimento e manutenção da gestação dependem da presença de P4. Na égua a P4 é considerada um pré-requisito para mobilidade do conceito e fixação na base de um corno uterino. Além disso, a expressão dos receptores de P4 no trofoblasto podem permitir efeitos diretos da P4 no conceito (Rambags *et al.*, 2008). No entanto, a principal função da P4 é a preparação do endométrio para a gestação. Para isso, é necessária uma down-regulation dos receptores da própria P4 no epitélio

endometrial, sendo um pré-requisito para a expressão de proteínas associadas a gestação (Spencer e Bazer, 2002).

Assim, durante o período de reconhecimento materno da gestação em equinos, uma alta produção de genes é regulada por E2, prostaglandinas E2 e P4. Considerando esse fato na égua, é possível que mudanças na abundância de RNA mensageiros estejam diretamente relacionados com a secreção materna de P4 (Klein *et al.*, 2010). A Capsula embrionária, por exemplo, composta por ácido siálico e glicoproteínas tipo mucina (MUC1), têm sua expressão regulada por P4, sendo fundamental na proteção, movimentação e comunicação materno-embrionária (Allen, 2001). De forma semelhante aos ruminantes, um aumento pronunciado de P4 após a ovulação inicial em éguas gestantes contribui para um melhor desenvolvimento do conceito, enquanto a privação de P4 gera mudanças imediatas na secreção de proteínas endometriais (Hayes *et al.*, 2008). Entre outras, uteroferrina, uteroglobina e uterocalina, proteínas expressas no útero por estímulo progesterônico, foram sugeridas como importantes fatores para manutenção da gestação equina (Hoffmann *et al.*, 2009).

As secreções endometriais compõem um fluido denominado “Histótrofo” ou “leite uterino” que são de grande importância na manutenção do conceito no período pré-implantacional. O histótrofo, secretado antes do momento da implantação do conceito e, portanto, do desenvolvimento da placenta, é composto por uma importante proteína presente no útero das éguas, que possui estreita relação com a capsula embrionária, a uterocalina (P19), já anteriormente citada.

A uterocalina facilita o transporte lipídico através da capsula glicoproteica do conceito pré-implantacional (Stewart *et al.*, 2000) estando, portanto, relacionada ao desenvolvimento inicial do conceito. Portanto, dentre suas funções, a uterocalina apresenta ação de transportar pequenos lipídeos através da cápsula, para que seja possível o desenvolvimento do embrião equino, visto que esses lipídeos aqui transportados (ácidos graxos poliinsaturados e retinol) possuem importância biológica (Stewart *et al.*, 1995). Destaca-se ainda que a expressão dessa proteína (P19) se correlaciona positivamente com as concentrações séricas de P4, e se encontra presente em dosagens semelhantes em lavados uterinos de éguas vazias e prenhes no dia 20 pós ovulação (Ellenberger *et al.*,

2008), podendo também ser estimulada através da administração exógena de P4 em éguas em anestro (Hoffman *et al.*, 2009).

Portanto, observa-se que a P4 é responsável em grande parte pela habilidade do endométrio em provider quantidades adequadas dessas secreções que compõem o histotrofo. Estudos que investigaram o total de proteínas na secreção uterina ao longo do ciclo estral demonstraram redução abrupta de seu conteúdo com o declínio da P4, ao passo que, quando os CLs mantêm uma produção estável nos níveis de P4, o conteúdo proteico da secreção uterina permanece em níveis elevados (Zavy *et al.*, 1979). Assim, a secreção de proteínas uterinas parece se comportar de maneira tempo dependente, respondendo rapidamente à exposição do endométrio ao E2 seguido de P4. Aplicações de P4 ou E2+P4 estimularam produtos secretórios no útero, enquanto o E2 isoladamente não foi capaz de causar este mesmo efeito, deixando evidente a dependência endometrial à P4 para estímulo secretório (Zavy *et al.*, 1979). Assim sendo, concentrações reduzidas de P4 podem ser associadas com perdas embrionárias espontâneas (que podem envolver desde luteólise induzida por endometrites ou insuficiência luteal primária) e/ou em falhas do concepto em bloquear a luteólise (Bergfelt *et al.*, 2007).

Conforme citado anteriormente, a fase de mobilidade do concepto é integralmente sustentada por secreções exócrinas das glândulas endometriais que se acumulam no lúmen uterino (conhecida como nutrição histotrófica ou leite uterino). Na égua, o processo de implantação ocorre mais tardiamente do que em outras espécies, sendo as secreções de histotrofos de suma importância (Reilas, 2001). Em éguas mais velhas, a secreção inadequada de histotrofo, relacionada à degeneração do endométrio, é uma provável contribuição para elevar as taxas de perdas embrionárias precoces (Kenney, 1978). Em relação à sua composição, o glicogênio é um dos produtos de secreção endometrial que compõe o histotrofo, sendo de fundamental importância para a manutenção da gestação, presente em várias espécies, incluindo a humana (Dean *et al.*, 2014). O glicogênio presente nas células endometriais sofre variações durante as fases do ciclo estral da égua, variações essas provavelmente causadas por ação da P4 (Hoffmann, 2009), de modo que a P4 é referenciada por afetar a expressão gênica endometrial,

influenciando a composição do histotrofo como parte de seu papel de manutenção inicial da gestação (Mullen *et al.*, 2013).

Em relação a vascularização do CL, este possui relação com a produção de P4, o que foi posteriormente confirmado por estudos que utilizaram a ultrassonografia do tipo Doppler (Bollwein *et al.*, 2002). Brogana *et al.* (2015) demonstraram que a ausência completa de perfusão no CL é um indicativo de que o CL não mais apresenta funcionalidade, portanto, não mais apresenta capacidade de secreção de P4. No entanto, durante a fase pré luteolítica (dias 10–14 após a ovulação), a concentração de P4 circulante em éguas (Bollwein *et al.*, 2002) diminui mais lentamente do que o fluxo sanguíneo lúteo (Ginther *et al.*, 2007). Portanto, o fluxo sanguíneo lúteo está positivamente relacionado com a concentração de P4 circulante na égua, sendo um dado mais confiável sobre a funcionalidade do CL do que a avaliação do seu tamanho (Bollwein *et al.*, 2001, 2002; Ginther *et al.*, 2007). Ishak *et al.* (2017) relatou que quanto maior e bem vascularizado o folículo pré ovulatório, maior e mais vascularizado o CL produzido, sendo este capaz de produzir maior concentração de P4 circulante. Ainda em seu trabalho, Ishak *et al.* (2017), observaram menor fluxo sanguíneo de CL durante o último ciclo estral da estação reprodutiva, caracterizando insuficiência lútea e conseqüentemente menor concentração sérica de P4 neste ciclo reprodutivo. Além disso, no período de transição de outono, a luteólise se iniciou mais precocemente em relação ao ciclo reprodutivo do verão. Os trabalhos acima sugerem, portanto, que os usos de técnicas de US Doppler podem ser eficazes na detecção de falha ou regressão do CL antes que qualquer diminuição na circulação de P4 ou alterações na imagem em modo B ou nos tônus uterino/cervical se tornem aparentes.

Foi sugerido ainda um papel regulador do sistema IGF (fator de crescimento semelhante a insulina) não apenas na função folicular, mas também na função lútea na égua. Muito provavelmente um aumento de IGFBP 2 (proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina no momento da luteólise diminui a biodisponibilidade de IGFs no CL e assim, a luteólise funcional é facilitada pela inibição do efeito protetor dos IGFs à apoptose e de seu efeito estimulador na esteroidogênese (Watson *et al.*, 2005, Aurich, 2011). Entretanto, considerando a presença de um conceito, o impedimento da

luteólise deve ocorrer por consequência do reconhecimento materno da gestação, gerando a persistência do CL ovariano nas éguas.

A migração da vesícula embrionária por toda extensão uterina com o intuito de suspender os fatores que desencadeiam a luteólise deve ser executada de modo repetido e contínuo, de modo que, na ocasião de sua falha e/ou na ausência do conceito, as secreções de PGF $2\alpha$  uterina sinalizam ao CL o início da luteólise (Mcdowell *et al.*, 1988). Por outro lado, como consequência da mobilidade do embrião, a expressão de receptores de ocitocina e a expressão da enzima ciclooxigenase-2 no endométrio são reduzidos, fato este que impossibilita pulsos luteolíticos de PGF $2\alpha$  uterina, impedindo a luteólise (Early *et al.*, 2010). Além disso, o fator inibidor da síntese de prostaglandina (EPSI) é produzido como resultado a sinalização do embrião, auxiliando no bloqueio da lise do CL em complemento à redução dos receptores de ocitocina, impossibilitando a conversão de ácido araquidônico em prostaglandina, de modo que esses dois processos em conjunto são eficientes para impedir o processo de luteólise na primeira fase gestacional nas éguas (Gaivão e Stout, 2007).

Concentrações estrogênicas crescentes foram também identificadas como sendo produzidos antes mesmo do dia 08 pós ovulação em blastocistos equinos. Estes possuem uma função importante correlacionada com o sucesso da implantação e sobrevivência embrionária nas éguas, já que para que seja possível o estabelecimento da prenhez esta é dependente de um estímulo coordenado de desenvolvimento vascular uterino e presença de fatores de crescimento (Flood *et al.*, 1979). A expressão do gene para o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), por exemplo, tem sido demonstrada como sendo induzida por E2 em humanos, sendo dependentes de ambos os receptores estrogênicos (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) (Ramati *et al.*, 2015). A família VEGF e seus receptores estão envolvidos em processos de crescimento dos vasos e na remodelação de uma grande variedade de tecidos, sendo o endométrio parte desta ação. Nas éguas, o rápido desenvolvimento vascular do mesoderma do conceito sugere fortemente que o VEGF pode ser necessário para esta modificação de forma progressiva, sugerindo que os estrógenos poderiam desempenhar um papel neste sentido (Raeside *et al.*, 2004).

Zavy et al. (1979) relataram a produção de E2 pelo concepto equino desempenhando um papel no aumento do fluxo uterino, no equilíbrio hidroeletrolítico através do transporte de moléculas como carboidratos e aminoácidos para o local de placentação, hipertrofia e hiperplasia das glândulas endometriais, além de estimular secreções histotróficas pelo endométrio materno. Acredita-se ainda que a produção de E2 pelo concepto equino esteja envolvida no processo de sinalização para reconhecimento materno da gestação e, portanto, na manutenção do CL inicial da gestação, na implantação embrionária e, atuando conjuntamente com a P4, na hipertrofia do miométrio e aumento do tônus uterino (Wooding *et al.*, 2008). A significativa secreção de E2 pelo embrião equino pode ainda “auto regular” o número de receptores uterino para P4 e, por auxiliar na migração do concepto e na manutenção luteal, auxilia a nutrição do embrião na fase inicial da gestação, até que a placentação assuma esta função (Spencer e Bazer, 2004). Apesar da produção de E2 pelo concepto, as concentrações de E2 no plasma materno permanecem baixas (0.5 ng/ml) nos 35 primeiros dias de gestação (Flood, 1979).

Por fim, cabe ainda salientar a importância da P4 na formação da capsula embrionária e implantação do concepto. A capsula embrionária é composta por ácido siálico e glicoproteínas tipo mucina (MUC1), secretadas pelo trofoblasto, cuja expressão parece ser regulada pela P4 e E2 (Gillies *et al.*, 1999). Assim, a composição e a carga da cápsula são influenciadas por um mecanismo de regulação da sua movimentação e dos efeitos anti-adesivos do útero, prevenindo a implantação prematura do embrião (Arar *et al.*, 2007). Ou seja, a região mais externa da cápsula, por sua carga eletrostática negativa, torna-se aderente, atraindo proteínas e acumulando uma série de componentes das secreções das glândulas endometriais em sua superfície, que servem na nutrição embrionária à medida que o concepto se movimenta pelo interior do útero.

Portanto, conforme detalhado nesse capítulo, a P4 é absolutamente necessária para o sucesso da gestação (Sieme *et al.*, 2015) visto que um adequado ambiente uterino, o qual altera-se marcadamente sobre influência da P4, é essencial para o estabelecimento da prenhez. Dessa forma, adequada comunicação entre embrião e endométrio determinam o sucesso gestacional, permitindo a fundamental manutenção luteal para a viabilidade do concepto (Wilsher *et al.*, 2006).

**Referências:**

ALLEN, W.R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction*, v. 121, n. 4, p. 513–527, 2001.

ALLEN, W.R.; WILSHER, S.; TURNBULL, C. et al. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. Development in utero. *Reproduction*, v.123, p.445-453, 2002.

ARAR, S.; CHAN, K.H.; QUINN, B.A. et al. Desialylation of core type 1 O-glycan in the equine embryonic capsule coincides with immobilization of the conceptus in the uterus. *Carbohydr. Res.*, v.342, n.8, p.1110–1115, 2007.

BALL, B.A.; DAELS, P.F. *Current Therapy in Equine Medicine*. Philadelphia: Saunders, 1997. p.531-534.

BERGFELT, D.R. *Current Therapy in Equine Reproduction*. St. Louis: Saunders, Elsevier Inc, 2007. p. 1-13.

BERTAN, C.M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E.H. et al. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 43, n. 6, p. 824-840, 2006.

BONAFOS, L.D.; CARNEVALE, E.M.; SMITH, C.A.; GINTHER, O.J. Development of uterine tone in nonbred and pregnant mares. *Theriogenology*, v.42, p.1247-1255, 1994.

BROGAN, P.T.; HENNING, H.; STOUT, T.A.E.; RUIJTER-VILLANI, M. Relationship between colour flow Doppler sonographic assessment of corpus luteum activity and progesterone concentrations in mares after embryo transfer. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 166, p. 22-27, 2016.

CARNEVALE, E.M., RAMIREZ, R.J., SQUIRES, E.L. et al. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, v.54, p.965-979, 2000.

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

DEAN, M.; HUNT, J.; MCDOUGALL, L. et al. Uterine glycogen metabolism in mink during estrus, embryonic diapause and pregnancy. *J. Reprod. Dev.*, v.60, n.6, p.438–46, 2014.

EALY, A.D.; EROH, M.L.; SHARP, D.C. Prostaglandin H synthase Type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 117, n. 1–2, p. 99–105, 2010.

ELLENBERGER, C.; WILSHER, S.; ALLEN, W.R. et al. Immunolocalisation of the uterine secretory proteins uterocalin, uteroferrin and uteroglobin in the mare's uterus and placenta throughout pregnancy. *Theriogenology*, v. 70, p. 746-57, 2008.

ESMERALDINO, A.T. *Identificação imunohistoquímica de receptores para hormônio luteinizante, estrogênio e progesterona no trato reprodutivo extragonadal da égua*. 2012. 93f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GAIVÃO, M.M.F.; STOUT, T.A.E. Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare – a Mini Review. *Rev. Lus. Ciência e Med. Vet.*, v. 1, p. 5–9, 2007.

GILLIES, L.; RUDDOCK, W.D.; BETTERIDGE, K. et al. Patterns of MUC1 expression in the equine endometrium and trophoblast during early pregnancy. *Theriogenology*, v. 51, n. 1, p. 225, 1999.

GINTHER, O.J. *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects*. 2.Ed. Wisconsin: Equiservices Publishing, 1992. 642p.

GINTHER, O.J. Systemic and intrafollicular components of follicle selection in mares. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v. 59, p.116–133, 2017.

GRABOWSKA, A.; KOZDROWSKI, R. Relationship between estrus endometrial edema and progesterone production in pregnant mares two weeks after ovulation. *BMC Vet. Res.*, v. 18, p. 1-8, 2022.

HARTT, L.S.; CARLING, S.J.; JOYCE, M.M. et al. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction*, v.130, p.241-250, 2005.

HAYES, K.E.N.; GINTHER, O.J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. *Theriogenology*, v.25, n.4, p.581-590, 1986.

HAYES M.A.; QUINN, B.A.; KEIRSTAEAD, N.D. et al. Proteins associated with the early intrauterine equine conceptus. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 43, p. 232-237, 2008.

HOFFMANN, C.; BAZER, F.W.; KLUG, J. et al. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium: Expression patterns for mares suffering from endometriosis. *Theriogenology*, v. 71, n. 2, p. 264-74, 2009.

- HOFFMANN, C.; BAZER, F.W.; KLUG, J. et al. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium: Reaction patterns in the cycling mare. *Pferdeheilkunde*, v.25, n.3, p.212–218, 2009.
- GEBHARDT, S.; MERKL, M.; HERBACH, N. et al. Exploration of global gene expression changes during the estrous cycle in equine endometrium. *Biol. Reprod.*, v. 87, p.1-13, 2012.
- ISHAK, G.M.; BASHIR, M.O.; GASTAL, M.O.; GASTAL E.L. Pre-ovulatory follicle affects corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in mares. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 187, p. 1-12, 2017.
- JACOB, J.C.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O. et al. Temporal Relationships and Repeatability of Follicle Diameters and Hormone Concentrations within Individuals in Mares. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 44, p. 92–99, 2009.
- KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.172, n.3, p.241–262, 1978.
- KLEIN, C.; SCOGGIN, K.E.; EALY, A.D.; TROEDSSON, M.H.T. Transcriptional profiling of equine endometrium during the time of maternal recognition of pregnancy. *Biol Reprod.*, v. 83, p. 102-113, 2010.
- MATEU-SÁNCHEZ, S.; NEWCOMBE, J.R.; GARCÉS-NARRO, C. CUERVO-ARANGO, J. The period of the follicular phase during which the uterus of mares shows estrus-like echotexture influences the subsequent pregnancy rate. *Theriogenology*, v.86, p.1506-15, 2016.
- MCCUE, P.M., MCKINNON, A, O. *Equine Reproduction: Ovarian Abnormalities*. Oxford: Wiley Blackwell, 2011. p.2803-2819.
- MCDOWELL, K.J., SHARP, D.C., GRUBAUGH, W. et al. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. *Biol. Reprod.*, v.39, n. 2, p. 340–348, 1988.
- MOREIRA, J.F.; FERNANDES F.T.; QUEIROZ, F.J.R. et al. Estudo comparativo de éguas repetidoras ou não de cio através da avaliação histológica do endométrio e das concentrações plasmáticas de progesterona. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 27, p. 506-512, 2007.
- MULLEN, M.P.; BAZER F.W.; WU, G. et al. Effects of systemic progesterone during the early luteal phase on the availabilities of amino acids and glucose in the bovine uterine lumen. *Reprod. Fert. Dev.*, v.26, n.2, p.282-292, 2013.

RAMBAGS, B.P.B.; VAN TOL, H.T.A.; VAN DEN ENG, M.M. et al. Expression of progesterone and oestrogen receptors by early intrauterine equine conceptuses. *Theriogenology*, v. 69, p. 366-375, 2008.

REILAS, T. *Uterine luminal environment of the mare*. 2001. 80f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Veterinary Medicine Faculty, University of Helsinki, Finlandia.

SALES, F.A.B.M.; AZEVEDO, M.V.A.; SOUZA, N.M. et al. Correlations of corpus luteum blood flow with fertility and progesterone in embryo recipient mares. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.53, p. 1-7, 2021.

SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. *Current therapy in equine reproduction*. 1<sup>st</sup> Ed. St. Louis Missouri: Saunders, Elsevier Inc, 2007. 492p.

SATUÉ, K.; GARDÓN, J.C. A Review of the Estrous Cycle and the Neuroendocrine Mechanisms in the Mare. *J. Steroid. Horm. Sci.*, v.4, p. 115- 124, 2013.

SIEME, H.; LÜTTGENAU, J.; SIELHORST, J. et al. Improving the formation and function of the corpus luteum in the mare. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.39, n.1, p.117-120, 2015.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front. Biosci.*, v. 7, p.1879 -1898, 2002.

STEWART, F.; CHARLESTON, B.; CROSSETT, B. et al. A novel uterine protein that associates with the embryonic capsule in equids. *J. Reprod. Fertil.*, v. 105, p. 65–70, 1995.

STEWART, F.; KENNEDY, M.W.; SUIRE, S. A novel uterine lipocalin supporting pregnancy in equids. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 57, p. 1373-1378, 2000.

VANDERWALL, D.K. *Equine Reproduction*. Ames: Blackwell Publishing, 2011, p. 1637-1641.

VAZ, I.S. *Efeito do tempo de tratamento e frequência de administração do estradiol previamente à progesterona sobre a expressão endometrial de uterocalina em éguas acíclicas*. 2018. 21f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

WATSON, E.D.; PEDERSEN, H.G.; THOMSON, S.R.; FRASER, H.M. Control of follicular development and luteal function in the mare: effects of a GnRH antagonist. *Theriogenology*, v. 54, p.599-609, 2000.

WILSHER, S.; KOLLING, M.; ALLEN, W.R. Meclofenamic acid extends donorrecipient asynchrony in equine embryo transfer. *Equine Vet. J.*, v.38, n.5, p.428-432, 2006.

### 3- Modulação do ambiente uterino nas diferentes fases da estação reprodutiva (anestro, transição e fase cíclica)

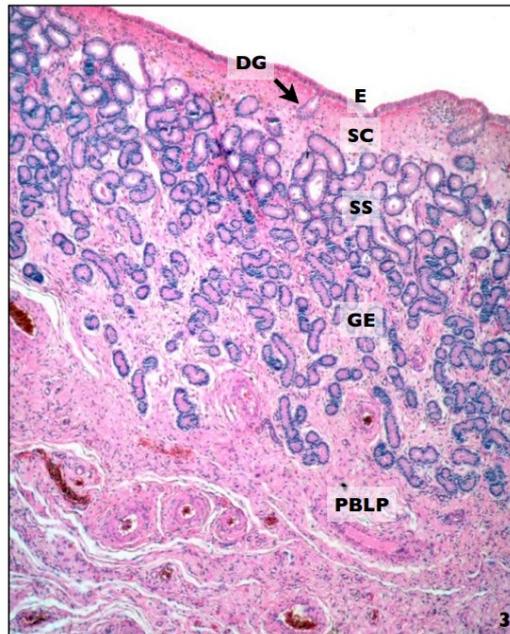
O útero da égua é constituído por três camadas (figura 01): o endométrio, o miométrio e o perimétrio (Thompson *et al.*, 2020). O endométrio é a camada mais interna, que corresponde à camada mucosa e submucosa do útero. Já o miométrio é composto por duas camadas de musculatura lisa, uma interna circular, que está em contato com o conjuntivo da porção basal da lâmina própria e outra externa, longitudinal (Barro e Masuda, 2009). Entre essas duas camadas, há uma camada vascular, rica em vasos sanguíneos que envolve o útero, firmado sobre fina faixa conjuntiva. De forma mais externa encontra-se o perimétrio, uma camada de células mesoteliais (continuação do peritônio visceral) que está próxima ao peritônio (Barro e Masuda, 2009; Kainer, 2011; Thompson *et al.*, 2020).



**Figura 01.** Corte uterino histológico de égua. As setas demonstram o lúmen uterino, endométrio uterino, miométrio uterino e perimetrio uterino. (Thompson *et al.*, 2020).

O endométrio é fundamental no estabelecimento e manutenção da gestação pois tem interação direta com o embrião no início da gestação e, posteriormente, com a placenta. Esse tecido contém glândulas que secretam histotrofo (“leite uterino”), fonte de nutrientes como oxigênio e substratos metabólicos para o conceito (Allen, 2001). É composto por uma camada de epitélio luminal, conteúdo lâmina basal e lâmina própria que se estende da membrana basal do epitélio até a camada circular interna do miométrio (figura 02).

No endométrio da égua, também está presente o epitélio mucociliar organizado em dobras com cristas e canais de drenagem, com células ciliadas ao redor das aberturas das glândulas, facilitando a eliminação do muco pelo movimento dos cílios. O adequado fluxo e viscosidade do muco impede a aderência e colonização de microorganismos, exercendo o importante papel na proteção e limpeza do órgão (Causey, 2007). As células ciliadas apresentam uma superfície arredondada, sendo completamente coberta por cílios, enquanto as células prociliadas são células ciliadas ainda em desenvolvimento (Samuel *et al*, 1979).



**Figura 02.** Corte de endométrio mostrando as suas estruturas. Epitélio luminal (E), *Stratum compactum* (SC), Ductos glandulares (DG), Glândulas endometriais (GE), *Stratum spongiosum* (SS), Porção basal da lâmina própria (PBLP) (Barros e Masuda, 2009).

O epitélio luminal possui em sua composição células cubóides a colunares altas que estão presentes na membrana basal, que variam de altura de acordo com a fase do ciclo estral (Kenney e Ricketts, 1978). A superfície luminal é composta por células colunares com ciliação, células secretórias microvilosas poligonais, aberturas de glândulas uterinas e alguns outros tipos de células secretórias (Samuel *et al.*, 1979; Evans *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2020).

A lâmina própria é dividida em duas porções: *Stratum compactum* (SC) e *Stratum spongiosum* (SS) (Barro e Masuda, 2009; Thompson *et al.*, 2020). A região adjacente ao epitélio luminal do endométrio, *Stratum compactum* (SC), sustenta o epitélio luminal e se caracteriza pela presença de maior densidade de células do estroma e numerosos capilares juntos à membrana basal. Além disso, um número discreto de células mononucleares pode ser encontrado nessa porção (Barro e Masuda, 2009). As células do estroma possuem morfologia estrelada e irregular, com núcleo variando de oval a arredondado,

apresentando um citoplasma de proporções moderadas. Entre essas células, é encontrada uma rede de reticulina, ou matriz extracelular (MEC) de colágeno tipo III (Kenney e Ricketts, 1978). Na porção do *Stratum compactum*, podem ser observados ductos glandulares que se abrem no epitélio luminal, se estendem e bifurcam profundamente no *Stratum spongiosum* não sendo, no entanto, encontradas glândulas nessa porção (Barro e Masuda, 2009). Em outra porção da lâmina própria, o *Stratum spongiosum* (SS), encontram-se as glândulas, em um estroma com menor densidade de células e com uma maior proporção de líquido intersticial (Evans *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2020). Nessa região, a estrutura do tecido lembra uma esponja, com uma malha de delicadas fibras reticulares. Além das glândulas, também são observadas vênulas, capilares, tecido linfáticos, arteríolas e eventualmente pequenas artérias musculares conectados por uma matriz de colágeno (Kenney e Ricketts, 1978). A lâmina própria é caracterizada pela presença de numerosas glândulas, sendo originadas e conectadas ao epitélio luminal por ductos simples e sem ramificações, localizados integralmente no *Stratum compactum*. As demais porções das glândulas estão localizadas no *Stratum spongiosum*, divididas em porções média e basal, consistindo de glândulas tubulares, ramificadas com dez ou mais ramos primários e outros secundários (Kenney e Ricketts, 1978).

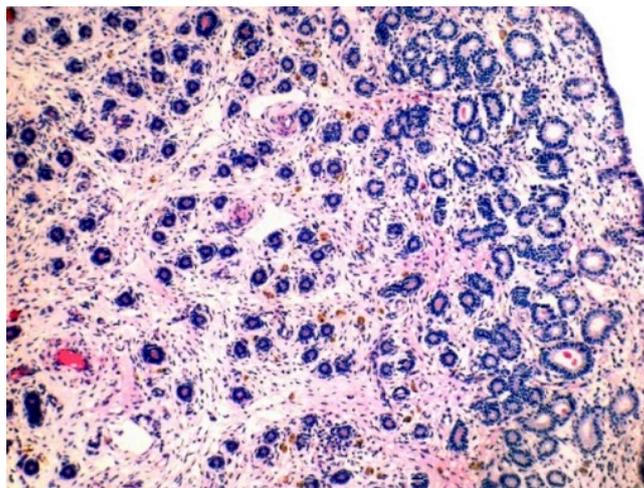
Ao longo das fases do ciclo estral das éguas (anestro, estro e diestro), são observadas diversas alterações no trato reprodutivo, principalmente no endométrio.

Em éguas não gestantes, por exemplo, a população de células ciliadas e não ciliadas se modificam de forma dependente da localização no útero, das fases do ciclo estral e sazonalidade. Na mulher, a população de células ciliadas no endométrio é influenciada pelo E2 (More e Materson, 1976) enquanto na égua a renovação celular e função das células ciliadas no endométrio ainda são alvo de estudos.

Na fase de anestro ou estação anovulatória de inverno, observa-se a ocorrência de uma supressão da atividade reprodutiva durante os meses de inverno. Isso ocorre devido à redução significativa da função ovariana e diminuição na produção dos hormônios estrógeno (E2) e a progesterona (P4). Durante esse período, há um aumento significativo na secreção de melatonina pela glândula pineal e esse aumento contribui para a redução da liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo no sistema

hipotálamo-hipofisário, resultando em supressão da atividade ovariana (Aurich, 2011). Porém, independentemente da estação sazonal, as concentrações plasmáticas médias e o conteúdo hipofisário do hormônio FSH se mantêm relativamente constante ao longo do ano. Já as concentrações plasmáticas médias de LH alcançam um pico máximo durante o verão e são mais baixas em éguas em anestro, onde os pulsos de LH na circulação periférica são praticamente indetectáveis (Alexander e Irvine, 1986). Durante a fase de anestro, observa-se presença de folículos ovarianos menores que 25 mm e ausência de CL nos ovários (Newcombe 1994; Newcombe 2002; Handler *et al.*, 2007). As éguas que possuem folículos menores que 10 mm são caracterizadas como estado de anestro profundo, no qual os ovários estão inativos e o útero apresenta baixo tônus uterino e diminuição do edema endometrial (Handler *et al.*, 2006; Polo *et al.*, 2016).

Assim sendo, durante o anestro, o epitélio luminal encontra-se achatado a cúbico (figura 03), com citoplasma escasso e núcleo hipercromático. As glândulas endometriais estão pequenas e em menor quantidade, geralmente com lúmen estreito. No entanto, algumas glândulas dispersas apresentam lúmen dilatado devido a remanescentes de secreção. As células do estroma possuem forma fusiforme, com citoplasma reduzido e mais eosinofílico, basofílico e núcleo hipercromático. O estroma apresenta-se densamente organizado e sem edema (Barro e Masuda, 2009; Killisch *et al.*, 2017). As glândulas exibem células cúbicas com aumento de basofilia do citoplasma. Na luz das glândulas é observado material eosinofílico. Os ductos glandulares e ramos das glândulas na porção proximal mostram epitélio colunar baixo e diâmetro maior que as glândulas da profundidade. O estroma parece mais condensado (Barros e Masuda, 2009).



**Figura 03.** Corte histológico demonstrando endométrio equino no anestro. Epitélio luminal cúbico. (Barros e Masuda, 2009).

Ainda sob influência do período de anestro, o endométrio apresenta-se atrofiado, em resposta à ausência dos esteróides ovarianos. Nesta fase, a expressão dos receptores para hormônios sexuais demonstra-se variável e assíncrona entre a expressão nas células do estroma e do epitélio glandular (Kenney e Doig, 1986).

Em trabalho realizado por Esmeraldino (2012), amostras de útero foram coletadas de éguas em anestro de inverno apresentando reatividade forte no epitélio luminal, tanto para receptores de estrógeno (RE) quanto para receptores progesterônicos (RP), semelhante aos resultados observados nas éguas cíclicas. No epitélio glandular foi observada reatividade moderada e no miométrio a reatividade foi moderada para os dois receptores, com valores médios semelhantes aos encontrados nas éguas em diestro. No estroma, a reatividade mostrou-se baixa para RE e moderada para RP.

A fase de transição pode ser diferenciada em transição de outono (período anovulatório que antecede anestro profundo) e uma fase de transição de primavera (que ocorre entre o anestro e a recuperação da atividade reprodutiva, cujo início é observado com chegada da primavera/verão). Assim, durante a transição do anestro para a fase cíclica (transição primaveril), o endométrio retoma gradualmente sua atividade devido ao aumento gradual dos níveis hormonais de LH e FSH e, portanto, retomada da atividade

ovariana com o desenvolvimento dos folículos ovarianos e aumento dos hormônios reprodutivos na circulação (Doig e Waelchi, 1993; Aurich, 2011).

O aumento de FSH estimula o crescimento folicular que apresenta ondas menores de crescimento, variando de 6 a 21 mm de diâmetro, e regridem simultaneamente na ausência de um folículo dominante. Nesse período, a ausência de folículos pré-ovulatórios resulta em baixos níveis E2, inibina e outros fatores presentes no fluido folicular, como o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-I). Essa baixa concentração impede a ocorrência do feedback negativo do E2 ao FSH, de modo que seus níveis permanecem elevados, bem como impede a ocorrência do feedback positivo do E2 ao LH. Esses fatores combinados contribuem para o impedimento do processo de ovulação durante a fase de transição em éguas (Satué e Gardón, 2013).

Kenney e Doig (1986) observaram que, assim como nos ovários, o endométrio também apresenta um período de transição, embora o epitélio luminal e os ductos glandulares geralmente iniciam e/ou retomam sua atividade mais precocemente do que as áreas mais profundas das glândulas. Embora a condição seja temporária, ela leva à falha reprodutiva enquanto o endométrio não acompanhar o estágio de maturidade do ovário (Kenney e Doig, 1986). Assim, durante o período de transição, o epitélio luminal apresenta-se cubóide com grande quantidade de citoplasma e as glândulas endometriais apresentam lúmen com presença de secreção e diâmetro aumentado com relação ao anestro. No estroma, as células apresentam formato oval-redondo com núcleos hipocromáticos e coloração mais clara devido à baixa quantidade de hemoglobina em seu interior e com edema leve a intenso (Killisch *et al.*, 2017).

Os folículos dominantes das ondas foliculares anovulatórias, durante a transição primaveril, na presença de menores concentrações de LH circulante, apresentam uma camada da teca pouco desenvolvida, escassa vascularização e deficiência na esteroidogênese no início da via esteroidogênica (Donadeu e Watson, 2007). A retomada da esteroidogênese aumenta gradualmente em folículos anovulatórios sucessivos durante a transição da primavera, e com isso, aumento na liberação de LH, sendo o evento chave que leva à primeira ovulação (Aurich, 2011). Assim, com o aumento das horas de dia/luz, inicia-se o aumento das concentrações de E2 pelo folículo pré-ovulatório, que induz o

pico de LH, levando à primeira ovulação. Encerra-se, portanto o período de transição e inicia-se assim a estação ovulatória considerada como atividade cíclica fértil (Ginther, 2000; Satué e Gardón, 2013).

Durante a fase ovulatória fértil, o ciclo estral da égua possui duração média de 21 a 22 dias (podendo variar de aproximadamente 18 a 24 dias). Ele é dividido em dois períodos principais: o estro, com duração média de 5 a 7 dias, caracterizado por elevada concentração de E2, e o diestro, com duração média de 14 a 15 dias, este caracterizado por alta concentração de P4 (Aurich, 2011). Nas éguas, o início do estro ocorre em torno de 6 a 8 dias antes da ovulação e, nesse período, as concentrações circulantes de E2 começam a aumentar progressivamente até atingir um pico em aproximadamente dois dias anteriores a ovulação. Após a ovulação as concentrações de E2 começam a diminuir, chegando a valores basais (Ginther, 1992), concomitante com o aumento das concentrações de P4, que irá caracterizar o diestro.

Durante o estro ou fase folicular, alguns folículos iniciam o processo de maturação, mas apenas um folículo se torna dominante, atingindo mais de 30mm de diâmetro antes da ovulação, enquanto os folículos que não ovulam entram em atresia e regridem. A ovulação ocorre, na maioria das éguas, dentro de 48 horas anteriores ao final do estro, período em que o trato genital está preparado para aceitar a cópula e transportar espermatozoides para os ovidutos possibilitando a fertilização (Blanchard e Brinsko, 2011). Em contrapartida, o diestro ou fase lútea, se inicia após a ovulação pela formação de um CL e início da produção e secreção de P4. As concentrações plasmáticas iniciam o seu aumento dentro de 24 a 36 horas após a ovulação atingindo valores máximos 6 dias após a ovulação, quando serão observadas concentrações plasmáticas superiores à 2 ng/ml, com valores médios entre 4 e 33 ng/ml. Os níveis elevados de P4 sérica são mantidos até aproximadamente 3 dias anteriores ao início do estro, quando será reduzido até atingir novamente concentrações basais, ou seja, menores que 1 ng/mL (Ginther, 1992; Ginther *et al.*, 2007).

Assim, a fase lútea final culmina com a lise do CL induzida pela PGF2 $\alpha$  de origem endometrial (Satué, 2013). Na égua, ao contrário dos ruminantes, a PGF2 $\alpha$  é secretada na circulação periférica e não existe nenhum sistema de contracorrente local (ou seja, entre

as veias uterinas e as artérias ovarianas). No entanto, acredita-se que o CL equino tenha alta afinidade de ligação a seus receptores e, portanto, maior sensibilidade a esse hormônio do que as demais espécies domésticas. No dia 15 do ciclo, a expressão de COX-2 (e não a de outras enzimas envolvidas na síntese de  $\text{PGF2}\alpha$ ) aumenta acentuadamente nas células epiteliais uterinas de éguas não prenhes, sendo, portanto, a regulação da expressão endometrial de COX-2 considerada um evento chave na indução da luteólise ou no reconhecimento materno da gestação na égua (Boerboom *et al.*, 2004; Aurich, 2011).

Durante o ciclo estral ocorre a produção dos hormônios esteroides que desempenham um papel crucial na regulação da fisiologia reprodutiva das éguas. O E2 e a P4 são responsáveis por promover mudanças significativas no ambiente uterino ao longo das fases do ciclo estral, de acordo com variações na sua concentração e da expressão de seus receptores no endométrio (Thompson *et al.*, 2020). Esses hormônios são transportados para as células-alvo através da corrente sanguínea, onde se ligam a proteínas carreadoras. Devido à sua natureza lipofílica, atravessam a membrana celular por meio de difusão simples e dentro das células-alvo, se ligam aos seus receptores específicos, que em sua maioria estão localizados no núcleo das células (Beato e Klug, 2000). Esses receptores, por sua vez, estão presentes no epitélio luminal, no epitélio glandular e no estroma do endométrio, camada de tecido localizada entre as glândulas endometriais e as células epiteliais do endométrio (Aurich, 2011).

O E2 atua por meio dos receptores alfa ( $\text{ER}\alpha$ ) e beta ( $\text{ER}\beta$ ), expressos por diferentes genes que regulam a expressão gênica (Enmark *et al.*, 1997). O  $\text{ER}\alpha$  é expresso na glândula pituitária, ovários, útero, testículos, epidídimo e glândula adrenal, enquanto o  $\text{ER}\beta$  é comumente encontrado nos ovários e próstata, mas também foi detectado no útero, inclusive em equinos (Kuiper *et al.*, 1997; Matsuzaki *et al.*, 1999; Weihua *et al.*, 2000; Honnens *et al.*, 2011). O  $\text{ER}\alpha$  desempenha um papel importante na resposta uterina aos estrógenos, e o  $\text{ER}\beta$  atua como modulador do  $\text{ER}\alpha$ , apresentando efeito anti-proliferativo no útero (Lubahn *et al.*, 1993).

O E2 age também por uma via não genômica (relacionadas aos efeitos rápidos e de curto prazo mediados pelo E2, como a vasodilatação). Neste caso, as ligações do E2

aos seus receptores citoplasmáticos/membrana controlam a ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que atua estimulando a vasodilatação mediada pelo óxido nítrico (Bjornstrom e Sjoberg, 2005; Pastore *et al.*, 2012).

Além do E2, a P4 exerce suas funções genômicas principalmente por meio de dois tipos de receptores nucleares denominados: isoformas A e B do receptor de P4 (Mote *et al.*, 2006). Apesar de serem codificadas pelo mesmo gene, sua regulação é realizada por promotores distintos. A isoforma A (PR-A) atua mediando a ação da P4 no útero e ovários e apresenta efeito inibitório sobre a expressão de diversos receptores, como receptores de andrógenos, estrógenos e do próprio PR-B (Conneely *et al.*, 2003). Já a isoforma B (PR-B) é mais relevante no desenvolvimento da glândula mamária (Mulac- Jericevic *et al.*, 2003) e difere-se da PR-A por apresentar uma sequência adicional de aminoácidos em sua região N-terminal.

Portanto, a P4, uma vez na corrente sanguínea, é carregada por proteínas transportadoras como a albumina e transcortina, para receptores especializados com localização nas células alvo. As proteínas transportam a P4 até se acercarem da membrana celular externa, onde a P4 se dissocia da proteína e se difunde pela membrana plasmática para se ligar ao receptor. O complexo hormônio-receptor estimula a transcrição de genes responsivos a P4 presentes no DNA, onde o complexo será considerado um fator de transcrição, modulando a síntese de RNAm e proteínas, resultando nas ações hormonais da P4 (Vanderwall, 2011). A partir daí a P4 irá interagir com os receptores de progesterona (constituídos por suas isoformas distintas A e B expressas no útero, conforme anteriormente mencionado).

Durante o período de estro, o E2 estimula a expressão de seus próprios receptores e dos receptores de P4 no endométrio. No diestro, quando a concentração de P4 aumenta, resulta em uma redução dos receptores de E2. Além disso, a exposição contínua do útero à P4 suprime a expressão de seus próprios receptores, especialmente no final do diestro. Com a diminuição dos receptores de P4 nesta fase, a síntese de receptores de E2 é desbloqueada, permitindo o aumento de sua concentração durante um novo estro (Hart *et al.*, 2005). As mudanças na expressão gênica e proteica dos receptores são essenciais

para as modificações e funções do órgão ao longo das diferentes etapas do ciclo estral, bem como para que o ambiente uterino mantenha a gestação (Spencer e Bazer, 2002).

Assim, em resumo, o E2 regula o comportamento sexual, melhora a motilidade uterina, promove a atividade secretora do trato reprodutivo, aumento da perfusão vascular durante o estro, formação do edema endometrial, proliferação e diferenciação celular do endométrio e miométrio (Ginther, 1992; Mellor e Thomas, 1995; Aupperle *et al.*, 2000; Bollwein *et al.*, 2002; Honnens *et al.*, 2011). Por outro lado, a P4 exerce influência na secreção endometrial e é associada à quiescência do miométrio (Thorburn, 1993), aumento do tônus uterino, estímulo da secreção histotrófica, manutenção da prenhez, inibição do hormônio liberador das gonadotrofinas e do comportamento reprodutivo (Ginther, 1992; Vanderwall, 2011). Em outras palavras, o endométrio equino apresenta alterações morfológicas e funcionais controladas pela interação dos esteroides, E2 e P4, fundamental para regular a função endometrial, onde E2 age principalmente na proliferação e P4 na diferenciação celular (Jabbour *et al.*, 2006). Deste modo, durante a fase folicular, com aumento estrogênico, ocorre proliferação de células epiteliais e luminais e aumento da atividade mitótica no tecido glandular, com objetivo de preparar a fêmea para uma potencial gestação. Já na fase lútea, o útero passa por uma fase secretora nas células epiteliais luminais uterinas, com a finalidade de nutrir o embrião (Arai *et al.*, 2013).

Destaca-se ainda que os hormônios esteróides desempenham um papel crucial na regulação das prostaglandinas (PG) no endométrio. Eles modulam a resposta celular do endométrio às interleucinas (IL) e estimulam a produção de PGs pelas células epiteliais e estromais. Deste modo, atuam como sinalizadores e acionam a produção de PG, gerando modulação na resposta celular do endométrio às interleucinas (IL) de modo que tanto o E2 quanto a P4 podem influenciar a resposta endometrial à diferentes interleucinas, como IL-1 e IL-6, respostas estas mediadas pelas células epiteliais e do estroma endometrial (Szóstek *et al.*, 2014). Mais especificamente, a produção de PGF2 $\alpha$  pelas células do estroma aumenta sob influência dos esteroides ovarianos (Szóstek *et al.*, 2014) e, em conjunto, essas interações complexas entre os hormônios esteroides, as interleucinas e as PG desempenham um papel essencial na regulação da atividade endometrial, afetando

sua fisiologia e preparação para diferentes eventos reprodutivos (Szóstek *et al.*, 2014). Como exemplo, as PG apresentam ação local na modulação de processos biológicos do endométrio, como a proliferação celular, angiogênese e implantação embrionária (Szóstek *et al.*, 2014). Portanto, trocas cíclicas do endométrio são governadas pela ação recíproca das diferentes vias que regulam o crescimento e a proliferação celular, onde os esteroides ovarianos tem um papel fundamental.

Em trabalho realizado por Szóstek *et al.* (2014), foi demonstrado que os esteroides ovarianos não somente aumentam a produção endometrial de PG nas células epiteliais e estromais equinas, mas também modulam respostas das células endometriais as IL. O  $17\beta$  estradiol afetou positivamente as IL-1 $\alpha$  e IL-6 estimulando a produção de prostaglandinas E2 (PGE2), sendo um possível mecanismo responsável pela regulação da angiogênese e proliferação no endométrio. A PGE2 atua de maneira auto/parácrina sobre fatores pró-angiogênicos, como secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e na expressão de angiopoietina-1 e 2. Sendo assim, a IL-1 $\alpha$  e IL-6 atuam diretamente na proliferação celular e indiretamente no estímulo a PGs (Tsujii e Dubois, 1995).

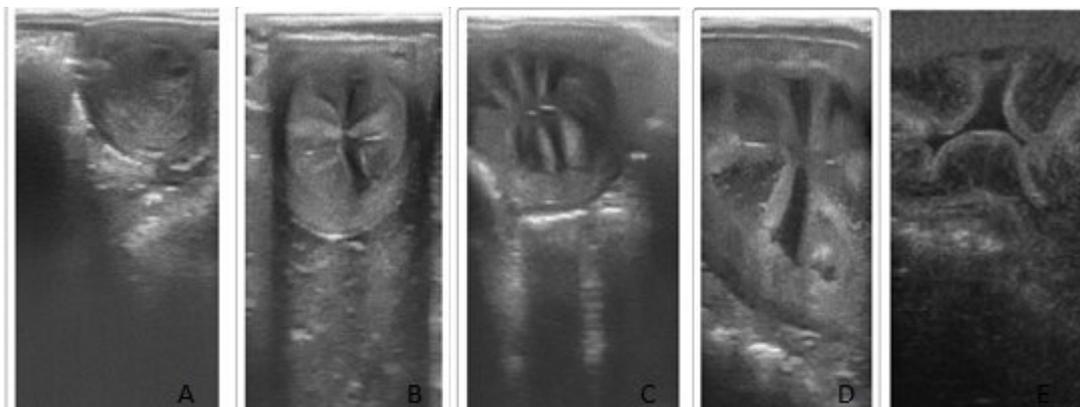
Em equinos, o pré tratamento com E2 combinado a P4 aumentou a produção de PG em resposta ao IL-1 no endométrio, sendo estas mudanças sempre seguidas do aumento de E2 (Szóstek *et al.*, 2014). Os resultados sugerem que o mecanismo responsável pelo aumento de IL-1 através dos esteroides é diferente em células epiteliais e estromais. Nas células epiteliais, este mecanismo está associado a transcrição do mRNA de IL-1 após tratamento com esteroides, sugerindo que estes, aumentam o efeito na produção de PG via regulação positiva na expressão de receptores de IL-1. Porém nas células estromais, um único tratamento com E2 e P4 não afetou a transcrição do mRNA de IL-1, sendo sugerido que possíveis mediadores da ação E2 nas células do estroma são a proteína quinase A (PKA), fator nuclear  $\kappa$ B (NF  $\kappa$ B) e quinases extracelulares, envolvidas no controle da secreção de PGE2 (Szóstek *et al.*, 2014). Esse mecanismo de modulação não parece ser idêntico em todas as espécies, visto que, em humanos, foi demonstrado que o E2 interage com NF  $\kappa$ B modulando sua atividade e estimulando a PKA em neurônios do hipocampo (Dai *et al.*, 2009).

Em relação a fase de ciclicidade da estação reprodutiva ao longo do ciclo estral, variações endometriais podem ser identificadas por meio da avaliação da histopatologia do útero da égua. Essa avaliação pode ser realizada por meio da biópsia endometrial, que permite a avaliação detalhada do estágio reprodutivo (Kenney, 1978; Milan *et al.*, 2020). A avaliação da integridade estrutural do endométrio quanto a infiltrados inflamatórios, fibrose e dilatação das glândulas endometriais e vasos linfáticos torna-se possível, permitindo a observação de variações endometriais ao longo do ciclo estral (Love, 2011; Milan *et al.*, 2020). Além disso, por meio das características ultrassonográficas do útero, características como edema endometrial e diâmetro folicular auxiliam a identificar o período do ciclo estral, além de possíveis patologias reprodutivas (Hayes *et al.*, 1985; Polo *et al.*, 2016).

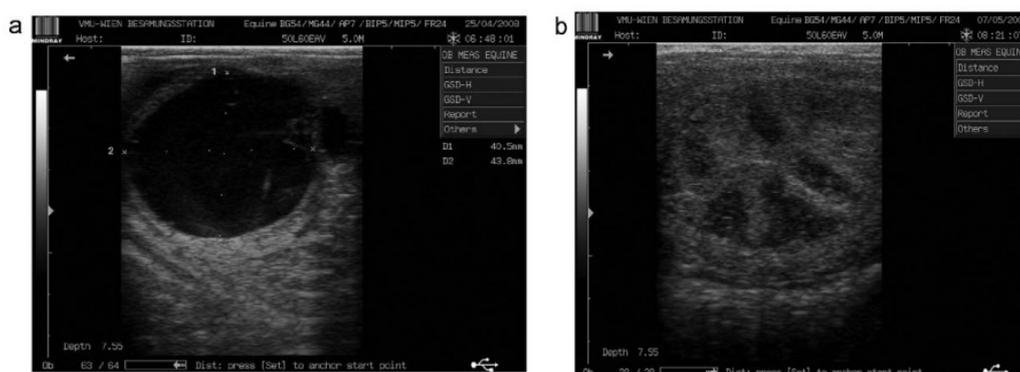
Durante o estro, altas concentrações de E2 associadas a baixas concentrações de P4 contribuem para evidenciar o edema da parede uterina (figura 04), caracterizado por acúmulo de líquido dentro do lúmen uterino (Tunón *et al.*, 1995). O edema endometrial é causado devido ao aumento da perfusão vascular e extravasamento do líquido para o interstício uterino, mediado pela elevação sérica de E2. Este edema auxilia em importantes processos relacionados com a reprodução, como o recebimento do sêmen e transporte espermático até as tubas uterinas. A natureza dos mecanismos secretores permanece em estudo, porém relatos afirmam ser um tipo de secreção apócrina das células ciliadas do epitélio de revestimento da égua no período do estro (Tunon *et al.*, 1995).

Com a abertura do colo do útero nesse período de estro, a entrada de detritos celulares, microrganismos e espermatozoides são relatados (Aurich, 2011). Dessa forma, há o aumento da atividade secretora do endométrio, bem como infiltrações de células invasivas, granulócitos e macrófagos no epitelial luminal que contribuem para a resposta imune uterina (Tunon *et al.*, 1995; Maloney *et al.*, 2019). Os macrófagos carregados de hemosiderina (siderócitos) são frequentemente encontrados na lâmina própria do endométrio, especialmente no *Stratum spongiosum* (SS) e podem estar associadas a um infiltrado inflamatório crônico ou em endométrio sem outras alterações aparentes. Observa-se, também, a presença de neutrófilos nos capilares sub-epiteliais e nas vênulas

da lâmina própria (Kenney, 1978). Devido ao aumento do edema uterino (figura 05), a densidade glandular por unidade de área é menor (Barro e Masuda, 2009).



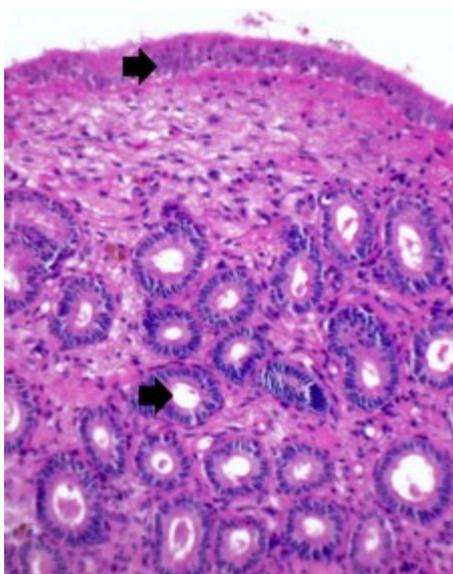
**Figura 04.** Edema endometrial: A: Ausência de edema endometrial; B: Edema leve; C: Edema moderado; D: Forte edema; D: Hiper edema (Samper, 2010; Grabowska e Kozdrowsk, 2022)



**Figura 05.** Ultrassonografia transretal demonstrando folículo pré ovulatório (a) e edema uterino (b) em égua no período do estro (Aurich, 2011).

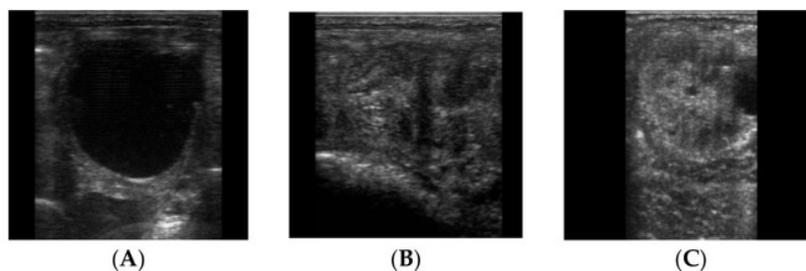
Ainda na fase de estro, o epitélio luminal é colunar de médio a alto variando de simples à pseudoestratificado (figura 06), resultado da atividade mitótica. A altura do epitélio luminal varia de 20 a 30 $\mu$ m podendo alcançar até 50 $\mu$ m na fase inicial (Barro e Masuda, 2009). Apresenta vacúolo citoplasmático na porção basal das células epiteliais

(Mansour *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2020). O epitélio luminal tem predominância de células poligonais com microvilosidades na superfície ao redor das aberturas das glândulas endometriais do tipo apócrina ou merócrina, podendo ser encontradas células ciliadas e pró-ciliadas (Samuel *et al.*, 1979). Nas aberturas glandulares e nas cristas das dobras endometriais, são observadas bolhas apicais de células secretórias, que são liberadas para o lúmen uterino acompanhadas por uma maior atividade secretora em comparação com outras fases do ciclo estral (Aurich, 2011). No início do estro é possível visualizar ainda ninhos glandulares e durante a fase final a altura do epitélio luminal reduz de forma progressiva (Barro e Masuda, 2009). No final do estro, observa-se, em algumas éguas, o retorno do epitélio luminal para uma forma colunar baixa, o que, em certos animais, só ocorre após o término do comportamento de cio (Doig e Waelchli, 2011). Nesta fase do ciclo, as glândulas apresentam uma menor densidade, com ductos glandulares curtos e retilíneos, podendo conter material amorfo (Leishman *et al.*, 1982).



**Figura 06.** Endométrio no início do estro. Epitélio luminal pseudoestratificado (indicado por seta) e discreto edema do estroma (indicado por seta) (Barros e Masuda, 2009).

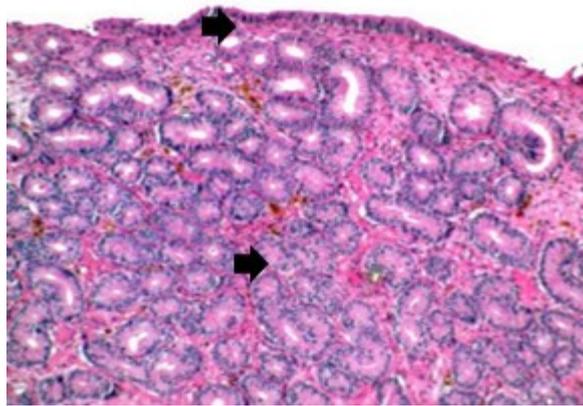
Após o estro, inicia-se o diestro (figura 07) quando ocorre diminuição da vascularização e do edema endometrial, e o número de células endometriais secretoras diminui rapidamente, de modo que apenas algumas estarão presentes durante a fase lútea. A parede uterina apresenta agora leve contratilidade e o colo do útero está firmemente fechado (Aurich, 2011). Em relação ao tônus uterino que se encontrava flácido durante o estro, por ação da P4, observa-se aumento do tônus que diminuirá levemente até o 10º dia do diestro. Caso a égua se torne gestante, este aumentará gradualmente tornando-se túrgido. O aumento gradativo do tônus uterino por ação progesterônica se relaciona à uma gradativa redução do diâmetro do útero, que futuramente auxiliará na fixação da vesícula embrionária em torno do 17º dia após a fertilização (Gastal *et al.*, 2006).



**Figura 07.** Imagem ultrassonográfica de folículo em dominância (A) seguida de edema uterino (B) e posterior ovulação (CL) (C), caracterizando diestro (Quartuccio *et al.*, 2020).

Durante a fase inicial do diestro, ocorre maior proliferação das glândulas endometriais por meio de mitoses (Figura 8). Esse processo ocorre quando os níveis de E2 estão reduzidos e os níveis de P4 estão em seu nível máximo, associado à máxima expressão dos receptores de esteroides nas células epiteliais glandulares (Brunckhorst *et al.*, 1991; Raila *et al.*, 1998; Aupperle *et al.*, 2000; Kalpokas *et al.*, 2010). As glândulas endometriais apresentam uma configuração mais tortuosa e estão densamente distribuídas com acentuada diminuição e progressivo desaparecimento do edema do estroma, sendo menor o número de células secretoras (Barro e Masuda, 2009; Thompson *et al.*, 2020).

Ocorre a hiperplasia glandular, aumento das células do epitélio glandular, o que pode levar ao aumento no comprimento e tortuosidade das glândulas, além do aumento no número de ramos glandulares (Kenney, 1978). As células secretórias diminuem rapidamente em número e as células ciliadas atingem maior densidade entre as células microvilosas na metade do diestro, reduzindo próximo ao final da mesma fase (Samuel *et al.*, 1979; Barro e Masuda, 2009).



**Figura 08.** Endométrio no diestro. Células colunares baixas do epitélio luminal (indicado por seta). Aumento da densidade das glândulas por área e diminuição do edema do estroma (indicado por seta) (Barros e Masuda, 2009).

A renovação celular e função das células ciliadas no endométrio equino são especuladas, mas conhecidamente apresentam movimentos rítmicos independentes de contrações uterinas, sendo correlacionadas aos mecanismos de defesa uterina em um sistema de limpeza mucociliar, assim como o trato respiratório (Causey, 2007). Essas células reduzem consideravelmente no diestro, onde considerando a hipótese de limpeza mecânica, a contínua varredura mucociliar do lúmen uterino nesta fase, favoreceria a eliminação do histotrofo secretado, suprimindo um fator essencial para sobrevivência embrionária, sendo assim essa redução pode estar relacionada a uma forma de manutenção dessa secreção (Winter, 2014). As células epiteliais secretoras, variam entre planas ou protuberantes, preenchendo a maior parte da superfície, algumas delas podem apresentar erosão, possivelmente devido à recente secreção das vesículas (Samuel *et al.*,

1979; Winter *et al.*, 2014). O epitélio luminal apresenta-se colunar, medindo em média 15 a 20µm, podendo chegar a 10µm em alguns casos (Barro e Masuda, 2009) e o citoplasma das células epiteliais apresenta hipercromáticas (Ricketts, 1978).

Por fim, através desta revisão da literatura, observa-se que inúmeras são as modificações que ocorrem na histologia e ambiente uterino durante as diferentes fases do ciclo estral da égua. Reunindo informações e evidências sobre a modulação do ambiente uterino nas diferentes fases da estação reprodutiva da égua, constatou-se que o trato reprodutivo, o ambiente uterino e, principalmente, o endométrio, sofrem diversas mudanças durante as fases do ciclo estral, relacionadas às concentrações séricas de E2 e P4, as quais são regidas pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, que por sua vez é influenciado pela luminosidade e ambiente.

## Referências

- ALEXANDER, S.L.; IRVINE, C.H.G. Effect of graded doses of gonadotrophin-releasing hormone on serum LH concentrations in mares in various reproductive states: comparison with endogenously generated LH pulses. *J. Endocrinol.*, v.110, p.19–26. 1986.
- ALLEN, W.R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction*, v. 121, p.513 - 527, 2001.
- ARAI, M.; YOSHIOKA, S.; TASAKI, Y.; OKUDA, K. Remodeling of bovine endometrium throughout the estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 142, p. 1-9, 2013.
- AUPPERLE, H; OZGEN SSHOON, H.A.; SCOON, D. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equine Vet. J.*, v. 32, p. 228-232, n.3, 2000.
- BARROS, S.S.; MASUDA, E.K. 2009. *Biopsia Endometrial na Égua: diagnóstico e prognóstico*. 1ª ed. Santa Maria: [s.n.], 2009. 312p.
- BEATO, M.; KLUG, J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum. Reprod. Update*, v.6, n.3, p. 225-236, 2000.
- BJORNSTROM, L.; SJOBERG, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Edocrinol.*, v. 19, p. 833–842, 2005.

- BLANCHARD, T.L.; BRINSKO, S.P. *Manual of Equine Reproduction*. 3 Ed. St Louis: Mosby, 2011. 336p.
- BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; KOLBERG, B.; STOLLA, R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, v. 57, p. 2129-2138, 2002.
- BRUNCKHORST, D.; SCHOON, H.A.; BADER, H., SIEME, H. Morphologische, enzym- und immunhistochemische charakteristika des endometrialen zyklus bei der stute. *Fertilität*, v.7, p. 44-51, 1991.
- CAUSEY, R.C. Mucus and the mare: How little we know. *Theriogenology*, v.68, p.386-394, 2007.
- DAI, R.; PHILLIPS, R.A.; KARPUZOGLU, E. et al. Estrogen regulates transcription factors STAT-1 and NF- $\kappa$ B to promote inducible nitric oxide synthase and inflammatory responses. *J. Immunol.*, v. 183, n. 11, p. 6998–7005, 2009.
- DOIG, P.A.; WAELCHI, R.O. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 225-233.
- DONADEU, F.X.; WATSON, E.D. Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horse. *Anim. Reprod. Sci.*, v.100, p. 225–242, 2007.
- ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; GRANDIEN, K. et al. Human estrogen receptor b-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 82, p. 4258-4265, 1997.
- EVANS, T.J.; CONSTANTINESCU, G.M.; GANJAM, V.K. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. St Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 47–67.
- GINTHER, O.J. *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*. 2. ed. Cross Plains WI Equiservices: Madison, 1992. 642p.
- GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60–61, 61–79, 2000.
- GINTHER, O.J. *Ultrasonic imaging and animal reproduction: ColorDoppler ultrasonography*. 1<sup>st</sup>. Ed. Cross Plains Equiservices: Madison, 2007. 258p.
- GRABOWSKA, A.; KOZDROWSK, R. Relationship between estrus endometrial edema and progesterone production in pregnant mares two weeks after ovulation. *BMC Vet. Res.*, v. 18, n.1, p. 1-8, 2022.

HANDLER, J.; SCHÖNLIEB, S.; HOPPEN H.; AURICH C. Influence of reproductive stage at PRIDTM insertion on synchronization of estrus and ovulation in mares. *Anim. Reprod. Sci.*, v.97, p.382-393, 2007.

HANDLER, J.; SCHÖNLIEB, S.; HOPPEN, H.; AURICH, C. Seasonal effects on attempts to synchronize estrus and ovulation by intravaginal application of progesterone-releasing device (PRIDTM) in mares. *Theriogenology*, v. 65, p.1145-1158. 2006.

HARTT, L.S.; CARLING, S.J.; JOYCE, M.M. et al. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction*, v. 130, p. 241–250, 2005.

HONNENS, A.; WEISSER, S.; WELTER, H. et al. Relationships between uterine blood flow, peripheral sex steroids, expression of endometrial estrogen receptors and nitric oxide synthases during the estrous cycle in mares. *J. Reprod. Dev.*, v. 57, n.1, p. 43-48, 2011.

JABBOUR, H.N.; KELLY, R.W.; FRASER, H.M.; CRITCHLEY, H.O. Endocrine regulation of menstruation. *Endocrine reviews*, v. 27, p. 17-46, 2006.

KAINER, R.A. *Equine Reproduction*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. pp. 1582–1597.

KALPOKAS, I.; PERDIGÓN, F.; RIVERO, R. et al. Effect of a povidone-iodine intrauterine infusion on progesterone levels and endometrial steroid receptor expression in mares. *Acta. Vet. Scand.*, v. 16, p. 52:66, 2010.

KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. *Current Therapy in Theriogenology*. Philadelphia: Saunders, 1986. 723-729 p.

KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy with a note on early embryonic death. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v. 17, n. 23, p. 241-262, 1978.

KILLISCH, R.; BÖTTCHER, D.; THEUß, T. et al. Seasonal or pathological findings? Morphofunctional characteristics of the equine endometrium during the autumn and spring transition. *Reprod. Domest. Anim.*, v.52, n.6, p. 1011-1018, 2017.

KUIPER, G.G.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K. et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors a and b. *Endocrinology*, v. 138, p. 863–870, 1997.

LEISHMAN, R.B.; MILLER, P.A.; DOIG, P.A. A quantitative study of the histological morphology of the endometrium of normal and barren mares. *Can. J. Comp. Med.*, v.46, p. 17- 20, 1982.

LEY, W.B. *Reprodução em éguas para veterinários de equinos*. São Paulo: Roca LTDA, 2006; p. 220.

LOVE C.C. *Equine reproduction*. Iowa, USA: Blackwell Publishing Ltd, 2011. p. 1929-39.

LUBAHN, D.B.; MOYER, J.S.; GOLDING, T.S. et al. Alteration of reproduction function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 90, p. 11162-6, 1993.

MALONEY, S.E.; KHAN, F.A.; CHENIER, M. et al. A comparison of the uterine proteome of mares in estrus and diestrus. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 54, n.3, p. 473-479, 2019.

MANSOUR, G.D.; FERREIRA, A.M.R.; FERNANDES, F.T.; HENRY, M. Histomorphometry of epithelial structures of the mare's endometrium. *R. Bras. Ci. Vet.*, v. 11, n (1-2), p. 44-48, 2004.

MATSUZAKI, S.; FUKAYA, T.; SUZUKI, T. et al. Oestrogen receptor alpha and beta mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol. Hum. Reprod.*, v.5, n. 6, p. 559-64, 1999.

MELLOR, S.J.; THOMAS, E.J. Interactions between oestradiol and epidermal growth factor in endometrial stromal proliferation and differentiation. *J. Reprod. Fertil.*, v.104, p. 157-164, 1995.

MILAN, B.; SAMPAIO, B.F.B.; COSTA E SILVA, E.V. et al. The gynecological examination in Pantaneiro mares. *Anim. Reprod.*, v. 17, n.1, p. 1-11, 2020.

MORE, I.A.R.; MATERSON, R.G. The role of oestrogen in the control of ciliated cells of the human endometrium. *J. Reprod. Fert.*, v. 47, p. 19-24, 1976.

MOTE, P.A.; ARNETT-MANSFIELD, R.L.; GAVA, N. et al. Overlapping and distinct expression of progesterone receptors A and B in mouse uterus and mammary gland during the estrous cycle. *Endocrinology*, v. 147, p. 5503-5512, 2006.

MULAC-JERICEVIC, B.; LYDON, J.P.; DEMAYO, F.J.; CONNEELY, O.M. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *PNAS*, v. 100, p. 9744-9749, 2003.

MULAC-JERICEVIC, B.; MULLINAX, R.A.; DEMAYO, F.J. et al. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*, v. 289, p.1751-1754, 2000.

NEWCOMBE, J.R. Field observations on the use of a progesterone-releasing intravaginal device to induce estrus and ovulation in seasonally anestrous mares. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 22, p. 378-382, 2002.

NEWCOMBE, J.R. Identification of the corpus luteum in non pregnant mares at days 13 to 16 using ultrasound. *J. Equine Vet. Sci.*, v.13, p. 655-656, 1994.

OTZEN, H.; SIEME, H.; OLDENHOF, H. et al. Equine endometrial vascular pattern changes during the estrous cycle examined by Narrow Band Imaging hysteroscopy. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 166, p.80-89, 2015.

PASTORE, M.B.; SHEIKH, O.J.; JAYANTH, R.; MAGNESS, R.R. Estrogen receptor- $\alpha$  and estrogen receptor- $\beta$  in the uterine vascular endothelium during 54 pregnancy: functional implications for regulating uterine blood flow. *Semin. Reprod. Med.*, v. 30, p. 46-61, 2012.

POLO, G.; DE LIMA, L.G.F.; KOZICKI, L.E. et al. Two administrations of an intravaginal progesterone device on the induction of ovarian cyclicity in anestrous mares. *Pferdeheilkunde*, v. 32, p. 217-222, 2016.

QUARTUCCIO, M.; CRISTARELLA, S.; MEDICA, P. et al. Endometrial Cytology During the Different Phases of the Estrous Cycle in Jennies: New Evidences. *Animals*, v. 10, n.6, p. 1-15, 2020.

RAILA, G.; AUPPERLE, H.; SCHOON, H.A. et al. Endometriosis in the mare: immunohistological and ultrastructural investigations. *Reprod. Domest. Anim. Suppl.*, n. 5, p.115, 1998.

RICKETTS, S.W. *Histological and histopathological studies on the endometrium of the mare*. 1978. Thesis - London: Royal College of Veterinary Surgeons, London.

SAMPER, J.C. A review of a practitioner's perspective on endometrial edema. *Pferdeheilkunde*, v. 26, p. 14-18, 2010.

SAMPER, J.C. Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and some do not. *Theriogenology*, v.70, p. 445-448, 2008.

SAMUEL, C.A.; RICKETTS, S.W.; ROSSDALE, P.D.; STEVEN, D.H. Scanning electron microscope of the endometrium of the cyclic mare. *J. Reprod. Fertil.*, v. 27, p. 287-292, 1979.

SATUÉ, K.; GARDÓN, J.C. A Review of the Estrous Cycle and the Neuroendocrine Mechanisms in the Mare. *J. Steroids Horm. Sci.*, v.4, n.2, p. 2-8, 2013.

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

SZÓSTEK, A.Z.; GALVÃO, A.M.; HOJO, T. et al. Interleukins affect equine endometrial cell function: modulatory action of ovarian steroids. *Mediators of Inflamm.*, v. 2014, p.1-11, 2014.

THOMPSON, R.E.; PREMANANDAN, C.; PUKAZHENTHI, B.S. et al. A review of in vivo and in vitro studies of the mare endometrium. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 222, p. 1-9, 2020.

THORBURN, G.D. A speculative review of parturition in the mare. *Equine Vet. J. Supp.*, v.14, p.41-49, 1993.

TSUJII, M.; DUBOIS, R.N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, v.83, n.3, p. 493-501, 1995.

TUNÓN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; HAGLUND, A. et al. Ultrastructure of the secretory endometrium during oestrus in young maiden and foaled mares. *Equine Vet. J.*, v. 27, p. 382–88, 1995.

VANDERWALL, D.K. *Equine Reproduction*. Blackwell Publishing Progesterone, 2011. 1637-1641 p.

WEIHUA, Z.; SAJI, S.; MAKINEN, S. Estrogen receptor (ER)  $\beta$ , a modulator of ER $\alpha$  in the uterus. *PNAS*, v.97, n.11, p. 5936-5941, 2000.

WINTER, G.H.Z. *Arquitetura e estrutura endometrial equina entre o 21º e 42º dias de gestação*. 2014. 101f. Tese. (Doutorado em Medicina Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

#### 4- Hipótese

A sincronização do estro com dispositivo intravaginal de progesterona acrescida da administração de eCG previamente a indução da ovulação com hCG pode melhorar a manutenção luteal e as características vasculares e funcionais do corpo lúteo de éguas no período de transição, refletindo em melhorias da expressão de proteínas uterinas relacionadas com a fertilidade.

Mais especificadamente, levanta-se as seguintes hipóteses:

A) O tratamento com eCG em éguas durante o período de transição promove melhora nas características ovulatórias e luteais

B) O tratamento com eCG em éguas durante o período de transição aumenta a expressão de proteínas uterinas relacionadas à fertilidade.

C) O tratamento com eCG em éguas durante o período de transição influencia morfologia das estruturas glandulares do endométrio.

## **5- Objetivos**

### **5.1 Objetivo Geral**

Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da aplicação da gonadotrofina coriônica equina (eCG) associada a um protocolo de sincronização do estro sobre características ovulatórias e sobre a manutenção, funcionalidade e vascularização do corpo lúteo em éguas adultas no período de transição, bem como sobre a morfologia e expressão gênica do endométrio.

### **5.2 Objetivos Específicos**

A) Avaliar os efeitos do implante intravaginal de P4 associado ou não ao eCG durante período de estação de transição sobre a taxa de crescimento folicular e taxa de ovulação;

B) Avaliar os efeitos do implante intravaginal de P4 associado ou não ao eCG durante período de estação de transição sobre o momento da ovulação e tamanho do folículo ovulatório;

C) Avaliar os efeitos do implante intravaginal de P4 associado ou não ao eCG durante período de estação de transição sobre a manutenção, vascularização e funcionalidade do corpo lúteo formado após a ovulação induzida com hCG.

D) Avaliar os efeitos do implante intravaginal de P4 associado ou não ao eCG durante período de estação de transição sobre a morfologia, celularidade e expressão gênica do endométrio no diestro, referente ao corpo lúteo formado após ovulação induzida por hCG.

## **6.0 Artigo 01: Effects of eCG on ovarian structures and uterine tissue in transitional mares submitted to an P4-based protocol of ovulation induction**

### **Abstract**

The objective of this study was to evaluate ovulatory and luteal characteristics, as well as uterine gene expression and endometrial morphology, in transitional mares that received equine chorionic gonadotropin (eCG) as part of a progesterone (P4)-based hCG ovulation induction protocol during late winter. In experiments I (n=23) and II (n=8), a total of 31 crossbred mares had an intravaginal P4 releasing device (2.0g) implanted for ten days. Following P4 device removal, follicular growth was monitored, with mares receiving either 500 IU of eCG (eCG Group) or 2.5 ml of saline solution (Control Group) once a dominant ovarian follicle (DF) had reached 30mm in diameter. In both groups, human chorionic gonadotropin (hCG; 2.000 IU) was administered as soon as an ovulatory follicle (OF)  $\geq$  35mm in diameter, was detected. Ovarian ultrasonography was performed from the beginning of the protocol (D0) until 20 days post-ovulation. From days 3 to 20 post ovulation, ultrasound was performed using color doppler mode. P4 concentrations were assessed via chemiluminescence, and uterine biopsies were performed in order to assess expression of the ESR1, ESR2, PGR, and P19 genes, in addition to histopathological analyses. Intergroup data were compared using T tests with a significance level of  $P < 0.05$ . Follicular growth rates before ( $P=0.554$ ) and after ( $P=0.257$ ) P4 device removal, ovulation rate ( $P=0.193$ ), time to ovulation ( $P=0.998$ ), OF diameter at the time of ovulation ( $P=0.618$ ), corpus luteum (CL) diameter at 10 days ( $P=0.751$ ), 12 days ( $P=0.512$ ), and 14 days ( $P=0.181$ ) after ovulation, and serum P4 levels at those same times ( $P= 0.116$ ,  $P=0.712$ ,  $P=0.895$ , respectively), were similar between the two groups. Luteal perfusion was decreased (D10:  $P=0.025$ ; D11:  $P=0.036$ ; D12:  $P=0.0181$ ; D13:  $P=0.0313$ ) in the eCG group compared to control mares from the tenth to thirteenth day after ovulation. Greater glandular diameter ( $P= 0.0496$ ) and epithelial height ( $P= 0.0373$ ) of endometrium were observed in the eCG group at 10 days after ovulation, but not at 14 days after ovulation ( $P=0.7351$  and  $P=0.8495$ , respectively). Expression of ESR1 ( $P=0.003$ ) and P19 ( $P=0.001$ ) genes were reduced in the eCG group. It was concluded

that the eCG treatment reduced the luteal perfusion and repressed ESR1 and P19 expression in the uterus of transitional mares.

**Keywords:** corpus luteum, equine, fertility, gene expression, uterus.

## 1.0 Introduction

In pregnant mares, Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) is considered a fundamental luteotropic agent during the first half of equine pregnancy (Evans & Irvine, 1975) because it is believed to act as an LH-like hormone, inducing supplementary ovulation and/or luteinization of follicles (Murphy & Martinuk, 1991). Watson et al. (2000), when using a GnRH antagonist in mares on the eighth day of diestrus, demonstrated the role of LH in the maintenance of corpora lutea (CL). As such, the release of LH is directly related to CL support due to the fact that, while under the influence of LH, luteal steroidogenic cells synthesize and release progesterone (P4) into systemic circulation, initiating myometrium quiescence and promoting endometrial glandular development. These modifications provide a suitable uterine environment for the development of the conceptus (Bertan *et al.*, 2006).

During periods of reduced daylight, mares demonstrate lower levels of LH production and subsequent ovulatory failures, leading to anovulatory follicular waves and anestrus (Ginther *et al.*, 2004). The efficacy of intravaginal P4-releasing devices in estrus induction protocols results from the inhibitory effect that this hormone exerts on the hypothalamic-pituitary axis. In the presence of P4-releasing intravaginal P4 releasing device, GnRH/LH secretion is inhibited, and, after device removal, a compensatory increase can be observed in the production and release of GnRH by the hypothalamus, as well as that of LH and FSH by the pituitary. These increases are essential to normal follicular growth and ovulation (Samper *et al.*, 2007).

Considering the physiology of the above-mentioned hormones, our research group previously demonstrated that the application of eCG at the moment of P4 device removal was suggested to increase of some luteal traits during the spring transition period, but the eCG dose (400 UI) and/or time of application (day of P4 device removal) may have been insufficient and/or inadequate to obtain more consistent results related to ovulatory

characteristics and/or luteal maintenance (Teixeira *et al.*, 2020). In this regard, Tsukada *et al.* (2008) observed that mares receiving higher eCG/hCG (2,5 mL; i.m /0,7 mL; i.v) doses presented higher ovulation rates than mares receiving lower eCG/hCG (500 UI de eCG/2.000 UI de hCG) doses, as well as mares receiving only hCG. However, since eCG continues to exert LH-like action for several days after its administration, higher doses of eCG (> 500 UI) should be avoided, as they may provoke the growth of additional follicles after ovulation (Núñez-Olivera *et al.*, 2014) and/or secondary ovulations (Campos *et al.*, 2013). Moreover, a 500 IU eCG dose has not yet been tested in transitional mares subjected to a P4-based hCG ovulation induction protocol.

As such, we hypothesized that 500 IU of eCG, administered once a follicular diameter of 30 mm has been reached in mares synchronized with P4-releasing devices, may prolong the lifespan of the CL and increase the expression of fertility-related genes, as well as endometrial glandular morphology, in transitional mares during the late winter. Hence, the aim of this study was to evaluate ovulatory characteristics, luteal quality, CL lifespan, endometrial glands, and endometrial gene expression in crossbred mares subjected to an estrogen/progesterone-based estrus synchronization protocol, associated either with eCG administration or with a placebo upon detection of a dominant, 30 mm or larger follicle (DF), followed by ovulation induction with hCG, during late winter.

## **2.0 Material and Methods**

Animal handling protocols were approved by the Ethics and Animal Experimentation Committee from Universidade Federal de Minas Gerais (Process # CEUA UFMG 49/2021).

### **2.1. Animals and Location**

The experiment I was performed on an experimental farm located in Esmeraldas (tropical climate), in the state of Minas Gerais, Brazil (latitude 19 450 4600 S, longitude 44 180 4700 W). Females were bred extensively and maintained on the same pasture of

*Cynodon dactylon* with water *ad libitum*. A total of 23 crossbred mares (Control Group: n=11; eCG Group: n=12), between 4 and 8 years of age, were randomly distributed among two treatment groups (control and eCG). The study was performed during the late winter/early spring (August, 2022).

The experiment II was performed on an experimental farm located in Lagoa Santa (tropical climate), in the state of Minas Gerais, Brazil (latitude 19 6291 S, longitude 43 8897 W). Females were raised semi-intensively and were kept on the same pasture of *Cynodon dactylon*. Additionally, they received hay and maintenance feed twice a day with water *ad libitum*. A total of 8 crossbred mares (Control Group: n=4; eCG Group: n=4), between 4 and 8 years of age, were randomly distributed among two treatment groups (control and eCG). The study was performed during the late winter/ early spring (August, 2023).

No sedation of the animals was performed throughout the experimental period in both experiments.

## 2.2. Experiment I

### 2.2.1. Experimental Design

Each animal was subjected to the hormonal protocol once. On day 0 (D0), the first day of the protocol, mares were implanted with intravaginal P4-releasing devices (2.0 g; Reprosync, GlobalGen, São Paulo, Brazil) and administered 0.25mg of prostaglandin F2  $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ; sodium cloprostenol, 1mL intramuscular injection; Syncrogen, GlobalGen, São Paulo, Brazil), as well as an injection of 10mg of estradiol benzoate (EB; 10 mL, i.m.; Syncrogen, GlobalGen, São Paulo, Brazil). It is worth mentioning that PGF2 $\alpha$  on D0 was applied with the aim of causing luteolysis in any CL eventually present. The EB dosage of 10mg was based on the work of Silva *et al.* (2016) with cyclic mares.

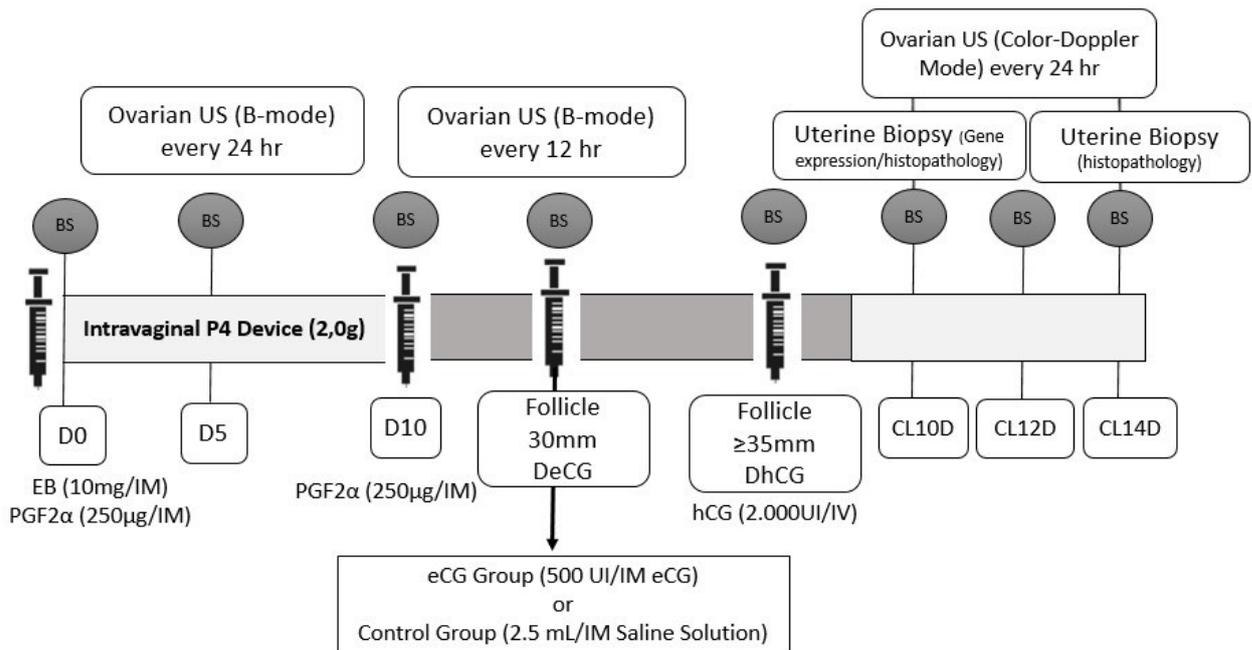
Also on D0, each mare had their body condition score (BCS; 1-5) assessed, as well as a blood sample collected before administration of hormones. The intravaginal P4-releasing device remained in place from D0 to D10 for a total of 10 days. During this stage (D0 to D10), DF diameter was assessed via ultrasonographic evaluations (B-mode, once a

day, always at the same time) performed at 24 hour intervals, in each mare. Additional blood samples were taken, prior to other procedures, on days 5 and 10 (D5 and D10, respectively). Device removal on D10 was paired with an additional PGF2 $\alpha$  dose, identical to the dose administered on D0. The frequency of ultrasonographic (B-mode) evaluations was increased to 12 hour intervals beginning on D11 in order to identify DFs with diameters  $\geq 30$  mm. Upon identification of such a follicle, the mare in question was administered either 500 IU of eCG (2.5 mL; i.m.; Novormon; Zoetis; eCG group) or the same volume of 0.9% saline solution (2.5 mL; i.m.; control group). When the follicle reached a diameter  $\geq 35$  mm, all mares were administered 2,000 IU of hCG (1 mL; i.v.; Vetecor; Hertape, Juatuba, Brazil).

Blood samples were also collected at these two points (administration of eCG or physiological solution [DeCG] and ovulation induction via hCG administration [DhCG]) prior to hormone administration.

After ovulation, CL monitoring was performed daily (once a day, always at the same time) using Doppler ultrasound (color Doppler mode) until structural CL regression was observed.

Additional blood collections were performed at the 10th, 12th, and 14th days post-ovulation (CL10D, CL12D, and CL14D, respectively) as part of the CL monitoring phase, with a uterine biopsy also being performed on CL10D in order to analyze endometrial gene expression. Additionally, at the 10th (CL10D) and 14th (CL14D) days post-ovulation, endometrial biopsies were performed for histopathological evaluation (Figure 1).



**Figure 1.** A schematic representation of the experimental design.

Abbreviations in Figure 1: BS: blood samples collection; CL: corpus luteum; CL10D, CL12D and CL14D: CL assessment at 10, 12 and 14 days after ovulation, respectively; D0, D5, and D10: day 0, 5, and 10 of the hormonal protocol, respectively; DeCG: day of eCG or saline solution administration (dominant follicle with 30mm); DhCG: day of ovulation induction (ovulatory follicle with 35mm); EB: estradiol benzoate; eCG: equine chorionic gonadotropin; hCG: human chorionic gonadotropin; P4: progesterone; PGF2a: prostaglandin F2a; US: ultrasonograph

### 2.2.2. Ultrasonography of follicular development (B mode), ovulation and luteal maintenance (Color Doppler mode)

During the P4 intravaginal device insertion period (D0 to D10), DF diameters were evaluated via ultrasound (Exaped mini; IMV Imaging, França) once per day (at the same time each day). The size and location of the follicles were documented for both ovaries and registered in individual maps for further monitoring. Follicles 7 mm or larger in diameter were measured using ultrasonography, and diameter was calculated as the average of two cross-sectional linear measurements of the follicular antrum (Pierson & Ginther, 1988). The dominant follicle (DF) was defined as that which grew to at least 10

mm and exceeded the diameter of all other follicles. After P4 intravaginal P4 releasing device removal, the ovulatory follicle (OF) was monitored twice per day (always at the same time) until ovulation occurred.

Ovulation was detected (with this time being recorded as the day of ovulation; DOV) through the absence of a previously identified OF and later confirmed by the eventual presence of a CL in the same ovary. When a 35 mm follicle was detected, ovulation was induced via hCG administration, with this time being considered hour 0 (h0). Subsequent ultrasound assessments were performed at 12 hour intervals, considered hour 12 (h12), hour 24 (h24), etc. As such, time of ovulation was defined in 12 hour intervals, with hours counted in reference to the time of hCG injection. When the OF was no longer identifiable, the interval at which ovulation occurred was then calculated (between 12 and 24 hours, 24 and 36 hours, 36 and 48 hours, etc). The mean of the limits of the appropriate interval was used for statistical analysis. For example, for ovulations occurring between 12 and 24 hours, a value of 18 hours was assigned ( $12 + 24 = 36/2 = 18$ ). For ovulations occurring in the interval from 24 to 36 hours, a value of 30 hours was assigned ( $24 + 36 = 60/2 = 30$ ), etc. (Teixeira *et al.*, 2020). The follicular growth rate of each mare was determined by measuring the difference in DF size per 24-hour increment.

After ovulation, CL diameter was measured at the same time each day and in the same ovary that previously contained the OF. CL diameter was calculated as the average of two linear measurements of the cross-sectional surface of the CL (Pierson & Ginther, 1988).

The vascular characteristics of luteal development, maintenance and regression (from the third to the twentieth day post ovulation) were evaluated once a day by Doppler ultrasound (Color Doppler mode; Exaped mini; IMV Imaging, France; gain 70%, PRF 740 Hz, frequency 6.3 MHz, PRC M/2, PRS 3). To determine CL perfusion, subjective analysis of each CL was performed in real time during 60 seconds, using the criterion of proportion (0-100%) of the luteal area with colored signals (Ginther & Utt, 2004).

Structural CL regression was defined in this study as the detection of a reduction in the luteal diameter for two consecutive days and the day of CL regression was defined

as the day when the CL diameter started to reduce at least 10% of the size measured on the previous day (Teixeira *et al.*, 2020).

### 2.2.3. Blood Sample Collection and Hormone Assays

Blood samples were taken from the jugular vein via venipuncture. All samples were collected under non-stressful conditions by the same veterinarian. The blood samples were collected in 10 mL silicone-coated vacutainer tubes and allowed to clot at room temperature for 1 hour. Subsequently, they were centrifuged for 15 minutes at 900xg at 20°C, and the aliquoted serum was stored in polystyrene tubes at -20°C (Teixeira *et al.*, 2020) until analyzed.

The serum samples collected on D0, D5, D10, CL10D, CL12D, and CL14D from each mare were assessed for P4 concentration via chemiluminescence (IMMULITE 2000 XPi immunoassay system; Siemens Healthineers, Erlangen, Germany, USA) as described by Fazio *et al.* (2017), using a sequential competitive immunoassay (IMMULITE 2000 P4). The volume of serum required for each incubation cycle (2 x 30 minutes) was 50 µL. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 6.3% and 7.9%, respectively.

### 2.2.4. Uterine biopsies

After ultrasound examination and blood samples collection, uterine biopsies were performed at the base of the uterine horn, using Jackson equine alligator uterine biopsy forceps (Jorgensen Lab Inc, Loveland, CO, USA). The samples were stored separately in cryogenic tubes (Corning, São Paulo, Brazil) in liquid nitrogen at -196°C until qPCR analysis was performed.

On day CL10D, part of the tissue obtained from the uterine biopsy was used for histopathological evaluation and part was separated to endometrial gene expression

assessment. On CL14D, endometrial biopsy was performed only for histopathological evaluation.

The samples intended to histopathological analysis were fixed in 10% formaldehyde and packed in plastic cassettes for subsequent processing. The samples intended to RT-qPCR assessment were stored separately in cryogenic tubes (Corning, São Paulo, Brazil) in liquid nitrogen at  $-196^{\circ}\text{C}$  until qPCR analysis was performed.

#### 2.2.5. RT-qPCR assessment of ESR1, ESR2, P19 and PGR expression in the uterine tissue.

All qPCR analysis protocols were performed in accordance with the protocol published by Nascimento *et al.* (2023).

Total RNA was isolated from equine endometrial tissue using Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) in accordance with the manufacturer's instructions and RNA purity and concentration were assessed using a NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer and electrophoresis was performed on 1 % agarose gel, after which 1  $\mu\text{g}$  of total RNA was converted to cDNA using a high-capacity cDNA reverse transcription kit, as per the manufacturer's instructions (Bio-Rad). All qPCR reactions were performed using the Rotor-Gene RT-PCR system (Qiagen). Each reaction contained 1x iTaq Universal SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad), 0.4-0.6  $\mu\text{M}$  of each primer, and 1  $\mu\text{l}$  of cDNA (diluted 1:10), with a final volume of 10  $\mu\text{l}$ . Samples were run in triplicate using the following thermal cycle conditions:  $95^{\circ}\text{C}$  for 2 min, followed by 45 cycles of the following three-step reaction:  $94^{\circ}\text{C}$  for 15 sec,  $60-62^{\circ}\text{C}$  for 15 sec, and  $72^{\circ}\text{C}$  for 20 sec; and a final cycle of  $72^{\circ}\text{C}$  for 5 min. The dissociation step was performed at the end of the amplification step in order to allow for the identification of the specific melting temperature of each primer set. Gene expression fold change was calculated using REST 2009 software (Pfaffl 2001; Pfaffl *et al.*, 2002), normalized against the expression of GAPDH. The GAPDH stability was proven by similar Cts between treatments/samples.

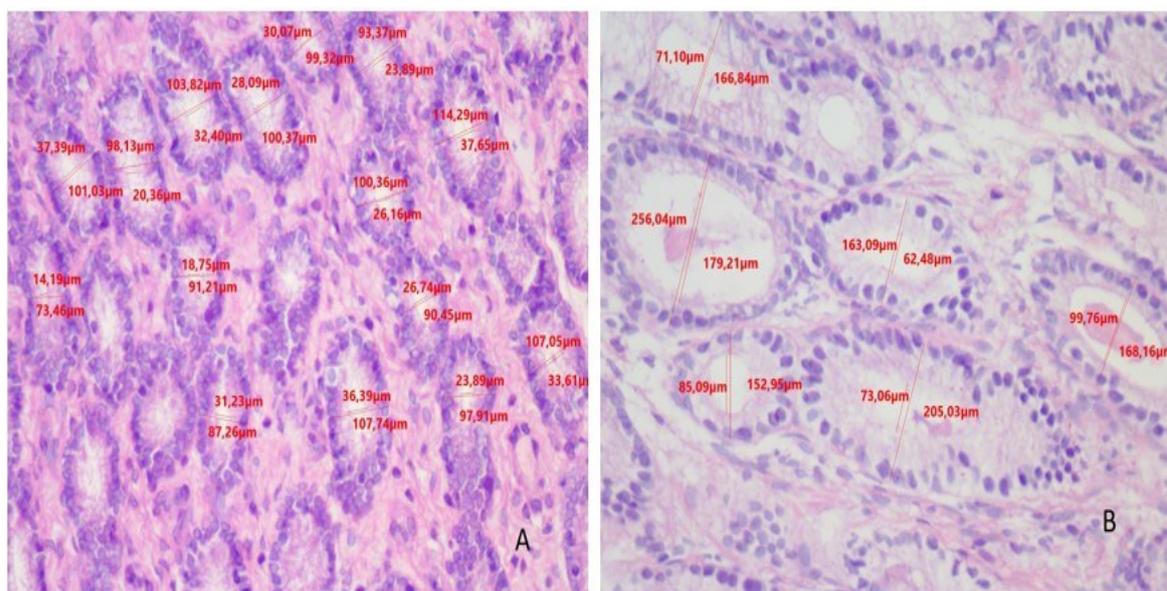
The following primers were used in this study: GAPDH (F: ATGCCTGCTTCACCA CCTT and R: CCAGAACATCATCCCTGCTT), P19 (F: CGGCTCACAAAACGAAAAA and R: GTCACCACCACCGTCTCC), PGR (F: CTTCCCCGACTGCGCTACC and R: TTGTGTGGCTGGAAGTCGCCG), ESR2 (F: TCCTGAATGCTGTGACCGAC and R: GTGCCTGACGTGAGAAAGGA), and ESR1 (F: TCCATGGAGCACCCAGGAAAGC and R: CGGAGCCGAGATGACGTAGCC) (Vaz *et al.*, 2018).

#### 2.2.6. Histopathological evaluation

Samples of uterus were fixed in 10% formaldehyde 48 hours and processed to paraffin-embedding. Briefly, tissue was dehydrated in increasing concentrations of alcohol (70%, 80%, 90% and 100%) and xilol and then embedded in paraffin. For histopathological evaluation 3µm sections were obtained, hydrated in decreasing concentrations of alcohol (100%, 90%, 80%, 70%) and distilled water, stained with hematoxylin and eosin stain and then dehydrated in absolute alcohol and xilol. Cover-slipping slides were prepared with Canada Balsam (Figure 02).

The measurements of glandular diameter and luminal diameter of the glands were evaluated under a light microscope (Nikon E200, Japan; 400X magnification), using the measurement tools of the Microscope Imaging Software (OPTHD 3.7; Opticam, Brazil). A total of 20 glands were evaluated for each mare.

To measure glandular diameter, a sequence of basement membrane – epithelium-lumen-epithelium-basement membrane was measured, totaling the diameter of each gland evaluated. Regarding the diameter of the lumen, it is measured from one apex to another of the epithelium. The epithelial height measurement, that is, the height of the epithelial cell, was calculated through a relationship between: diameter of the gland subtracted by the diameter of the lumen, and the value found divided by two (this division is due to the fact that there is two epithelia at the site where the measurement is performed). The smallest diameter found was considered to standardize measurements.



**Figure 2.** Histological section of the equine endometrium demonstrating the measurements of glandular diameter and glandular lumen on day 10 post ovulation (CL10D) of crossbred transitional mares submitted to estrus synchronization protocol with intravaginal P4 (2.0 g) releasing device and induction of ovulation with hCG, during late winter. Letters in Figure 2: A: Control group, administration of saline solution (2.5 mL i.m.) in mare with a 30mm dominant follicle; B: eCG group, administration of eCG (500 IU i.m.) in mares with a 30mm dominant follicle.

### 2.2.7. Statistical Analysis

Ovarian traits, hormone dosages and histopathological variables were described in terms of their means and standard deviations of absolute and relative frequency. A T-test was conducted to compare continuous quantitative variables between groups. For the categorical variable ‘ovulation’, Fisher's exact test was applied to compare the proportions of ovulation between the groups. In order to compare between groups for the variables DhCG and DOV, whose residuals do not follow a normal distribution, a Mann-Whitney U test was performed. The significance level for the hypothesis tests was set at 5%. All analyses were conducted using R software version 4.3.1 (2023).

The analysis of differential gene expression between the control and eCG groups was carried out using the REST 2009 software, developed by Pfaffl and collaborators (2001, 2002), and the graph was obtained using GraphPad Prism software.

### 2.3. Experiment II.

Exactly the same experimental design as experiment I was carried out. However, uterine biopsies were not performed for histopathological analysis or gene expression analysis. Therefore, items 2.2.2. and 2.2.3, they proceeded exactly the same as experiment I, as previously described.

## 3.0 Results and discussion

### 3.1. Experiment I

In the present study, it was demonstrated that treatment with 500 IU of eCG in transitional mares submitted to a P4-based hCG ovulation induction protocol during late winter does not interfere with ovulatory or luteal characteristics but reduced endometrial expression of fertility-related genes.

eCG is the only gonadotropin with the ability to bind to both FSH and LH receptors. It is known to influence follicular growth, maturation, ovulation, and luteal maintenance (Murphy & Martinuk, 1991), and plays a fundamental luteotropic role during the first half of equine pregnancy (Evans & Irvine, 1975) due to its action as an LH-like hormone, inducing supplementary ovulation and/or follicular luteinization (Murphy & Martinuk, 1991). Additionally, eCG is highly stable and possesses a long half-life (118-123 hours) due to its high number of disulfide bridges (Galet *et al.*, 2004) and carbohydrate side-chains (which are much larger than those of equine LH [Menzer & Schams, 1979; Bousfield *et al.*, 2001]). Thus, its LH-like action continues for several days after its administration (Cole *et al.*, 1967; Tsukada *et al.*, 2008) exhibiting a considerably longer half-life in mare circulation than LH (6 days vs. 1 hour) [Cole *et al.*, 1967; Ginther *et al.*, 1974].

In cattle, when bound to LH receptors in the CL, eCG promotes an increase in large luteal cell activity, greater CL volume, and increased P4 production (Baruselli *et al.*, 2000; Baruselli *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2009). Sá Filho *et al.* (2010), using anestrous cows submitted to estrus synchronization protocols, identified that treatment with eCG promoted larger follicular diameters, higher ovulation rates, and better CL quality. Similarly, Berardinho *et al.* (2021) demonstrated the physiological mechanisms associated with eCG's ability to stimulate follicular growth and steroidogenic enzyme production, which contribute to improved ovulation rates and luteal characteristics in sheep. However, in the present study, no differences were found in follicular growth rates (before or after P4 intravaginal P4 releasing device removal), DF diameter, or ovulation rates between the experimental groups (Table 1).

It is worth mentioning that no differences were observed in the size of the DF on D0 (control:  $1.83 \pm 0.45$  vs. eCG:  $2.10 \pm 0.52$ ,  $P=0.179$ ) and throughout the presence of the P4 device [D2 (control:  $1.81 \pm 0.36$  vs. eCG:  $2.13 \pm 0.29$ ,  $P=0.189$ ); D4 (control:  $1.63 \pm 0.30$  vs. eCG:  $1.85 \pm 0.40$ ,  $P=0.229$ ); D6 (control:  $1.72 \pm 0.42$  vs. eCG:  $1.99 \pm 0.44$ ,  $P=0.191$ ); D8 (control:  $1.88 \pm 0.38$  vs. eCG:  $2.06 \pm 0.55$ ,  $P=0.374$ ); D10 (control:  $2.26 \pm 0.59$  vs. eCG:  $2.38 \pm 0.63$ ,  $P=0.518$ )], indicating that the animals from both experimental groups had similar ovarian status at the beginning of the protocol.

Although time to ovulation also did not differ between the groups (Table 1), these data corroborate findings in previous studies in mares that have reported that mature follicles are typically identified between 4 and 6 days after removal of the P4 device (Newcombe *et al.*, 2002) and that the average time to ovulation after hCG induction ranges from 24 to 48 hours (Fischer *et al.*, 1993; Samper *et al.*, 2002; Mccue, 2003 ; Teixeira *et al.*, 2020). These results are also in accordance with the findings of Bergfelt *et al.* (2007), who identified an ovulation interval of 11 to 17 days from the beginning of synchronization protocols in cyclic mares.

The size of DFs is often positively correlated with to estrogen (E2) concentrations and CL size (Leonardi *et al.*, 2012; Segawa *et al.*, 2015). Moreover, luteal volume is often associated with P4 production in ruminants (Bartlewski *et al.*, 1999; Gonella-Diaza *et al.*, 2013; Mohktari *et al.*, 2016). Thus, considering the physiological aspects of eCG, it is

reasonable to hypothesize that animals receiving eCG would present larger DFs, larger CLs, and/or higher serum concentrations of P4. However, the eCG groups did not differ from the control group in CL diameter or P4 concentrations on days 10, 12 and 14 of their luteal phases (Table 1). Still, in table 1, the P4 concentrations observed during the presence of the intravaginal device (D0, D5 and D10) confirms the similar ovarian status between animals in both groups and indicates that no mare ovulated in the presence of the P4 device. It also demonstrates that both experimental groups maintained similar concentrations of P4 from D0 to DhCG.

**Table 1.** Follicular dynamics, ovulatory characteristics, CL diameters, serum P4 concentrations, and structural CL regression (mean  $\pm$  SD) of crossbred transitional mares submitted to estrus synchronization protocol with intravaginal P4 (2.0 g) releasing device and induction of ovulation with hCG, during late winter.

Treatment Group	Control	eCG	P value
BCS (1-5)	2.79 $\pm$ 0.19	2.69 $\pm$ 0.18	0.832
Ovulation Rate (%)	37% (6/11)	62% (10/12)	0.193
Growth rate of DF with P4 (cm/day)	0.12 $\pm$ 0.08	0.14 $\pm$ 0.09	0.554
Growth rate of DF without P4 (cm/day)	0.30 $\pm$ 0.08	0.35 $\pm$ 0.06	0.257
Interval from hCG to ovulation (hours)	38.00 $\pm$ 6.93	34.00 $\pm$ 6.57	0.998
Interval from P4 removal to ovulation (days)	5.83 $\pm$ 1.15	6.10 $\pm$ 2.61	0.977
Size of DF on DhCG (cm)	3.55 $\pm$ 0.03	3.55 $\pm$ 0.06	0.113
Size of DF on DOV (cm)	3.36 $\pm$ 0.04	3.40 $\pm$ 0.40	0.618
Size of CL10D (cm)	2.50 $\pm$ 0.14	2.44 $\pm$ 0.11	0.751
Size of CL12D (cm)	2.11 $\pm$ 0.14	2.23 $\pm$ 0.11	0.512
Size of CL14D (cm)	1.68 $\pm$ 0.14	1.93 $\pm$ 0.11	0.181
P4 at D0 (ng/ml)	0.32 $\pm$ 0.16	0.31 $\pm$ 0.18	0.962
P4 at D5 (ng/ml)	2.45 $\pm$ 0.99	2.10 $\pm$ 1.09	0.180
P4 at D10 (ng/ml)	2.07 $\pm$ 0.98	1.78 $\pm$ 0.53	0.727
P4 at DeCG	0.23 $\pm$ 0.10	0.23 $\pm$ 0.17	0.623
P4 at DhCG	0.14 $\pm$ 0.12	0.17 $\pm$ 0.11	0.821
P4 of CL10D (ng/ml)	3.09 $\pm$ 0.61	4.45 $\pm$ 0.52	0.116
P4 of CL12D (ng/ml)	1.52 $\pm$ 0.66	1.17 $\pm$ 0.66	0.712
P4 of CL14D (ng/ml)	0.35 $\pm$ 0.61	0.46 $\pm$ 0.52	0.895
Day of structural CL regression (days)	13.20 $\pm$ 1.00	12.90 $\pm$ 1.89	0.454

Control group: administration of saline solution (2.5 mL i.m.) in mares with a 30mm DF; eCG group: administration of eCG (500 IU i.m.) in mares with a 30mm DF; growth rate of DF with P4: follicular growth rate during P4 device insertion (D0 to D10); growth rate of DF without P4: follicular growth rate after P4 device removal (D11 to ovulation); interval from hCG to ovulation: average period in

hours (in a 12-hour interval) from the application of hCG (follicle  $\geq 35$  mm) until ovulation; interval from P4 removal to ovulation: day on which ovulation was detected after P4 device removal.

Abbreviations in Table 1: BCS: body condition score of the mares; D0: Serum P4 concentration before P4 device insertion; D5: serum P4 concentration at day 5 of the protocol; D10: serum P4 concentration at day 10 of the protocol; DeCG: day of treatment with eCG (eCG group) or saline solution (control group) (i.e. serum P4 concentration at the day of eCG or saline administration; DF=30mm); DhCG: day of treatment with hCG (i.e. serum P4 concentration at the day of ovulation induction; DF=35mm); CL: corpus luteum; CL10D, CL12D and CL14D: CL by days 10, 12 and 14, respectively after ovulation; DF: dominant follicle; DhCG: day of treatment with hCG (ovulatory follicle reaching 35 mm); DOV: day of ovulation detection; eCG: equine chorionic gonadotropin; hCG: human chorionic gonadotropin; P4 progesterone; SD: standard deviation.

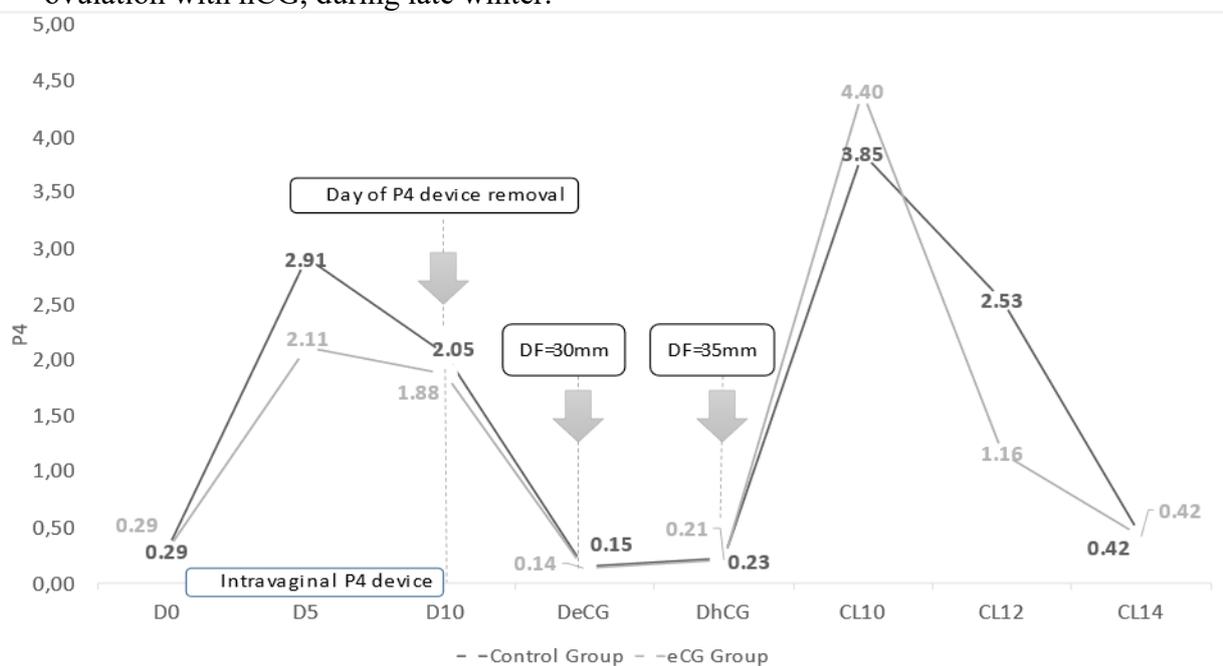
The binding affinity of eCG to LH receptors of theca interna cells in mares is approximately 10% of that observed in other species (Yoon, 2012). Hence, the lack of effect of eCG on ovulatory and luteal characteristics in the present study may be related to the species-specific sensitivity of the receptors present in the ovulatory follicle of the experimental mares at the time of eCG administration, the dose of eCG utilized, and/or the number of animals used in the study. Moreover, these results corroborate a previous study of our group (Teixeira *et al.*, 2020) in which similar ovulatory characteristics and CL lifespans during the spring transition period were observed between mares receiving 400 IU of eCG and a control group.

The equine CL is functional for a period of 14-15 days in nonpregnant mares (Douglas & Ginther, 1975; Daels & Hughes, 1993) which can be longer in summer (16 days) and shorter (13 days) in autumn/winter (Satué & Gardón, 2013). Luteal regression, triggered by uterine PGF $2\alpha$  secretion, results from a progressive vascular degradation that occurs between days 13 and 16 of the estrous cycle (Ginther, 1992). Degenerative changes in the equine CL have their onset by day 10, with apoptotic cells observed by day 14 of the cycle (Al-Zi'abi *et al.*, 2002). According to previous reports, CLs initiate functional regression between days 10 and 12 post-ovulation, and, at approximately day 15 post-ovulation, pyknotic nuclei and progressively lower perfusion levels can be observed (Ferreira-Dias *et al.*, 2006; Ginther *et al.*, 2008). Although no difference was observed between the groups with regard to CL regression or P4 levels in the present study, Figure 3 demonstrates a noteworthy observation of hormonal dynamics of the luteal phase, in which hormonal production began shortly after ovulation, when the luteal cells show pronounced mitotic activity (Aurich, 2011).

Thus, between days 0 and 5 of CL formation, P4 production increases, reaching its peak between days 8 and 10 post-ovulation (Aurich, 2011).

According to Bertan *et al.* (2006), during the luteal phase, higher serum P4 concentrations are associated with increased concentrations of mRNA for proteins that participate in the various stages of P4 production, including growth factors, StAR, and other steroidogenic enzymes (P450scc and 3 $\beta$ -HSD) and receptors (HDL, LDL, LH and GH). Moreover, as can also be observed in Figure 3, degenerative changes in the equine CL begin approximately 10 days post-ovulation, resulting in a gradual decline in plasma P4 levels. This dynamic becomes even more pronounced from day 13 to 14 of the estrous cycle, due to the increased presence of apoptotic cells (Al-Zilabi *et al.*, 2002).

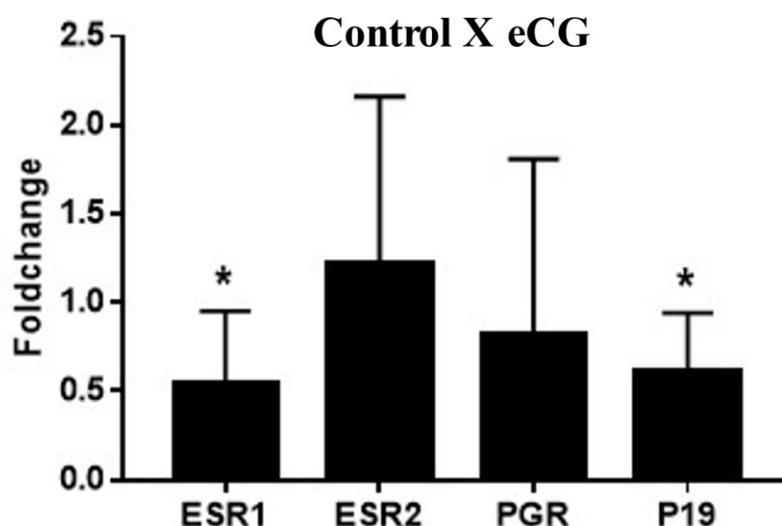
**Figure 3.** Serum P4 concentration in crossbred transitional mares submitted to estrus synchronization protocol with intravaginal P4 (2.0 g) releasing device and induction of ovulation with hCG, during late winter.



Abbreviations in Figure 3: CL: corpus luteum; CL10D, CL12D and CL14D: serum P4 concentration at the tenth, twelfth and fourteenth days after ovulation, respectively; D0: Serum P4 concentration before P4 device insertion; D5: serum P4 concentration at day 5 of the protocol; D10: serum P4 concentration at day 10 of the protocol; DF: dominant follicle; DeCG: day of treatment with eCG (eCG group) or saline solution (control group) (i.e. serum P4 concentration at the day of eCG or saline administration; DF=30mm); DhCG: day of treatment with hCG (i.e. serum P4 concentration at the day of ovulation induction; DF=35mm); eCG: equine chorionic gonadotropin; hCG: human chorionic gonadotropin; P4: progesterone.

Still, despite the lack of differences in follicular characteristics, luteal characteristics, and hormonal concentrations, significant differences were observed in ESR1 and P19 gene expression levels between the eCG and control group mares (Figure 4).

**Figure 4.** Comparative endometrial gene expression (ESR1, ESR2, PGR e P19) of eCG and Control groups assessed ten days after ovulation in transitional mares submitted to an P4-based protocol of ovulation induction with hCG during late winter



Abbreviations in Figure 4: ESR1: gene that encodes the transcription of ER $\alpha$  (E2- $\alpha$  receptor); ESR2: gene that encodes the transcription of ER $\beta$  (E2- $\beta$  receptor); PGR: gene that encodes the transcription of the P4 nuclear receptor; P19: gene that encodes uterocalin transcription; E2: estrogen; eCG: equine chorionic gonadotropin; P4: Progesterone. \*indicates P<0.01. The analysis of differential gene expression between the control and eCG groups was carried out using the REST 2009 software, developed by Pfaffl and collaborators (2001, 2002).

As demonstrated in Figure 4, the assessment of endometrial gene expression on the tenth day post-ovulation identified reduced expression of ESR1 and P19 in mares in the eCG

treatment group as compared to the control group, demonstrating that this hormone affected the endometrial expression of genes related to fertility, as described below.

The ESR1 gene is subdivided into eight regulatory regions (promoter region A, B, C, D, E1, F, T1, and T2) responsible for stimulating the transcription of other genes. Each region is differentially activated and exerts specific regulatory effects according to the tissue in question. Transcription of ESR1, or even stimulation of the transcription of other genes, requires the interaction of transcription factors (transcription activating proteins) with these promoter regions (Lung *et al.*, 2020). Previous studies reported that the AP-2 $\gamma$  protein and protein complexes Sp1 (specificity protein 1), Sp3 (specificity protein 3), and USF-1 (Upstream Transcription Factor 1) are the main transcription factors that interact with ESR1 promoter regions (de Coninck *et al.*, 1995; de Graffenried *et al.*, 2004). Through this mechanism, ESR1 expression stimulates the expression of EGR1 (early growth response gene -1), a gene involved in acute cell growth (Chen *et al.*, 2004), and the expression of these two genes is positively regulated in a codependent pathway (Kim *et al.*, 2011). Although EGR1 expression was previously demonstrated to be positively regulated by eCG through the activation of transcription factors (Duan *et al.*, 2001; Jager *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004), in the present study, the eCG administration repressed the ESR1 expression by half.

Veraguas *et al.* (2018) observed that feline oocytes supplemented with 200 IU of eCG showed greater expression of genes encoding the FSH receptor (FSHr), LH receptor (LHr), epidermal growth factor (EGFr), ESR2, and EGR1 and a higher maturation rate than untreated cycling cats, and that the eCG treatment increased the expression of specific genes improving the oocyte competence during the non-breeding season. Still, the eCG treatment in the present study seemed to interfere with the expression of ESR1, as observed in Figure 4. Since E2 is one of the most reliable molecules for stimulating ESR1 expression (Pelletier *et al.*, 2000; Ulbrich *et al.*, 2003), one cannot reject the possibility that mares treated with eCG may have produced lower concentrations of E2, which in turn contributed to the reduced expression of ESR1 observed in the endometrial cells of the eCG group as compared to the control group.

Despite the reduced binding affinity of eCG to LH receptors in mares, it is worth mentioning that the  $\beta$  subunit of the eCG molecule is identical to the equine pituitary LH

molecule and both seem to be encoded by a single gene (Murphy & Martinuk, 1991). Hence, eCG administration may supply the lack of pituitary LH for OF in acyclic animals acting on the unoccupied LH follicular receptors. Thus, considering the LH action of eCG, we hypothesized that the administration of 500 UI of eCG would have been beneficial to OF and/or CL size, E2 and/or P4 production, and to the endometrial expression of fertility related genes for acyclic mares during the transitional period. However, if the mares in our study had previously ovulated (that is, if they were transitional cyclic mares), it is understood that they may have sufficient physiological LH concentrations, which makes the use of eCG not necessary. Hereupon, our group (Teixeira et al., 2020) previously demonstrated that eCG seemed to impair the OF diameter of mares during the summer, but not in mares during the non-breeding season. In parallel, in noncyclic buffaloes, the addition of eCG at the time of P4 implant withdrawal substantially improved the ovulation rate comparing with animals not receiving the eCG, whereas no eCG effect was found in cyclic animals (Murugavel et al., 2009). Thus, a possible explanation for these findings would be to consider some occurrence of competition for LH receptors between eCG and LH, being exogenous eCG less efficient than endogenous LH to OF development (Teixeira et al., 2020). Thus, eCG presence may have been disadvantageous in cyclic mares for estradiol production and for endometrial expression of genes related to steroid production. However, since E2 concentrations assessment were not measured, this result needs further confirmation.

Figure 4 also demonstrates that the eCG-supplemented mares showed decreased expression of the gene encoding uterocalin synthesis (P19). Uterocalin is an endometrial protein synthesized by glandular cells in mares during dominant P4 influence, and is produced between days 8 and 12 of the estrous cycle (as well as during the initial period of gestation [Gebhardt *et al.*, 2012; Oquendo *et al.*, 2022]). Previous studies have reported uterocalin production in response to exogenous P4 stimulation (Crossett *et al.*, 1996; Crossett *et al.*, 1998). P19-encoding mRNA are exclusively isolated from endometrial cells of mares during dominant P4 influence (Crossett *et al.*, 1996) and, since uterocalin synthesis ceases concomitantly with the period of embryonic capsule loss and embryo implantation, this protein is suggested to be fundamental for embryo support, nutrition, and development during the preimplantation stage (Suire *et al.*, 2001).

Although no increase in serum P4 concentration was observed in the eCG group, the reduced expression of uterocalin in eCG-treated mares may also be due to steroidogenic impairment in this group. Positive associations between E2 and uterocalin were reported by Vaz *et al.* (2018), who demonstrated that mares subjected to an extended estrus simulation protocol (high doses of estradiol benzoate; EB) showed greater expression of uterocalin as compared to animals exposed to a shorter estrus simulation protocol. Similarly, Silva *et al.* (2021) compared cyclic mares under extended (EB treatment for eight days) or brief (two days of EB treatment) estrus synchronization protocols and observed that animals under greater estrogenic influence showed greater endometrial expression of the P19 gene. Furthermore, it has been reported that the ESR1 gene can influence the P19 expression, through the activation of transcription factors that act on the P19 gene (Rauscher, 1998; Wright *et al.*, 2012; He *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2022). Hence, it is plausible that the repressed expression of ESR1 observed in the eCG group affected the activation of transcription factors such as Activating Protein-1 (AP-1), which triggers the transcription of numerous other genes (Rauscher, 1998; Wright *et al.*, 2012; He *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2022). As such, the reduced ESR1 expression in mares treated with eCG seems to be associated with the lower endometrial expression of P19 observed in the experimental group.

Regarding to the histopathological assessment of the uterus (Table 02), it was observed higher glandular diameter of uterine tissue on the tenth day after ovulation (CLD10) in the mares of eCG group, which did not occur 14 (CLD14) days after ovulation.

**Table 2.** Glandular diameter, lumen diameter and epithelial height (mean  $\pm$  SD) on days 10 (CL10D) and 14 (CL14D) post ovulation of crossbred transitional mares submitted to estrus synchronization protocol with intravaginal P4 (2.0 g) releasing device and induction of ovulation with hCG, during late winter.

	CL10D			CL14D		
	Control	Ecg	Pvalue	Control	eCG	P value
DiamG	62.3 $\pm$ 27.2 <sup>a</sup>	139.2 $\pm$ 19.2 <sup>b</sup>	0.0496	127.8 $\pm$ 23.5	138.5 $\pm$ 19.2	0.7351
DiamL	23.9 $\pm$ 13.53	49.2 $\pm$ 9.59	0.1654	49.8 $\pm$ 11.74	63.8 $\pm$ 9.59	0.3888
Height	19.9 $\pm$ 7.93 <sup>a</sup>	44.1 $\pm$ 5.60 <sup>b</sup>	0.0373	39.2 $\pm$ 6.86	37.4 $\pm$ 5.60	0.8495

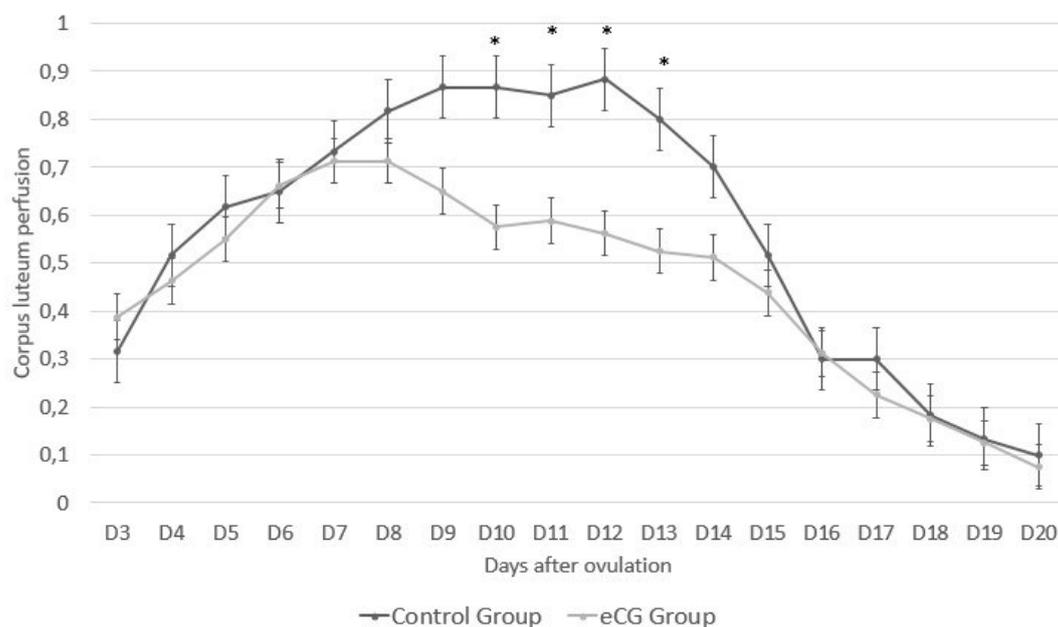
Control group: administration of saline solution (2.5 mL i.m.) in mares with a 30mm dominant follicle (DF); eCG group: administration of eCG (500 IU i.m.) in mares with a 30mm DF. Abbreviations in Table 2: DiamG: gland diameter; DiamL: glandular lumen; Height: height of the epithelium.

The greater ( $P=0.049$ ) diameter of the endometrial glands and higher ( $P=0.037$ ) height of the epithelium in treated animals may be associated with a direct influence of eCG. Mona & Pinto (2014) evaluated the influence of this glycoprotein on the endometrial glands and identified greater density and glandular diameter in crossbred beef cows receiving superovulation doses of eCG (2,000 IU). Moreover, Gurler et al. (2019) observed hyperplasia of the uterine glands in the eCG treated group indicating that this hormone can stimulate the growth of the uterine tissue. The eCG molecule is reported to be responsible for the activation of growth factors and genes that trigger the enlargement of endometrial glands and calyces (Allen et al., 1993). Allen et al. (2001) demonstrated that eCG acts on the mRNA expression mechanism of epidermal growth factor (EGF) which plays a mitogenic role in the apical portions of the endometrial glands, triggering their growth. Therefore, it is possible that, in the present study, the eCG molecule triggered mitogenic mechanisms in the epithelium of the endometrial glands.

Still, it is worth mentioning that ESR1 has mitogenic role in reproductive tissues (Furuminato et al., 2023) and that ESR1 knock-out animals presents reduced endometrial gland diameters and smaller uterine dimensions (Rizo et al., 2023). Thus, the reduced expression of ESR1 gene in the mares treated with eCG may have affected the mitogenic action of EGF on the apical portions of the endometrial glands, by preventing the glandular diameter and epithelium height from remaining enlarged on the 14th day after ovulation, as evidenced by the present histopathological analyses.

No differences were found on luteal perfusion from the third (CL3D) to the ninth (CL10D) day after ovulation (D3:  $P=0.479$ ; D4:  $P=0.584$ ; D5:  $P=0.504$ ; D6:  $P=0.898$ ; D7:  $P=0.831$ ; D8:  $P=0.312$ ; D9:  $P=0.066$ ) nor between days CL14D to CL20D (D14:  $P=0.0992$ ; D15:  $P=0.4323$ ; D16:  $P=0.8980$ ; D17:  $P=0.4554$ ; D18:  $P=0.9319$ ; D19:  $P=0.9319$ ; D20:  $P=0.7983$ ). However, differences were observed between the control and eCG groups from the tenth (CL10D) to the thirteenth day (CL13D) post ovulation (D10:  $P=0.025$ ; D11:  $P=0.036$ ; D12:  $P=0.0181$ ; D13:  $P=0.0313$ ) as demonstrated in Figure 05.

**Figure 5.** Luteal perfusion (%) evaluated from the third (CL3D) to the twentieth day (CL20D) after ovulation of crossbred transitional mares submitted to estrus synchronization protocol with intravaginal P4 (2.0 g) releasing device and induction of ovulation with hCG, during late winter.



\*Indicates  $P < 0.05$

Abbreviations in Figure 5: eCG: equine chorionic gonadotropin; D3 to D20: Third to twentieth day after ovulation; Control group: administration of saline solution (2.5 mL i.m.) in mares with a 30mm dominant follicle (DF); eCG group: administration of eCG (500 IU i.m.) in mares with a 30mm DF.

According to Fátima *et al.* (2013), eCG can modulate the luteal synthesis of cytokines, growth factors (such as the Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) and hormonal precursors linked to angiogenesis. VEGF is responsible for the development and maintenance of the dense network of newly formed capillaries in the CL, and its inhibition in non-human primates during the mid-luteal phase prevents CL angiogenesis and suppresses P4 secretion (Wulff *et al.*, 2000). However, in bovine, no differences were detected in the expression of VEGF-A mRNA eleven days after the eCG treatment, between the untreated cows and those treated with traditional dose (400 IU) or superestimulatory treatment (2000 IU) of eCG. Thus, during the mid-diestrus, in cows, the eCG treatment does not seem to have altered the gene expression of this growth factor and did not increase vascular perfusion (Pavanelo, 2012). In the assessment of the ipsilateral artery to the CL during diestrus, Bollwein *et al.* (2002) reported higher blood perfusion between days 0 and 2 post ovulation, with a pronounced drop until the sixth day, and a posterior increase in blood flow perfusion from the 6th to the 15th day of formed CL. Hence, in the present study, a robust blood flow in the ovary ipsilateral to the CL on days 10 to 13 after ovulation was expected. However, the reduction in vascular perfusion observed on CLD10 to CLD13 in the mares of eCG group was unexpected.

Nevertheless, Watson *et al.* (2000) demonstrated the importance of pulsatility of LH secretion in the maintenance of CL function in the mare, and extensive evidence indicate that luteal angiogenesis is hormonally regulated by LH (Fraser & Wulff, 2003) as most of the major potential regulatory factors respond to changing LH stimulation and are produced by the lutein cells (Dicson & Fraser, 2000), (Laitnen *et al.*, 1997) – (Sugino *et al.*, 2000). Moreover, VEGF production increases in luteinizing granulosa cells of the OF (Christenson & Stouffer, 1997) and is stimulated by addition of hCG to luteinized granulosa cells in culture (Neulen *et al.*, 1998). Hence, it cannot be ignored that, in the case of cyclic mares in transitional period, the reduced efficiency of the eCG molecule in the competition with LH for ovarian LH receptors may have negatively affected luteal angiogenesis, which would explain the present results of doppler assessment. Therefore, further studies are necessary in order to evaluate whether, in some way, the eCG molecule

may have negatively influenced the process of luteal angiogenesis, and the implications of these findings on the fertility of treated animals during spring transition period.

### 3.2. Experiment II

In the present experiment, of the eight mares evaluated (n= 4 in each group), only two ovulated in the control group, while three mares ovulated in the eCG group, making it not possible to perform comparative statistical analysis between the groups. Therefore, the results of experiment II are presented here in a descriptive way.

In Table 3 its is possible to observe the monitoring data on follicular and luteal diameter, ovulatory characteristics and P4 dosages of the mares evaluated, while in Figure 6 the luteal perfusion data are described.

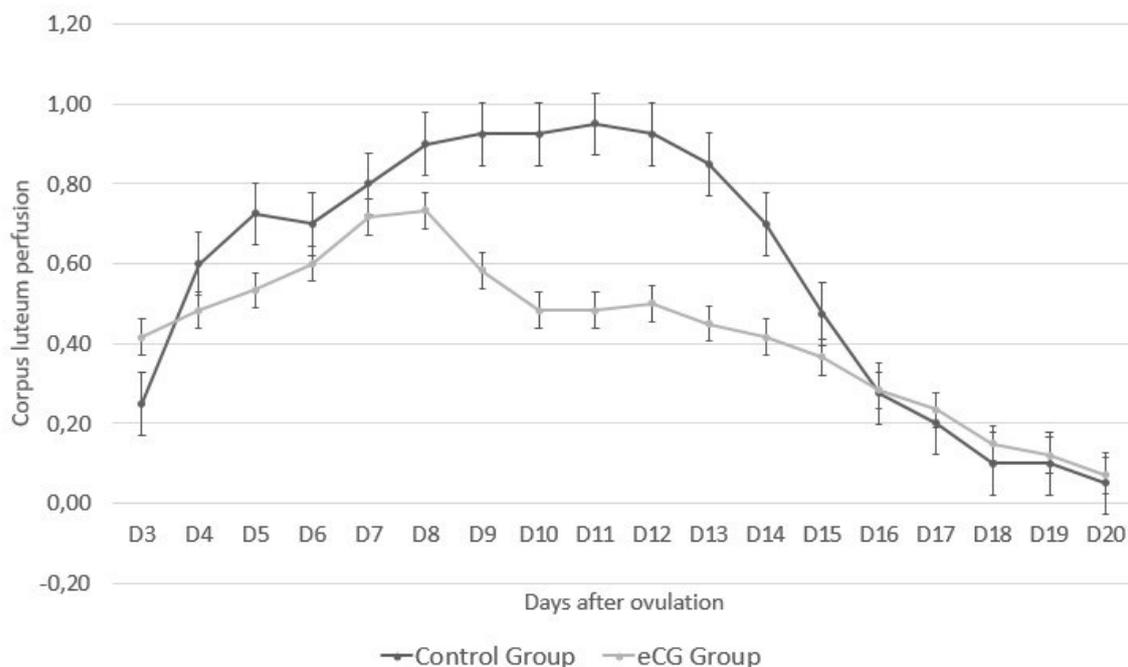
**Table 3.** Follicular dynamics, ovulatory characteristics, CL diameters, serum P4 concentrations, and structural CL regression (mean  $\pm$  SD) of crossbred transitional mares submitted to estrus synchronization protocol with intravaginal P4 (2.0 g) releasing device and induction of ovulation with hCG, during late winter.

Treatment Group	Control	eCG
BCS (1-5)	4.12 $\pm$ 0.25	4.25 $\pm$ 0.28
Ovulation Rate (%)	50% (2/4)	75% (3/4)
Growth rate of DF with P4 (cm/day)	0.4 $\pm$ 0.34	0.5 $\pm$ 0.40
Growth rate of DF without P4 (cm/day)	0.26 $\pm$ 0.51	0.28 $\pm$ 0.82
Interval from hCG to ovulation (hours)	36.00 $\pm$ 8.49	30.00 $\pm$ 0.00
Interval from P4 removal to ovulation (days)	5.50 $\pm$ 1.41	4.17 $\pm$ 0.58
Size of DF on DhCG (cm)	3.54 $\pm$ 0.04	3.79 $\pm$ 0.45
Size of DF on DOV (cm)	3.61 $\pm$ 0.28	3.74 $\pm$ 0.54
Size of CL10D (cm)	2.79 $\pm$ 0.47	2.88 $\pm$ 0.11
Size of CL12D (cm)	2.46 $\pm$ 0.01	2.73 $\pm$ 0.28
Size of CL14D (cm)	1.74 $\pm$ 0.01	2.33 $\pm$ 0.57
P4 at D0 (ng/ml)	0.27 $\pm$ 0.17	0.61 $\pm$ 0.34
P4 at D5 (ng/ml)	2.63 $\pm$ 1.00	2.32 $\pm$ 0.75
P4 at D10 (ng/ml)	2.08 $\pm$ 1.14	1.89 $\pm$ 0.59
P4 at DeCG	0.25 $\pm$ 0.10	0.31 $\pm$ 0.25
P4 at DhCG	0.20 $\pm$ 0.14	0.20 $\pm$ 0.17
P4 of CL10D (ng/ml)	3.71 $\pm$ 2.53	6.46 $\pm$ 1.94
P4 of CL12D (ng/ml)	0.40 $\pm$ 0.00	1.40 $\pm$ 0.28
P4 of CL14D (ng/ml)	0.52 $\pm$ 0.26	0.44 $\pm$ 0.26
Day of structural CL regression (days)	12.00 $\pm$ 1.41	11.67 $\pm$ 0.58

Control group: administration of saline solution (2.5 mL i.m.) in mares with a 30mm DF; eCG group: administration of eCG (500 IU i.m.) in mares with a 30mm DF; growth rate of DF with P4: follicular growth rate during P4 device insertion (D0 to D10); growth rate of DF without P4: follicular growth rate after P4 device removal (D11 to ovulation); interval from hCG to ovulation: average period in hours (in a 12-hour interval) from the application of hCG (follicle  $\geq 35$  mm) until ovulation; interval from P4 removal to ovulation: day on which ovulation was detected after P4 device removal.

Abbreviations in Table 1: BCS: body condition score of the mares; D0: Serum P4 concentration before P4 device insertion; D5: serum P4 concentration at day 5 of the protocol; D10: serum P4 concentration at day 10 of the protocol; DeCG: day of treatment with eCG (eCG group) or saline solution (control group) (i.e. serum P4 concentration at the day of eCG or saline administration; DF=30mm); DhCG: day of treatment with hCG (i.e. serum P4 concentration at the day of ovulation induction; DF=35mm); CL: corpus luteum; CL10D, CL12D and CL14D: CL by days 10, 12 and 14, respectively after ovulation; DF: dominant follicle; DhCG: day of treatment with hCG (ovulatory follicle reaching 35 mm); DOV: day of ovulation detection; eCG: equine chorionic gonadotropin; hCG: human chorionic gonadotropin; P4 progesterone; SD: standard deviation.

**Figure 6.** Descriptive luteal perfusion (%) evaluated from the third (CL3D) to the twentieth day (CL20D) after ovulation of crossbred transitional mares submitted to estrus synchronization protocol with intravaginal P4 (2.0 g) releasing device and induction of ovulation with hCG, during late winter.



Abbreviations in Figure 6: eCG: equine chorionic gonadotropin; D3 to D20: Third to twentieth day after ovulation; Control group: administration of saline solution (2.5 mL i.m.) in mares with a 30mm dominant follicle (DF); eCG group: administration of eCG (500 IU i.m.) in mares with a 30mm DF.

In the experiment II, it was demonstrated a similar pattern of change in luteal perfusion over days 3 to 20 after ovulation, and between experimental groups, especially from CLD7 to CLD13. Thus, treatment with 500 IU of eCG in transitional mares submitted to a P4-based hCG ovulation induction protocol during late winter seemed to reduce the luteal perfusion, corroborating the results demonstrated in experiment I.

#### **4.0. Conclusion**

The administration of 500 IU of eCG in transitional mares as part of a P4-based hCG ovulation induction protocol during late winter does not affect ovulatory characteristics but reduce the luteal perfusion and repress the expression of the ESR-1 and P19 genes of the uterine tissue.

#### **5.0. Acknowledgments**

The authors wish to thank the Pontificia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas) for the partnership and allowing the use of farm's facilities. The company GlobalGen vet Science for supplying the hormones and the Coordination of Superior Level Staff Improvement (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Brazil) for the PhD Degree Grant of Ana Carolina Bahia Teixeira.

#### **6.0. References**

Allen, WR.; Skidmore, JA.; Stewart, T.; Antczak, DF. Effects of fetal genotype and uterine environment on placental development in equids. *J. Reprod. Fert.*, v. 97, p. 55-60, 1993.

Allen, WR. The role of mesenchymal estrogen receptor 1 in mouse uterus in response to estrogen. *Reproduction*, v.121, p. 513–527, 2001.

Al-zi'abi mo, fraser hm, watson ed. cell death during natural and induced luteal regression in mares. *reproduction* 2002;123:67e77.

Arbeiter, k.; barth, u.; jochle, w. observations on the use of progesterone intravaginally and of deslorelin sti in acyclic mares for induction of ovulation. *j. equine. vet. sci.*, v. 14, p. 21-25, 1994.

Aurich c. reproductive cycles of horses. *animal reproduction science*, 124, 220–228. 2011.

Baruselli, p.s., marques, m.o., madureira, e.h., costa neto, w.p., grandinetti, r.r; bó, g.a. (2000) ovarian superovulation in embryo recipients to improve the number of corpus luteum, progesterone concentration and pregnancy rates. *acta sci vet*, v.28, p.218.

Baruselli, p.s., jacomini, j.o., sales, j.n.s., crepaldi, g.a (2008). importância do emprego da ecg em protocolos de sincronização para ia, te e sov em tempo fixo. in: simpósio internacional de reprodução animal aplicada, 3, 2008, londrina, pr. anais... londrina: siraa, p.146-167.

Bartlewski pm, beard ap, rawlings nc. an ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *theriogenology* 1999;52:115e30.

Berardino, c.d.; peserico, a.; capacchietti, g.; et al. equine chorionic gonadotropin as an effective fsh replacement for in vitro ovine follicle and oocyte development. *int. j. mol. sci.*, v.22, p. 1-22, 2021.

Bergfelt dr. anatomy and physiology of the mare. in: samper jc, editor. *equine breeding management and artificial insemination*. 2nd ed. missouri: saunders elsevier; 2009. p. 113e31.

Bertan, cm; binelli, m; madureira, eh et al. 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

Bollwein, h.; mayer, r.; weber, f.; stolla, r. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, v. 57, n. 8, p. 2043–2051, 2002

Bollwein, H.; mayer, r.; stolla, r. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. *Theriogenology*, v. 60, p. 597–605, 2003

Bousfield GR, Butnev VY, Butnev VY. Identification of twelve O-glycosylation sites in equine chorionic gonadotropin beta and equine luteinizing hormone ss by solid-phase Edman degradation. *Biol Reprod* 2001;64:136e47.

Brito l, baldrighi j, wolf c, ginther o. effect of gnrh and hcg on progesterone concentration and ovarian and luteal blood flow in diestrous mares. *Anim reprod sci* 2017;176:64e9.

Campos, j. t., marinho, l. s. r., lunardelli, p. a., morotti, f., & seneda, m. m. (2013). resynchronization of estrous cycle with ecg and temporary calf removal in lactating bos indicus cows. *theriogenology*, 80(6), 619–623.

Christenson LK, Stouffer RL: Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J Clin EndocrinolMetab*1997,82:2135-2142.

Chen, c. c.; lee, w. r; and safe, s. egr-1 is activated by 17beta-estradiol in mcf-7 cells by mitogen- activated protein kinase-dependent phosphorylation of elk-1. *j. cell. biochem.*, v. 93, 1063-1074, 2004.

Cole HH, Bigelow M, Finkel J, Rupp GR. Biological half-life of endogenous PMS following hysterectomy and studies on losses in urine and milk. *Endocrinology* 1967;81:927e30.

Crossett, B.; Allen, W.; Stewart, F. A 19 kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. *Biochem. J.* v. 1996, p. 137-143, 1996.

Crossett, B.; Suire, S.; Herrler, A. et al. Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus. *Biol. Reprod.* V.59, p. 483±490, 1998.

Cuervo-arango, j.; clark a. the first ovulation of the breeding season in the mare: the effect of progesterone priming on pregnancy rate and breeding management (hcg response rate and number of services per cycle and mare). *anim reprod sci.*, v.118, 265-269, 2010.

Daels PF, Hughes JP. The normal estrous cycle. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea and Febiger; 1993. p. 121e32.

De jager, t.; pelzer, t.; muller-botz, s. et al. mechanisms of estrogen receptor action in the myocardium. rapid gene activation via the erk1/2 pathway and serum response elements. *j. biol. chem.*, v.276, p. 27873-27880, 2001.

deConinck, E.C.; McPherson, L.A.; Weigel, R.J. Transcriptional regulation of estrogen receptor in breast carcinomas. *Mol Cell Biol.*, v.15, p.2191–2196, 1995.

deGraffenried, L.A.; Friedrichs, W.E.; Russell, D.H.; Donzis, E.J. et al. Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt activity. *Clin Cancer Res.*, v.10, p. 8059– 8067, 2004.

Dickson SE, Fraser HM: Inhibition of early luteal angiogenesis by gonadotropin releasing hormone antagonist treatment in the primate. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:2339-2344

Douglas RH, Ginther OJ. Effects of prostaglandin F2a on the oestrous cycle and pregnancy in mares. *J Reprod Fertil Suppl* 1975;23:257e61.

Duan, r.; xie, w.; burghardt, r. c. et al. estrogen receptor-mediated activation of the serum response element in mcf-7 cells through mapk-dependent phosphorylation of elk-1. *j. biol. chem.*, v.276, p.11590- 11598, 2001.

Evans MJ, Irvine CH. Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 1975;23:193e200.

Fatima, L. A.; baruselli, p. s.; gimenes, l. u.; binelli, m.; renno, f. p.; murphy, b. d.; et al. Global gene expression in the bovine corpus luteum is altered after stimulatory and superovulatory treatments. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 25, n. 07, p. 998-1001, 2013.

Fazio E, Santo Fragala S, Ferlazzo A, Cravana C, Torrisi K, Medica P. Progesterone, estradiol-17b, Cortisol, and Hematological profile during the estrous cycle of lactating Jennies: Preliminary and Comparative observations. *J Equine Vet Sci* 2017;56:26e34

Ferreira-Dias G, Bravo PP, Mateus L, Redmer DA, Medeiros JA. Microvascularization and angiogenic activity of equine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Domest Anim Endocrinol* 2006;30:247e59.

Fischer, r.a.; nakajima, s.t.; gibson, m. et al. ovulation after intravenous and intramuscular human chorionic gonadotropin. *fertil steril.*, v.60, p.418-422, 1993.

Furuminato, K; Minatoya, S.; Senoo, E.; Goto, T.; Yamazaki, S.; Sakaguchi, M.; Toyota, K.; Iguchi, T.; Miyagawa, S. The role of mesenchymal estrogen receptor 1 in mouse uterus in response to estrogen. *Nature*, v.13, p. 1-12, 2023.

Fraser, hamish m.; wulff, christine. Angiogenesis in the corpus luteum. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 1, p. 1-8, 2003.

Galet C, Lecompte F, Combarnous Y. Association/dissociation of gonadotropin subunits involves disulfide bridge disruption which is influenced by carbohydrate moiety. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:868e73.

Gastal, e.l.; bergfelt, d.r.; nogueira, g.p. et al. role of luteinizing hormone in follicle deviation based on manipulating progesterone concentrations in mares. *biol reprod.*, v.61, p. 1492-1498, 1999.

Gebhardt, s.m.; analysis and comparison of dynamic mrna expression changes in the equine and porcine endometrium during the estrous cycle, (p.136) münchen, 2017.

Ginther OJ, Pineda MH, Wentworth BC, Nuti L. Rate of disappearance of exogenous LH from the blood in mares. *J Anim Sci* 1974;39:397e403.

Ginther OJ. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2<sup>nd</sup> ed. Cross Plains, WI: Equiservices; 1992.

Ginther oj, gastal el, gastal mo, beg ma. seasonal influence on equine follicle dynamics. *anim reprod*, v.1, p.31-44, 2004. disponível em: <https://www.animalreproduction.org/article/5b5a608bf7783717068b480c>

Ginther, o. j.; utt, matthew d. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 24, n. 12, p. 516-526, 2004.

Ginther OJ, Rodrigues BL, Ferreira JC, Araujo RR, Beg MA. Characterisation of pulses of 13,14-dihydro- 15-keto-PGF<sub>2</sub>α (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:684e93.

Gonella-diaza am, holguín g, montañana d, valbuena d. corpus luteum diameter and embryo developmental stage are associated with pregnancy rate: data analysis from 17,521 embryo transfers from a commercial in vitro bovine embryo production program. *anim reprod* 2013;10:106e11

Gürler, hande et al. Morphometric and histopathologic evaluation of the effects of cloprostenol and equine chorionic gonadotropin administration on the reproductive organs of female rats. *veterinary medicine-science and practice*, v. 75, n. 3, 2019.

Hanlon dw, evans mj, firth ec. effect of intravaginal progesterone on follicular dynamic and fsh, lh and progesterone concentrations in transitional mares. *anim reprod sci.*, v.121, p. 32-34, 2010.

He, H.; Sinha, I.; Fan, R. et al. c-Jun/AP-1 overexpression reprograms ERα signaling related to tamoxifen response in ERα-positive breast cancer. *Oncogene*, v. 37, p. 2586-2600, 2018.

Kim, j.h.; jeong, i.; lim, y. estrogen receptor  $\beta$  stimulates egr-1 transcription via mek1/erk/elk-1 cascade in c6 glioma cells. *bmb rep.*, v. 44, n.7, p. 452-457, 2011.

Laitinen M, Ristimäki A, Honkasalo M, Narko K, Paavonen K, Ritvos O: Differential hormonal regulation of vascular endothelial growth factors VEGF, VEGF-B, and VEGF-C Messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 1997;138:4748-4756.

Lemes, K. M. Avaliação da dinâmica ovariana, características uterinas, fluxo sanguíneo uterino e ovariano e concentrações séricas de progesterona em éguas no período pós-parto. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Lung, D.K.; Reese, R.M.; Alarid, E.T. Intrinsic and Extrinsic Factors Governing the Transcriptional Regulation of ESR1. *Horm Cancer*, v. 3, p. 129-147, 2020.

Marulanda, v.; haas, c.s.; goularte, k.l. et al. expression of steroidogenic enzymes and tgfb $\beta$  superfamily members in follicular cells of prepubertal gilts with distinct endocrine profiles. *zigote*, v.1, p. 1-11, 2022.

Mccue pm. induction of ovulation. in: robinson ne, editor. current therapy in equine medicine. 5th ed. philadelphia: saunders; 2003. p. 240e2.

Menzer C, Schams D. Radioimmunoassay for PMSG and its application to in vivo studies. *J Reprod Fertil* 1979;55:339e45.

Mona e pinto, J. et al. Treatment with eCG decreases the vascular density and increases the glandular density of the bovine uterus. *Reproduction in domestic animals*, v. 49, n. 3, p. 453-462, 2014.

Mohktari a, kafi m, zamiri mj, akbari r. factors affecting the size of ovulatory follicles and conception rate in high-yielding dairy cows. *theriogenology* 2016;85:747e53.

Murphy, b. d.; martinuk, s.d. equine chorionic gonadotrophin. *endocr. rev.* v. 12, n.1, p. 27-44, 1991.

Murugavel K, Antoine D, Raju MS, Lopez-Gatius F. The effect of addition of equine chorionic gonadotropin to a progesterone-based estrous synchroni-zation protocol in buffaloes (*Bubalus bubalis*) under tropical conditions. *Theriogenology* 2009;71:1120e6

Nascimento, b.r. ; freitas, d.s. ; nogueira, j.m. et al. Drastic Loss of Antral Follicles Due to Gene Expression Dysregulation Occurs on the First Day After Subcutaneous Ovarian Transplantation. *Reprod Sci*, v.30, p. 2524–2536, 2023.

Ndiaye, k.; fayad, t.; silversides, d.w. et al. identification of downregulated messenger rnas in bovine granulosa cells of dominant follicles following stimulation with human chorionic gonadotropin. *biol reprod* v.73, p. 324–33, 2005.

Nett, t.m.; pickett, b.w.; seidel, g.e. et al. levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrous cycle and early pregnancy in mares. *biol. reprod.*, v.14, p.412-415, 1976

Newcombe, j.r.; handler, j.; klug, e. et al. treatment of transition phase mares with progesterone intravaginally and with deslorelin or hcg to assist ovulations. *j equine vet.*, v.22, p. 57-64, 2002.

Núñez-olivera, r., de castro, t., garcía-pintos, c., bó, g., piaggio, j., & menchaca, a. (2014). ovulatory response and luteal function after ecg administration at the end of a progesterone and estradiol' based treatment in postpartum anestrous beef cattle. *animal reproduction science*, 146(3-4), 111–116.

Oquendo, p.s.; oquendo, f.m.g.; silva, e.s.m. use of estrogen before progesterone improves embryo survival in acyclic recipient mares: preliminary results (preprint).

Pavanelo J, V. Expressão do sistema VEGF-A no útero bovino após tratamento com diferentes doses de eCG. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Pelletier, g.; labrie, c.; labrie, f. localization of oestrogen receptor oestrogen receptor and androgen receptor in the rat reproductive organs. *j. endocrinol.*, v.165, p.359-370, 2000.

Pfaffl mw, horgan gw, dempfle l. relative expression. software tool (rest) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time pcr. nucleic acids res. 2002 may 1;30(9):e36.pmid:11972351;pmcid:pmc113859

Pfaffl, m. w. A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. nucleic acids reserch, v.29, n.9, p.e45-e45, 2001.

Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. Theriogenology 1988;29:21e37.

Rizo, JA.; Davenport, KM.; Winuthayanon, W.; Spencer, TE.; Kelleher, AM. Estrogen receptor alpha regulates uterine epithelial lineage specification and homeostasis. iScience, v.26, n.9, 1-19, 2023.

Sá filho, m.f.; ayres, h.; ferreira, r.m. et al. equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled nelore (bos indicus) cows. *theriogenology*, v.73, p. 651–658, 2010.

Samper jc, pycock jf, mckinnon ao. 2007. current therapy in equine reproduction. st. louis missouri: saunders, elsevier inc.

Samper, j.c.; jensen, s.; sergeant, j. et al. timing of induction of ovulation in mares treated with ovuplant or chorulon. *j equine vet sci.*, v.22, n.320-323, 2002.

Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E: Patterns of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 1993, 91:2235-2243.

Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Kato H: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human

corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:3919-3924.

Souza, a.h., viechnieski, s., lima, f.a., silva, f.f., arújo, r., bó, g.a., wiltbank, m.c., baruselli, p.s (2009). Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology*, v.72, p.10-21.

Suire, S.; Stewart F.; beauchamp,J. et al. Uterocalin, a lipocalin provisioning the preattachment equine conceptus : fatty acid and retinol binding properties, and structural characterization. *Biochem. J.*, v.356, p. 369-376, 2001

Satué k, gardón jc. a review of the estrous cycle and the neuroendocrine mechanisms in the mare. *journal of steroids & hormonal science*. 2013.

Silva, e.s.m.; vaz, i.s.; rodrigues, t.s. et al. artificial long estrus protocols administered prior to progesterone increase uterocalin endometrial expression in anestrous mares. *j equine vet sci*, v.103 p.103669, 2021.

Silva, ESM.; Roser JF.; Gomes ARC.; Fritsch SC.; Pantoja JCF; Oliveira- Filho JP; Meira, C. Comparison of different regimens of estradiol benzoate treatments followed by long-acting progesterone to prepare noncycling mares as embryo recipients., *Theriogenolog*, v. 86, p. 1749–1756, 2016.

Soumano, k.; price, c.a. ovarian follicular steroidogenic acute regulatory protein, low-density lipoprotein receptor, and cytochrome p450 side-chain cleavage messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. *biol. reprod.*, v.56, p.516-522, 1997.

Ulbrich, S.E.; Einspanier, K.R. Expression and localization of estrogen receptor, estrogen receptor and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and *in vitro*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v.84, p.279-289, 2003

Staempfli, s. a., clavier, s., thompson, d. l (2011). o. effect of a single injection of long-acting progesterone on the first ovulation in early and late spring transitional mares. *journal of equine veterinary science*, v. 31, n.1, p. 744-748.

Teixeira, ana carolina bahia et al. effects of equine chorionic gonadotropin on ovulatory and luteal characteristics of mares submitted to an p4-based protocol of ovulation induction with hcg. *journal of equine veterinary science*, v. 94, p. 103233, 2020.

Tsukada T, Sato K, Moriyoshi M, Koyago M, Sawamukai Y. Treatment with a high dose Combination of PMSG/hCG preparation of mares clinically diagnosed with ovarian quiescence during the breeding season (investigation from 1975 to 2000). *J Equine Sci* 2008;19:35e8.

Ulbrich, s.e.; einspanier, k.r. expression and localization of estrogen receptor, estrogen receptor and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and *in vitro*. *j. steroid biochem. mol. biol.*, v.84, p.279-289, 2003

Vaz, i.s. efeito do tempo de tratamento e frequência de administração do estradiol previamente à progesterona sobre a expressão endometrial de uterocalina em éguas acíclicas. p. 21. (trabalho de conclusão de curso – uberlândia 2018)

Veraguas, d.; cuevas, s.r.; gallegos, p.f. et al. ecg stimulation in domestic cats increases the expression of gonadotrophin-induced genes improving oocyte competence during the non-breeding season. *reprod dom anim.*, v.1. p. 1-11, 2018.

Watson, e.d., et al. control of follicular development and luteal function in the mare: effects of a gnrh antagonist. *theriogenology*, p.599-609, 2000.

Wulff, C.; wilson, h.; largue, p.; duncan, w. c.; armstrong, d. g.; fraser, h. m. Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie- 2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 85, p. 4302-4309, 2000.

Yoon M. The estrous cycle and induction of ovulation in mares. *J Anim Sci Technol* 2012;54:165e74.

Yu, k.; huang, z.y.; xu, x.l. et al. estrogen receptor function: impact on the human endometrium. *front endocrinol.*, v.13, p. 1-16, 2022.

## 7.0 Artigo 02: Comparison of serum progesterone levels during intravaginal device insertion in mares

### Communication

[Comunicação]

### Comparação descritiva de dosagens séricas de progesterona durante inserção de dispositivo intravaginal em éguas

[Descriptive comparison of serum progesterone levels during intravaginal device insertion in mares]

A.C.B. Teixeira<sup>1</sup> , J.A.N. Riveros<sup>1</sup> , I.C. Pereira<sup>1</sup> , B. R. Martins<sup>2</sup> , L.L. Ledo<sup>2</sup> ,  
M. F. Brito<sup>3</sup> , G.A. Monteiro<sup>4</sup> , F. P. Leme<sup>4</sup> , L.Z. Oliveira<sup>4\*</sup> 

<sup>1</sup>Graduate, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>2</sup> Undergraduate, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG), Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>3</sup>Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG), Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>4</sup>Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

The equine industry plays an important role in the national and international agribusiness and the valuation of time savings and human resources is increasingly relevant in the field routine. Therefore, the use of hormonal protocols associating progesterone (P4) and estradiol (E2) to synchronize estrus and/or reduce the length of transitional periods are increasingly applicable in equine breeding systems.

In athletic mares, P4 is frequently used to reduce estrus behavior because, when associated with estradiol-17b, it plays a role of suppressing follicular development (Pinto *et al.*, 2004). Additionally, P4-based protocols can promote estrus synchronization (Faria and Gradela, 2010; Fedorka *et al.*, 2019) and cyclicity anticipation,

decreasing the transition period and thus increasing the length of breeding season (Ginther *et al.*, 2004; Satué and Gardón, 2013).

During P4 treatment, LH secretion is suppressed. Hence, the treatment with P4 inhibits estrus expression, interrupting the simultaneous follicular maturation and positively affecting the accumulation of LH in the pituitary. At the end of P4 treatment, a large secretion of LH is provided with formation of a dominant follicle with ovulatory capacity. Therefore, hormonal protocols with P4 supplementation can provide several favorable results when correctly applied and outside the period of deep anestrus (Handler

\*Corresponding author: [leticiazoccolaro@yahoo.com.br](mailto:leticiazoccolaro@yahoo.com.br); [leticiazo@vet.ufmg.br](mailto:leticiazo@vet.ufmg.br)

*et al.*, 2006; Hanlon and Firth, 2012; Teixeira *et al.*, 2021).

Progestogens are synthetic compounds that act on P4 receptors and may belong to different molecular classes and be available in different ways (Piette, 2018). In general, oral and injectable synthetic progestins are commercially available, as well as intravaginal devices (Faria and Gradela, 2010). Intravaginal progestogens are advantageous because they are easily applied and do not require daily treatment and/or injections (Negretti *et al.*, 2018).

In cattle, intravaginal P4 devices are widely used and ensure ovulation blockade, even when the implant is reused (Oliveira *et al.*, 2019). This second use depends on the initial P4 concentration of the device and animal category, but it is presented as an alternative to reduce the cost of the protocol. However, in mares, no studies were found in the literature using second-use devices or describing the serum concentrations of P4 during the device insertion. Therefore, the present study aims to describe the serum levels of P4 in mares treated with one or two first-use (new) intravaginal devices and even with a second use (reused) device in a period of ten consecutive days and to compare the P4 concentration obtained throughout the experimental period of the three treatments.

The experiment was performed on an experimental farm located in Esmeraldas (tropical climate), in the state of Minas Gerais, Brazil (latitude 19°45'46" S, longitude 44°18'47" W). Females were kept on the same pasture of *Cynodon dactylon* with water ad libitum, during the month of September 2021 (CEUA UFMG 49/2021).

Three crossbred healthy mares, aged between 8 and 14 years and body condition score 3 (Carroll and Huntington, 1988) were selected for the study. A previous gynecological examination was performed for each mare to assure the absence of corpus luteum in the ovaries and the absence of vaginal discharge, endometrial edema, or uterine alterations.

The intravaginal P4 release device used in this study was the Reprosync (GlobalGen, São Paulo, Brazil) containing 2.0 g of progesterone. In all animals the P4 devices were maintained for 10 days after insertion (D0 to D10). Mare 1 received two new (first use) P4 devices (two devices containing 2g of P4 each), mare 2 received a new P4 device (one device containing 2g of P4) and mare 3 received reused (second use) P4 device (a 2g P4 device previously used in another adult mare, for 10 days, before the experiment).

Blood collections for serum P4 dosage were performed before insertion of the device (D0), and daily, during the 10 days the device was in use (D0 to D10), in the morning (9:00am) and in the period of afternoon (15:00 pm).

The devices were intravaginally inserted with a specific applicator for this purpose (GlobalGen, São Paulo, Brazil) previously cleaned with a 1:3000 CB30 TA® solution (Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride, Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brazil) for 5 minutes. Additionally, the antibiotic oxytetracycline hydrochloride (Terra-Cotril® Spray, Zoetis, São Paulo, Brazil) was subsequently applied on the intravaginal applicator surface.

In the case of the used implant (second-use implant), after it was used for the first time, it was washed in a bucket with water and soap to remove dirtiness (after its removal from the first use) and then it was washed with running water. Subsequently, the device was cleaned with a 1:3000 CB30 TA® solution (Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride, Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brazil) for 5 minutes. After drying in the shade and at room temperature, it was stored in its original packaging until reuse.

Blood samples were obtained using siliconized tubes (red cap) and a 25mm x 8mm needle (Vacutainer® system), reserved at room temperature for 1 hour to clot. Then, the tubes were centrifuged (FANEM, model excelsa baby) for 15 minutes at 900xg at 20°C. The aliquoted serum was stored in polystyrene tubes at -20°C until analyzed.

Progesterone concentrations were analyzed by using the chemiluminescence method (IMMULITE 2000 XPi immunoassay system; Siemens Healthineers, Erlangen, Germany, USA) as described by Fazio *et al.* (2017) using a sequential competitive immunoassay (IMMULITE 2000 P4). The volume of 50 mL of serum was required for every cycle of incubation (2 x 30 minutes). The coefficient of variation for intra- and inter-assay were 6.3% and 7.9%, respectively (Teixeira *et al.*, 2020).

In the present work, serum P4 concentrations of mares receiving different amounts of intravaginal P4 were described. The intravaginal P4 devices have been used in horses because it is a non-invasive and practical procedure that allows rapid and prolonged absorption of P4 (Pohl *et al.*, 2009; Negretti *et al.*, 2018). Nevertheless, the commercially available devices were designed for the bovine anatomy which may cause losses of these devices when used in mares, or even undesirable local inflammatory reactions (Polasek *et al.*, 2017). In the present study, however, the P4-releasing intravaginal device used (commercially indicated for cattle) was easy to apply in the mares and no occurrences of expulsion or losses were observed during the days of the experiment.

Additionally, in the mares of the present study, no vaginal discharge was identified.

Hence, considering that the use of intravaginal devices can lead to inflammatory process of vaginal mucosa due to the mechanical action they exert in the organ (Faria and Gradela, 2010; Polasek *et al.*, 2017, the importance of impregnating the devices with antibiotics prior to insertion is highlighted, as well as the correct hygiene of the second-use device, to minimize the chances of developing vaginitis (Rutten *et al.*, 1986). In the study of Handler *et al.* (2006), which evaluated the use of intravaginal devices in mares, no previous use of antibiotics was performed and approximately one third of the animals presented moderate vaginitis. Still, according to other authors, when vaginitis occurs it is spontaneously resolved and does not have a negative impact on the total number of follicles, follicle diameter, ovulation rates, interval between P4 removal and ovulation, endometrial edema, or pregnancy rate, and does not affect embryo losses in recipient mares (Polasek *et al.*, 2017; Segabinazzi *et al.*, 2021).

In the present work, at the time that devices were inserted, none of the three mares had a corpus luteum (CL), which was confirmed by the serum hormone dosage showing P4 values below 1 ng/ml on D0 (am), as demonstrated in Table 1. From the insertion of intravaginal devices, serum P4 concentrations increased in all mares of the study and the values were already above 1ng/mL at six hours after the insertion (Table 1).

As previously demonstrated, regardless of seasonality, transvaginal absorption of P4 occurs immediately and effectively in the first hours after insertion (Handler *et al.*, 2006; Pohl *et al.*, 2009). The high absorptive capacity of vaginal mucosa and the type of material used for production of intravaginal implants allows this rapid hormone level rise (Handler *et al.*, 2006; Segabinazzi *et al.*, 2021).

The release mechanism of P4 from the device occurs by passive diffusion, and the hormone transfer is directly proportional to the magnitude of the concentration gradient across the

membrane, the P4 liposolubility coefficient and the exposed surface area. In addition to the rapid hormone absorption right after the device insertion, this mechanism enables slow hormone release, maintenance of plasma levels for long

periods (during the period of device presence) and sharp drop in P4 serum concentrations right after the device removal (Lavy *et al.*, 2006; Brunton and Parker, 2008).

Table 1. Descriptive values of serum progesterone (P4; ng/mL) concentration of mares receiving two new intravaginal P4 devices (2g of P4 each device), one new intravaginal P4 device (2g of P4) or used intravaginal P4 device (one previously used device of 2g of P4), inserted for 10 days

Intravaginal P4	D0 (am)	D0 (pm)	D2 (am)	D2 (pm)	D4 (am)	D4 (pm)	D6 (am)	D6 (pm)	D8 (am)	D8 (pm)	D10 (am)	D10 (pm)
Two new devices	0.60	1.50	8.89	8.44	5.30	4.21	4.37	4.56	3.49	4.49	4.11	1.76
One new device	0.48	4.21	5.51	3.61	3.32	3.32	2.96	2.56	2.25	3.36	2.43	0.91
One used device	0.41	3.36	4.00	3.21	2.23	2.70	2.78	3.20	2.30	3.08	1.09	0.51

D0 (am): Serum P4 concentration before device insertion (at 09:00 am of day 0); D0 (pm): Serum P4 concentration 6 hours after P4 insertion (at 15:00 of day 0); D2 (am): P4 concentration assessed in the morning of the second day of device presence (at 09:00 am of day 2); D2 (pm): P4 concentration assessed in the afternoon of the second day of device presence (at 15:00 of day 2); D4 (fourth day of device presence); D6 (sixth day of device presence); D8 (eighth day of device presence); D10 (am): P4 concentration assessed in the morning of the tenth day (last day) of the device insertion (at 09:00 am of day 10); D10 (pm): P4 concentration assessed 6 hours after P4 device removal (at 15:00 of day 10).

In Table 1 we also observe a sudden drop in the serum concentrations of the hormone in the 3 mares. However, in the mare that received two P4 devices (mare 1), the decrease in P4 concentrations occurred more slowly. At six hours after device removal, this animal still presented values above 1ng/mL due to the need for more time to metabolize the higher concentration of circulating P4 observed throughout the experimental period in this animal.

Similarly, Bisinotto *et al.* (2015) showed, in dairy cows, that after the device removal the serum P4 concentrations using two intravaginal devices decreases more slowly compared to one device (with values greater than 1ng/ml) and that the P4 levels of animals with two devices are closer to the hormone values produced by the CL compared to only one device. Also in dairy cows, Vasconcelos *et al.* (2018) showed that the use of a second device had a positive influence on follicular growth and oocyte quality compared to animals with one device. Additionally, an improvement in the fertility of dairy cows was confirmed in the animals that ovulated larger follicles due to the increased circulating P4

promoted by the doble device (Vasconcelos *et al.*, 2018).

Considering the mean P4 levels throughout the entire experimental period for each animal (Table 2), it was observed that the mare that received two P4 implants (mare 1) had numerically higher mean serum P4 concentration than the mare that received one new P4 device or than the mare that received one used P4 device, which may be related to the larger contact surface of the two implants, compared with the contact surface with the vaginal mucosa of only one implant. Silva *et al.* (2021), using non-lactating Holstein cows, demonstrated that the size of surface area affects the ability of devices to release P4 since the greater the contact surface area, the greater the circulating concentrations of P4. Because the vaginal epithelium is highly permeable to steroids (and analogues), it is considered a fast and effective route of absorption for releasing the hormone into the circulation (Villanueva *et al.*, 1981; Rothen-Weinhold *et al.*, 2000; Corleta *et al.*, 2004).

On the other hand, it was interesting to note that the mares receiving one new device (mare 2), or a previously used device (mare 3), had relatively similar means of P4 levels, numerically, over the experimental period (Table 2). To the authors' knowledge, this is the first report to describe serum P4 concentrations in mares with a second-use intravaginal implant and it is also the first report to demonstrate that, in mares, the mean

serum P4 concentrations seems to be similar in animals with new or reused intravaginal devices. On this basis, it may perhaps be speculated that, after the first use in mares, the levels of P4 impregnated in the device remained high enough to be reused in mares, and/or that the surfaces area in contact with the vaginal mucosa of both mares have the same limits of P4 absorption (by the vaginal mucosa), which prevents the animal that received a new implant from having more circulating P4.

Table 2. Descriptive means ( $\pm$  SD) of serum progesterone (P4; ng/mL) concentrations of mares receiving two (2g of P4 each device), one (2g of P4) or used (one previously used device of 2g of P4) intravaginal P4 device, inserted for 10 days

Intravaginal P4	D1	D3	D5	D9	Mean from D1 to D10
Two new devices	6.68 $\pm$ 6.96	5.27 $\pm$ 0.01	4.03 $\pm$ 0.24	4.03 $\pm$ 0.78	5.11 $\pm$ 2.24
One new device	4.93 $\pm$ 0.24	3.36 $\pm$ 0.01	2.89 $\pm$ 0.07	2.27 $\pm$ 0.28	3.27 $\pm$ 0.94
One used device	3.84 $\pm$ 0.03	3.18 $\pm$ 0.04	2.27 $\pm$ 0.15	2.27 $\pm$ 0.25	2.78 $\pm$ 0.72

D1: mean of serum P4 concentrations assessed at morning and afternoon of the first day (day 1) of P4 device presence, of each mare; D3: mean of serum P4 concentrations assessed at morning and afternoon of the third day (day 3) of P4 device presence, of each mare; D5: mean of serum P4 concentrations assessed at morning and afternoon of the fifth day (day 5) of P4 device presence, of each mare; D9: mean of serum P4 concentrations assessed at morning and afternoon of the ninth day (day 9) of P4 device presence, of each mare; Mean from D1 to D10: overall mean of serum P4 concentrations throughout the entire experimental period of each mare (from the morning of day 1 until the morning of day 10; overall period of the presence of intravaginal P4 device).

Additionally, the Fig. 1 allows the graphic visualization of the numerical superiority of serum P4 levels in mare 1 (two P4 devices) at 24 hours after the implant insertion (D1) in relation to the other mares, reaching approximately 6.7 ng/ml of P4 in D1 and approximately 8.7 ng/ml of P4 in D2. As previously mentioned, this likely occurred due to the doubling of the initial P4 availability associated with the greater contact

surface with the vaginal mucosa provided by the presence of two devices. Polo *et al.* (2016) demonstrated positive outcomes of the double administration of intravaginal P4 device in the induction of ovarian cyclicity in mares, during transitional and anestrus periods. The descriptive results of the present study also suggest that serum P4 concentrations can be different according to the number of devices inserted.

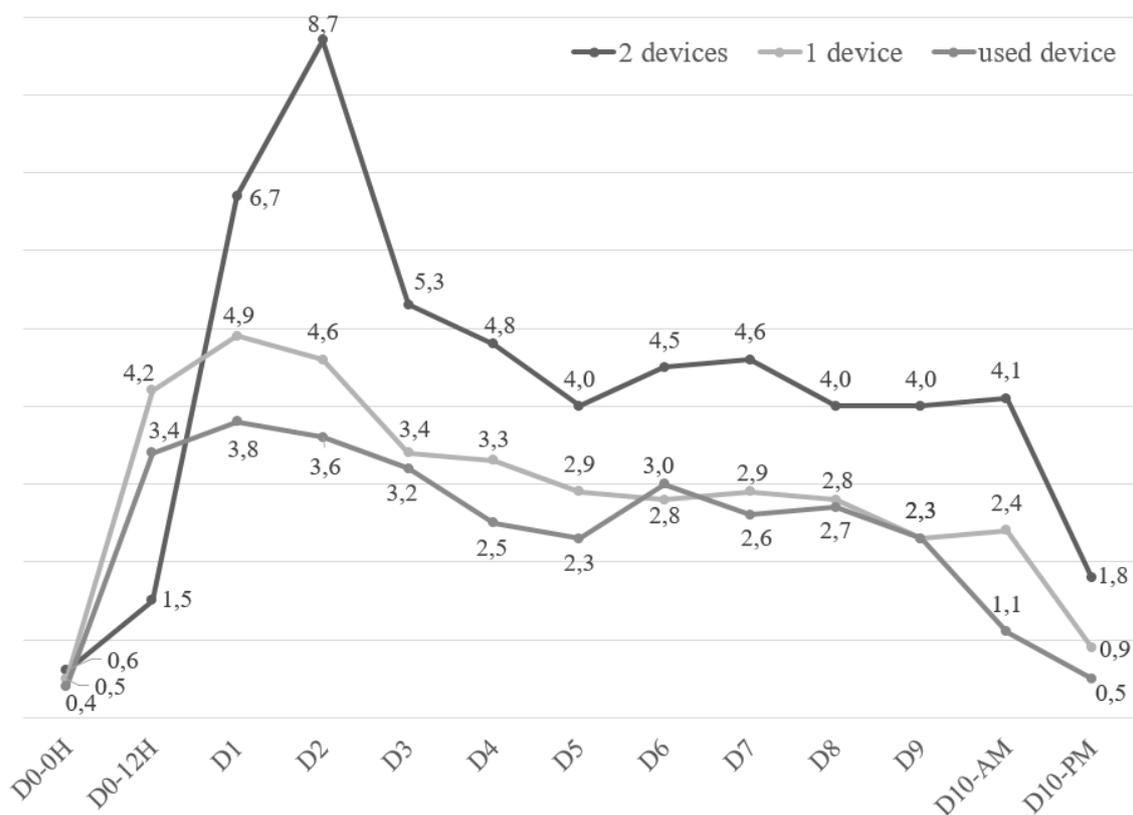


Figure 1. Serum progesterone (P4) concentration in mares with intravaginal P4 device; D0-0H: Serum progesterone (P4) concentration before device insertion; D0-12H: Serum P4 concentration 12 hours after P4 insertion; D1: serum P4 concentration at the first day (day 1) of device presence; D2 (pm): serum P4 concentration at the second day (day 2) of device presence; D10-AM: serum P4 concentration assessed during the morning of the tenth day (day 10) of the device insertion; D10-PM: P4 concentration assessed 12 hours after P4 device removal.

It is also noted in Fig. 1 that serum P4 levels remained relatively similar in mares that received one implant (new or used) throughout the experimental period. Additionally, until the end of P4 treatment (D10-AM), the serum P4 concentrations reached values above the minimum necessary to avoid ovulation, in the three mares of the experiment. According to Nett *et al.* (1976), a minimum circulating concentration of 2 ng/ml of P4 is needed so that ovulation does not occur during the period of permanence of P4 devices in mares. Because P4 exerts a negative feedback effect on the hypothalamic-pituitary axis and blockage of the cyclic LH release from the anterior pituitary, it suppresses estrus behavior of mares if plasma P4 concentrations exceed 1 to 2ng/mL (Aurich and Kaps, 2022). During the

whole period of device permanence, serum P4 levels lower than 1 ng/ml were not observed in any of the three mares. Therefore, all treatments used in the present study (two new implants, one new implant or one used implant) seem to be possible options to prevent mares from ovulating while remaining intravaginally inserted, up to 10 days in the animals, although further studies (with a larger number of animals) are needed to confirm these findings.

Finally, as described above, it is important to emphasize the possibility of the maintenance of serum P4 concentrations, sufficient to maintain the ovulation blockade, with the use of a second-use implant. Considering the cost of hormonal

protocols and the number of mares used in embryo transfer programs, the possibility of reusing the P4 devices may be an interesting alternative. However, future studies must be carried out with a larger number of animals and further reproductive investigations to establish the correct conditions for reutilization of the devices without affecting reproductive rates.

to differ according to the number of inserted devices. Still, all treatments (two new P4 devices, one new P4 device or one used P4 device) reached serum P4 concentrations compatible with promoting ovulation blockade. Hence, the use of used P4 devices may be recommended if further investigated in future studies.

Serum P4 concentrations of mares receiving different amounts of intravaginal P4 devices seem

Keywords: mare, ovulation blockade, P4 device, serum dosage

### RESUMO

*O objetivo foi descrever os níveis séricos de progesterona (P4) de éguas tratadas com um ou dois dispositivos intravaginais de primeiro uso e com um dispositivo de segundo uso de P4, em um período de 10 dias e comparar a concentração de P4. Três éguas foram tratadas com implante intravaginal de P4 (Reprosync®; 2g de P4) por 10 dias (D0 a D10). A égua 1 recebeu dois implantes novos, a égua 2 recebeu um implante novo e a égua 3 recebeu um implante usado de P4. Coletas de sangue foram realizadas diariamente (a.m./p.m.) do D0 ao D10 e concentrações de P4 foram analisadas por quimioluminescência. A égua que recebeu dois dispositivos apresentou numericamente maior concentração sérica média de P4 ( $5,11 \pm 2,24 \text{ ng/mL}$ ) do que a égua que recebeu um dispositivo novo ( $3,27 \pm 0,94$ ) e do que a égua que recebeu um dispositivo usado ( $2,78 \pm 0,72$ ). As éguas que receberam um dispositivo (novo ou usado) tiveram médias de P4 relativamente semelhantes numericamente. Concluiu-se que a concentração sérica de P4 de éguas recebendo diferentes quantidades de dispositivos intravaginais de P4 parece diferir de acordo com o número de implantes inseridos. Ainda assim, todos os tratamentos atingiram concentrações séricas de P4 capazes de bloquear a ovulação.*

*Palavras-chave: bloqueio de ovulação, dispositivo de progesterona, dosagem sérica, éguas*

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas) for the partnership and allowing the use of farm facilities, the company GlobalGen vet Science for supplying the hormones and the Coordination of Superior Level Staff Improvement (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Brazil) for the PhD Degree Grant of Ana Carolina Bahia Teixeira.

## REFERENCES

- AURICH, C.; KAPS, M. Suppression of reproductive behaviour and gonadal function in female horses - an update. *Reprod. Domest. Anim.*, v.4, p.4-12, 2022.
- BISINOTTO, R.S.; CASTRO, L.O.; PANSANI, M.B. *et al.* Progesterone supplementation to lactating dairy cows without a corpus luteum at initiation of the Ovsynch protocol. *J. Dairy Sci.*, v.98, p.2515-2528, 2015.
- BRUNTON, L.L.; PARKER, K.L. *Manual of pharmacology and therapeutics*. 2.ed. Chicago: McGraw-Hill, 2008. p.1254.
- CARROLL, C.L.; HUNTINGTON, P.J. Body condition scoring and weight estimation of horses. *Equine Vet. J.*, v.20, p.41-45, 1988.
- CORLETA, V.E.; CAPP, E.; FERREIRA, M.B.C. Pharmacokinetics of natural progesterone vaginal suppository. *Gynecol. Obstet. Invest.*, v.58, p.105-108, 2004.
- FARIA, D.R.; GRADELA, A. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.34, p.114-122, 2010.
- FAZIO, E.; SANTO, F.; FERLAZZO, A. *et al.* Progesterone, estradiol-17 $\beta$ , cortisol and haematological profile during the estrous cycle of lactating jennies: preliminary and comparative observations. *J. Equine Vet. Sci.*, v.56, p.26-34, 2017.
- FEDORKA, C.E.; BALL, B.A.; WALKER, O.F. *et al.* Alteration of the mare's immune system by the synthetic progestin, altrenogest. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.82, p.1-11, 2019.
- GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Seasonal influence on equine follicle dynamics. *Anim. Reprod.*, v.1, p.31-44, 2004.
- HANDLER, J.; SCHÖNLIEB, S.; HOPPEN, H.; AURICH, C. Seasonal effects on attempts to synchronize estrus and ovulation by intravaginal application of progesterone-releasing device (PRIDTM) in mares. *Theriogenology*, v.65, p.1145-1158, 2006.
- HANLON, D.W.; FIRTH, E.C. The reproductive performance of Thoroughbred mares treated with intravaginal progesterone at the start of the breeding season. *Theriogenology*, v.77, p.952-958, 2012.
- LAVY, E.; STEINMAN, A.; SOBACK, S. Oral controlled-release formulation in veterinary medicine. *Crit. Rev. Drug Carrier Syst.*, v.23, p.165-204, 2006.
- NEGRETTI, C.; EDMONDS, J.; KUTZLER, M.A. Effects of long-acting injectable progesterone given two days after luteolysis on estrus suppression in mares. *J. Vet. Sci. Anim. Husband.*, v.6, p.1-6, 2018.
- NETT, T.M.; PICKETT, B.W.; SEIDEL, G.E. *et al.* Levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrous cycle and early pregnancy in mares. *Biol. Reprod.*, v.14, p.412-415, 1976.
- OLIVEIRA, D.A.M.; KOZICKI, L.E.; GAIEVSKI, F.R. *et al.* Resynchronization of ovulation with new and reused intravaginal progesterone-releasing devices without previous pregnancy diagnosis in *Bos taurus indicus* cows subjected to timed-artificial insemination. *Reprod. Domest. Anim.*, v.54, p.779-785, 2019.
- PIETTE, P. The history of natural progesterone, the never-ending story. *Climacteric*, v.21, p.308-314, 2018.
- PINTO, C.R.; BURNS, P.J.; WHISNANT, S. Effects of single estradiol administration on follicular dynamics and luteal function of cyclic mares. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 6., 2004, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: ISEET, 2004. p.92-94. (Abstract).
- POHL, O.; BUFF, S.; GARNIER, F. *et al.* Pharmacokinetic analysis during intravaginal progesterone-releasing devices (PRID®/CIDR®) application in the mare. *Pferdeheilkd.*, v.25, p.105-110, 2009.
- POLASEK, T.C.M.; KOZICKI, L.E.; PEDROSA, V.B. *et al.* Impact of a progesterone-releasing intravaginal device and inflammatory reaction on ovarian activity in embryo- recipient anestrous mares. *Theriogenology*, v.90, p.175-184, 2017.

- POLO, G.; LIMA, L.G.F.; KOZICKI, L.E. *et al.* Two administrations of an intravaginal progesterone device on the induction of ovarian cyclicity in anestrus mares. *Pferdeheilkunde*, v.32, p.217-222, 2016.
- ROTHEN-WEINHOLD, A.; DAHN, M.; GURNY, R. Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. *Pharm. Sci. Technol. Today*, v.3, p.222-231, 2000.
- RUTTEN, D.R.; CHAFFAUX, S.; VALON, M. *et al.* Progesterone therapy in mares with abnormal oestrous cycles. *Vet. Rec.*, v.119, p.569-571, 1986.
- SATUÉ, K.; GARDÓN, J.C. A review of the estrous cycle and the neuroendocrine mechanisms in the mare. *J. Steroids Horm. Sci.*, v.4, p.1-11, 2013.
- SEGABINAZZI, L.G.T.M.; ANDRADE, L.R.P.J.; ALVARENGA, M.A. *et al.* Use of intravaginal progesterone-releasing device results in similar pregnancy rates and losses to long-acting progesterone to synchronize acyclic embryo recipient mares. *Vet. Sci.*, v.8, p.1-14, 2021.
- SILVA, L.O.; VALENZA, A.; ALVES, R.L.O.R. *et al.* Progesterone release profile and follicular development in Holstein cows receiving intravaginal progesterone devices. *Theriogenology*, v.172, p.207-215, 2021.
- TEIXEIRA, A.C.B.; RIVEROS, J.A.N.; DINIZ, J.H.W. *et al.* Intravaginal progesterone device (1,9g) and estradiol benzoate for follicular control in the mare during spring and summer. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.73, p.771-780, 2021.
- TEIXEIRA, A.C.B.; VALLE, G.R.; RIVEROS, J.A.N. *et al.* Effects of equine chorionic gonadotropin on ovulatory and luteal characteristics of mares submitted to an P4-based protocol of ovulation induction with hCG. *J. Equine Vet. Sci.*, v.94, p.1-9, 2020.
- VASCONCELOS, J.L.M.; PEREIRA, M.H.C.; WILTBANK, M.C. *et al.* Fertility of programs using E2/P4 for FTAI in dairy cattle. *Anim. Reprod.*, v.15, p.940-951, 2018.
- VILLANUEVA, B.; CASPER, R.F.; YEN, S.S.C. Intravaginal administration of progesterone: enhanced absorption after estrogen treatment. *Fertil. Steril.*, v.35, p.433-437, 1981