

RAFAEL GUEDES GORETTI

**COLHEITA DE EMBRIÕES EQUINOS 48 H APÓS A APLICAÇÃO DE
LUTEOLÍTICO: PARÂMETROS REPRODUTIVOS, CONCENTRAÇÃO
SÉRICA DE PROGESTERONA E DE PROTEÍNAS DO FLUIDO UTERINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2005

Às pessoas que mais amo.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, em especial aos Departamentos de Veterinária e Zootecnia e ao Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários que propiciaram a realização dos testes laboratoriais deste estudo.

Aos proprietários do Haras Três Corações e Haras São João, Ronaldo Ribeiro Tavares e Francisco Anízio Gardingo, que cederam os animais para realização deste estudo, e aos funcionários.

À professora Maria Cristina Baracat e ao professor Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo pelos ensinamentos.

Ao meu orientador, José Domingos Guimarães, por acreditar e apoiar o andamento de todos os trabalhos desta tese.

Aos estagiários, pelo incentivo e amizade, em especial ao Tiago.

Aos meus amigos da República onde morei em Viçosa durante toda a graduação (Valdomiro, Fred, Guilherme, Cristiano, Gabriel, Vítor).

Aos amigos e amigas da turma de Medicina Veterinária de 1998, em especial Herbert, Gustavo, Alexandre e Renato, e muitos outros dentro da Universidade.

Aos amigos que como eu dedicam boa parte de suas vidas aos cavalos (Edílson, Alexandre e Gustavo).

Aos meus pais, Eduardo e Cláudia, pelos conselhos, interesse e apoio incondicional, e à minha irmã Laura.

À Camilla, companheira incansável que tanto amo, parte fundamental de todas as conquistas recentes de minha vida.

ÍNDICE

	Páginas
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Ciclo estral na égua	1
2. Desenvolvimento embrionário inicial	2
3. Secreções uterinas	4
4. Útero e Corpo Lúteo	6
5. Progesterona	8
6. Prostaglandina F ₂	9
.....	
CAPÍTULO I	
Concentração de proteínas solúveis do fluido uterino e parâmetros reprodutivos de éguas da raça mangalarga marchador prenhas e não prenhas.....	10
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Animais e colheita de fluido uterino	13
2.2. Avaliação uterina e cervical	14
2.3. Determinação da concentração protéica	16
2.3.1. Preparo dos reagentes para o Teste do Ácido Bicinonínico	16
2.3.2. Preparo da curva padrão e determinação da concentração protéica	17
2.4. Análise estatística	17
3. RESULTADOS	18
4. DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÃO	22

CAPÍTULO II	
Colheita de embriões eqüinos 48 h após aplicação de luteolítico: concentração de proteínas solúveis do fluido uterino e de progesterona sérica, período interovulatório, qualidade e recuperação embrionárias e taxa de prenhez em éguas receptoras	23
RESUMO	23
ABSTRACT	24
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1. Animais	27
2.2. Colheita de fluido uterino e determinação da concentração protéica	28
2.3. Concentração de progesterona	28
2.4. Período interovulatório	28
2.5. Diagnóstico de gestação	28
2.6. Qualidade embrionária.....	29
2.7. Éguas receptoras	29
2.8. Análise estatística.....	29
3. RESULTADOS	30
4. DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÃO	34
CONCLUSÕES GERAIS	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

RESUMO

GORETTI, Rafael Guedes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2005.
Colheita de embriões eqüinos 48 h após a aplicação de luteolítico: parâmetros reprodutivos, concentração sérica de progesterona e de proteínas do fluido uterino. Orientador: José Domingos Guimarães. Conselheiros: Eduardo Paulino da Costa e Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo.

O objetivo deste estudo foi determinar a concentração de proteínas do fluido uterino de éguas prenhas e não prenhas, bem como registrar as características da palpação retal e ultra-sonografia do útero, cérvix e corpo lúteo (Capítulo I). Também se objetivou verificar a viabilidade embrionária e o período interovulatório de éguas doadoras de embriões eqüinos, 48 h após a aplicação de luteolítico (Lutalyse Upjohn®, Capítulo II). Doze éguas doadoras de embriões, totalizando 24 ciclos estrais, tiveram amostragem de fluido uterino no dia da colheita do embrião (dia 8 e 9 do ciclo estral) e, posteriormente, estas foram submetidas ao teste do Ácido Bicinconínico para determinação da concentração de proteínas solúveis. A presença de embrião no lavado uterino diferenciou éguas prenhas de não prenhas. Características ultra-sonográficas e da palpação do útero, da cérvix e do corpo lúteo foram registradas no dia da colheita do embrião para determinar suas correlações com a presença ou ausência do embrião. A taxa de recuperação embrionária foi de 58,3 %. A concentração de proteínas do fluido uterino de éguas prenhas foi de $36,0 \pm 22,04$ g/mL e de éguas não prenhas de $42,27 \pm 19,71$ g/mL, não sendo observada diferença entre os animais dos grupos experimentais ($P > 0,05$). Não houve diferença ($P > 0,05$) entre éguas prenhas e não prenhas quanto a ecogenicidade uterina e do corpo lúteo, o diâmetro do corpo lúteo, o tônus uterino e o tônus cervical no dia da colheita do embrião. No Capítulo II, vinte ciclos estrais de dez éguas diferentes foram utilizados. No primeiro ciclo as éguas foram

submetidas ao protocolo normal de transferência de embriões (grupo controle), com aplicação de luteolítico no dia da colheita do embrião. No segundo ciclo estral, o luteolítico foi aplicado 48 h antes da colheita do embrião (grupo tratado). Quando comparadas éguas tratadas com luteolítico 48 h antes da colheita do embrião com as éguas do grupo controle, não foi registrada diferença ($P>0,05$) na taxa de recuperação embrionária, prenhez das éguas receptoras, qualidade embrionária, concentração de proteínas no fluido uterino e intervalo luteolítico-ovulação. No grupo controle observou-se 80% de lavados positivos, sendo obtidas sete prenhez nas éguas receptoras (87,5%). No grupo tratado com luteolítico 48 h antes da colheita do embrião foram colheitados sete embriões (70% de recuperação), com seis prenhez nas éguas receptoras (85,7%). A concentração média de progesterona sérica só foi determinada para o grupo tratado com luteolítico 48 h antes da colheita do embrião, sendo de $13,86\pm 5,42$ ng/mL no dia da aplicação do luteolítico, decrescendo para $0,46\pm 0,25$ ng/mL no dia da colheita do embrião, existindo diferenças entre os animais dos grupos experimentais ($P<0,05$). A concentração de proteínas solúveis do fluido uterino dos animais do grupo tratado foi de $37,77\pm 9,87$ g/mL e nos do grupo controle $33,5\pm 15,48$ g/mL. O período interovulatório diferiu entre os grupos experimentais ($P<0,05$), com a ovulação no grupo controle ocorrendo, em média, 18,5 dias e, no grupo tratado, 15,9 dias após a aplicação do luteolítico. A interação materno-fetal nos dias 8 e 9 pós-ovulação não foi suficientemente forte para gerar modificações significativas entre as características de palpação retal e ultra-sonográficas estudadas de éguas prenhas e não prenhas. A análise da concentração de proteínas solúveis do fluido uterino é influenciada por diversos fatores que não somente a presença do embrião, sendo esta bastante variável e não eficaz para determinação indireta de condições viáveis para a manutenção da gestação. A aplicação de luteolítico 48 h antes da colheita e transferência de embriões mostrou-se uma técnica viável, propiciando período interovulatório menor e, conseqüentemente, maior número de estros da égua doadora por estação reprodutiva. Os embriões eqüinos mantêm sua viabilidade 48 h após a aplicação de luteolítico, sendo resistentes à queda na concentração de progesterona por este período.

ABSTRACT

GORETTI, Rafael Guedes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, May, 2005.

Equine embryo collection 48 h after luteolitic application: reproductive parameters, concentration of serum progesterone and uterine fluid proteins. Adviser: José Domingos Guimarães. Committee Members: Eduardo Paulino da Costa and Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo.

The aim of the present study was determine the soluble uterine fluid protein concentration of Mangalarga Marchador pregnant and non pregnant mares, at the embryo collection day, and correlate those with ultrasonic and palpable characteristics of the female genital tract (Chapter I). Was still studied the relation between serum progesterone concentration and soluble protein in uterine fluid concentration, analyzing the embryo recovery rate and quality and the pregnancy rate in recipient mares of embryos collected 48 h after luteolitic application. The interovulatory period and the luteolitic-ovulation interval were also observed (Chapter II). Twenty four estrous cycles of 12 embryo donors' mares had a small amount of uterine fluid harvested at the embryo collection day (day 8 and 9 of the estrous cycle) which was submitted to the Bicinchoninic Acid Test. Ultra-sonographic and palpable characteristics of the uterus, cervix and corpus luteum were studied to establish correlations with pregnant and non pregnant mares. The presence of an embryo in the uterine flushing differentiated pregnant of non pregnant mares. The embryo recovery rate was 58.3 %. The mean protein concentration of uterine fluid of pregnant mares was 36.0 ± 22.04 g/mL and of non pregnant mares 42.27 ± 19.71 g/mL, with no difference between groups ($p > 0.05$). Additionally, no difference was observed between groups for uterine and corpus luteum ecogenicity, corpus luteum diameter and cervix and uterine tonus. In Chapter II, twenty estrous cycles of ten mares were monitored. Standard protocol of equine embryo transfer was applied to the first estrous cycle (luteolitic application at the day of embryo transfer, control group). In the second estrous cycle, luteolitic application was performed 48 h before embryo transfer (treated group). No difference ($p > 0.05$) was observed in recovery rate, pregnancy in the recipient mare, embryo quality, protein concentration in uterine fluid and luteolitic-ovulation interval. In the control mares 80% of positive uterine flushes were observed, with seven pregnancies in recipient mares (87.5 %). In the treated animals the recovery rate was 70 %, with six pregnant recipient

mares (85.7 %). The serum progesterone concentration was only determined for the treated group, being 13.86 ± 5.42 ng/mL in the day of luteolitic application (48 h before embryo collection), decreasing to 0.46 ± 0.25 ng/mL on the day of embryo collection ($p < 0.05$). The uterine protein fluid concentration in the treated animals was 37.77 ± 9.87 g/mL and in the control ones 33.5 ± 15.48 g/mL ($p > 0.05$). The interovulatory period was 18.5 days in the control mares and 25.9 in the treated ones, showing difference between themselves ($p < 0.05$). Fetal-maternal interaction at days 8 and 9 after ovulation is not strong enough to change the parameters studied between pregnant and non pregnant mares. Many factors influence the soluble uterine protein concentration besides the embryo presence, which turns it into a very variable and inefficient parameter to determine viable conditions to embryo development. The smaller interovulatory period was due to the anticipation of luteolitic application, allowing two more estrous cycles per donor mare per reproduction season. A viable embryo 48 h after luteolitic application shows the uterine capacity to keep favorable conditions for embryo development.

INTRODUÇÃO GERAL

Os eqüinos apresentam importância crescente no agronegócio, observando-se grandes avanços nos estudos de reprodução, desde o processo de inseminação artificial até técnicas de última geração como a bipartição de embriões e a clonagem. Neste sentido, diferentes trabalhos de pesquisa são desenvolvidos para maximizar a produção de potros de alto valor zootécnico, além de propiciar melhor entendimento dos processos fisiológicos e patológicos que envolvem os fenômenos da reprodução.

1. Ciclo estral na égua

As éguas apresentam, em média, ciclo estral de 21 dias e são animais sazonais de dia longos, ou seja, os eventos relacionados à reprodução ocorrem durante a primavera e o verão. Apresentam duas fases distintas durante o ciclo estral: o diestro, onde está presente corpo lúteo funcional e elevadas concentrações de progesterona, e o estro, no qual o estrógeno folicular predomina e ocorre receptividade sexual. O estro dura de 5 a 7 dias, com a ovulação ocorrendo de 24 a 48 h antes do final do estro (15).

Durante o ciclo estral vários folículos iniciam seu crescimento em diferentes ondas foliculares moduladas por crescentes concentrações de FSH, mas normalmente só ocorre uma ovulação. Uma ou duas ondas foliculares são observadas durante o ciclo estral da égua (29). Estas são ditas como maiores, quando os folículos desenvolvem até atingir o tamanho de folículo pré-ovulatório, ou menores, quando não atingem este tamanho. A primeira onda começa no início do ciclo, levando a formação de um grande folículo anovulatório ou uma ovulação de diestro ou ainda a regressão de todos os

folículos em crescimento (29, 44). Uma segunda onda ovulatória aparece no meio do diestro em resposta a elevação da concentração de FSH. Esta onda, após o processo de seleção do folículo dominante, culmina, em geral, com uma só ovulação. Este controle da foliculogênese depende de interações dos hormônios gonadotróficos, FSH e LH, e também de fatores ovarianos como estrógeno, progesterona, citocinas e fatores de crescimento (19). De acordo com o número e o tamanho dos folículos nos ovários da égua no dia da aplicação do luteolítico, o tempo até a ovulação subsequente pode ser maior ou menor. Em geral, a presença de grandes folículos diminui o tempo até a ovulação por alterar rapidamente a relação estrógeno-progesterona (intervalo luteolítico-ovulação).

2. Desenvolvimento embrionário inicial

A perda embrionária precoce é uma causa importante de decréscimo de fertilidade em éguas (25, 26, 30, 71, 76). Diferentes processos podem estar envolvidos, como a fertilização, o desenvolvimento inicial e reconhecimento materno da gestação. O diagnóstico exato do mecanismo envolvido é difícil. São registradas altas taxas de fertilização (6, 17), mas o desenvolvimento embrionário posterior depende de proteínas e RNAs herdados dos gametas, principalmente antes da expressão gênica própria, e da interação com a tuba uterina e o útero (8, 23). Quando as colheitas de embriões são realizadas do 6º ao 10º dia pós-ovulação a qualidade embrionária pode ser avaliada (62), observando-se alterações morfológicas com auxílio de microscópio estereoscópico. De acordo com a severidade e a porção embrionária afetada, maior ou menor comprometimento da fertilidade pode ser esperado.

Após o encontro do espermatozóide capacitado com o ovócito maduro, diversas alterações nestes se iniciam e culminam com a união dos pró-núcleos masculino e feminino, bem como a multiplicação das células embrionárias. Esta etapa ocorre na tuba uterina. Intermediando a passagem do embrião da tuba uterina para o útero encontra-se a papila útero-tubárica, sendo esta constituída de músculo liso. Embriões eqüinos só adentram o útero ao redor de 5,5 dias de vida (22) e os ovócitos não fertilizados são retidos na tuba uterina ou caem no útero em ciclos posteriores. Esta é a primeira etapa do reconhecimento materno da gestação. Papel importante neste

processo de seleção de ovócitos não fertilizados pela tuba uterina é exercido pela PGE₂ secretada pelo próprio embrião, visto que a infusão contínua na tuba uterina de PGE₂ exógena acelera o transporte do embrião (72).

A manutenção da gestação na égua é dependente da interação materno fetal. Ainda na tuba uterina são mencionados fatores imunossupressores relacionados à presença e desenvolvimento do embrião (50). Estudos com outras espécies demonstraram parada no desenvolvimento embrionário no estágio de blastocisto inicial quando os embriões foram mantidos na tuba uterina (14). Além de uma capacidade inerente de desenvolvimento (54), fica demonstrada a necessidade da interação com o meio para o desenvolvimento embrionário.

O desenvolvimento embrionário inicial depende de sua perfeita interação com o ambiente uterino. No útero ocorrem interações materno-fetais responsáveis pelo do bloqueio da luteólise e a manutenção da gestação. Esta é a terceira etapa do reconhecimento materno da gestação. A migração do embrião dentro do útero, passando várias vezes por dia por toda a extensão dos cornos e do corpo, está envolvida neste processo (48).

A formação de uma unidade materno-fetal coesa inicia-se na égua próximo do 37º dia da gestação, com a formação dos cálices endometriais (21). Enquanto o embrião permanece livre no útero, além dos nutrientes armazenados no saco vitelino, sugere-se que as secreções uterinas sejam a principal fonte nutricional para o embrião (13, 47).

Ao entrar no lúmen uterino, o embrião eqüino encontra-se na fase de mórula, com diâmetro variando de 0,132 a 0,380 mm. Ao entrar em contato com o ambiente uterino, o embrião apresenta crescimento rápido e aumenta o seu tamanho várias vezes em pouco tempo. No dia 8 de seu desenvolvimento já possui aproximadamente 1,368 mm e está no estágio de blastocisto expandido (62).

O embrião eqüino está envolto pela cápsula embrionária até o dia 22 da gestação. Neste momento, apesar de fixo, ainda não existe conexão direta entre o embrião e o útero. Algumas proteínas do fluido uterino se associam a esta cápsula e são responsabilizadas pela nutrição do embrião ou fazem parte desta membrana envoltória, sendo uma delas denominada P19 (66).

3. Secreções uterinas

As secreções uterinas são moduladas pelo quadro endócrino da égua. Os hormônios de influência direta no útero são a progesterona e o estrógeno. Basicamente, o estrógeno gera aumento do fluxo sanguíneo e das defesas uterinas. Já a progesterona em condições fisiológicas gera um quadro de imunomodulação local compatível com o estabelecimento da gestação. A aplicação de progesterona exógena em vacas influencia o total de proteínas no fluido uterino (2) e aumenta o tamanho do embrião (24). Já o excesso de progesterona pode causar decréscimo na taxa de fertilidade em novilhas submetidas a protocolo de superovulação com eCG (53).

Diversas substâncias presentes no fluido uterino ou metabolizadas pelo embrião motivaram estudos científicos (ex: proteínas, glicose). Diferentes autores estudaram as proteínas presentes no fluido uterino (13, 18, 42, 67, 74, 79). Estas proteínas parecem trabalhar como enzimas ou como carreadoras de hormônios, vitaminas e minerais. Importância deve ser dada não somente ao total de proteínas presentes no útero, mas também ao perfil protéico e sua relação temporal com o desenvolvimento embrionário.

Diferenças foram relatadas entre éguas prenhas e não prenhas quanto à concentração total de proteínas do fluido uterino, com pico nas éguas não prenhas no dia 12 (23 mg/lavado), enquanto nas prenhas observou-se decréscimo de 25% do dia 8 ao 14 seguido de aumento gradativo até o dia 20 do ciclo estral (25 mg/lavado) (79). No dia 8 pós-ovulação foi observada 16,4 mg/mL de proteínas no fluido uterino tanto em éguas prenhas como em não prenhas (79). Comparações foram feitas entre éguas em estro e pós-parto, demonstrando maiores concentrações protéicas em éguas recém-paridas, mas concluiu-se que a presença de lóquio ou a migração de leucócitos para o local devido à inflamação foram fatores determinantes para as diferenças encontradas (42).

Relacionando-se a produção protéica uterina entre o estro e o diestro, observou-se que as concentrações são maiores durante o diestro. A concentração média de proteínas uterinas em éguas durante todo o ciclo estral foi de 29,3 mg/mL. A mais baixa concentração foi registrada nos dias 7 e 19 (27,0 e 24,8 mg/mL, respectivamente), enquanto a mais alta no dia 13 (38,8 mg/mL) (18). Outros estudos registraram 34,5 mg/mL em éguas durante os dias 2, 3 ou 4 do estro (67).

Após receberem três diferentes doses de progesterona exógena (0, 100 e 200 mg/dose/dia) por sete dias consecutivos, éguas ovariectomizadas foram submetidas a lavados uterinos e foi determinada a concentração protéica do fluido uterino recuperado. A concentração de proteína registrada foi de $58,3 \pm 34,2$, $66,3 \pm 28,4$ e $85,0 \pm 15,2$ mg/mL, respectivamente, sendo observada diferença entre os grupos. Após submeter embriões a incubação *in vitro* com as amostras recuperadas dos diferentes grupos, estes autores concluíram que a adição de fluido uterino proveniente de éguas com altas concentrações séricas de progesterona à cultura embrionária aumenta o metabolismo dos embriões (13).

Diferenças qualitativas das proteínas presentes no fluido uterino de éguas durante o ciclo estral podem ser observadas, principalmente quanto às enzimas (78). A atividade da fosfatase ácida foi maior na metade final do diestro. O mesmo ocorrendo para a leucina aminopeptidase (78). Diferentes picos foram identificados após separação por cromatografia em gel, sendo observadas diferenças quanto ao dia do ciclo e a magnitude dos picos com mais ou menos de 170.000 daltons, sendo as proteínas com mais de 170.000 daltons são mais encontradas nos dias 12 e 14 pós-ovulação. Além disso, foram observadas similaridades destes picos com os padrões protéicos do plasma sanguíneo (78).

Após aplicação de progesterona exógena em éguas por sete dias, o fluido uterino foi colheitado e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida. Três proteínas principais foram isoladas, com pesos moleculares de 6.000, 16.000 e 20.000 (9), mas nenhuma delas foi encontrada sete dias após a aplicação de progesterona. A primeira mostrou homologia com a uteroglobina e a segunda com a fosfolipase A2. A terceira e mais importante, a proteína de peso molecular 20.000 cuja produção é induzida pela progesterona (PIP-20), mostrou homologia com a proteína P19 presente na cápsula dos embriões eqüinos (66). Após incubação *in vitro* de embriões com meio controle e meio adicionado de PIP-20, não foi observada diferença estatística entre os animais dos grupos experimentais com relação ao desenvolvimento embrionário. Os autores sugeriram que o fato destas proteínas serem registradas somente após a aplicação de progesterona indica que estão envolvidas no desenvolvimento embrionário, mas a PIP-20 sozinha não amplifica o crescimento embrionário ou seu metabolismo (9).

Diferenças foram observadas quanto ao perfil protéico determinado em amostras de endométrio cultivadas *in vitro*. Três grupos foram identificados por

produzirem padrões similares de proteínas. O primeiro grupo consiste em éguas em anestro, ovariectomizadas, em transição ou em estro. O segundo é formado por éguas de 12 a 16 dias do diestro ou de 12 a 18 dias de prenhez e o terceiro grupo de 39 a 100 dias de prenhez (46). Neste mesmo estudo, foram observadas diferenças quanto ao padrão protéico produzido por embriões cultivados *in vitro*, sendo um marco diferencial o dia 14 do ciclo estral.

Após estudo comparando éguas jovens com velhas e éguas paridas com éguas solteiras não foi registrada diferença estatística entre a concentração total de proteínas uterinas ou de albumina durante o estro, embora seja observada grande variação entre os indivíduos. Após separação de bandas por eletroforese (SDS-PAGE) e nova comparação de bandas específicas (peso molecular de 60 a 71 kDa), as éguas jovens apresentaram concentrações maiores destas proteínas que éguas velhas. Grande similaridade foi determinada entre as bandas obtidas do fluido uterino e do soro sanguíneo, mas este último registrou concentrações aproximadamente 50% maiores (67).

A concentração de aminoácidos presentes no fluido uterino foi determinada. A glicina e a alanina foram os aminoácidos predominantes, com pico de concentração no dia 17 do ciclo estral (18).

4. Útero e Corpo Lúteo

A ecotextura uterina, visualizada por meio de ultra-sonografia, esta intimamente relacionada às concentrações hormonais da égua (31, 55). Durante a fase estrogênica são observadas dobras endometriais, conseqüência do edema presente no endométrio. Estas são hipocogênicas, ou seja, refletem pouco as ondas lançadas pelo aparelho. Já durante o diestro, o útero apresenta-se mais denso ao exame ultra-sonográfico (hiperecótico), conseqüência de maior justaposição dos constituintes da parede uterina, ou seja, menor edema (14, 34, 55).

Em éguas prenhas foi observada queda gradual da presença de dobras endometriais que atingiram níveis de diestro no dia 3 pós-ovulação e assim permaneceram até o dia 12. Padrões irregulares foram observados entre os dias 14 e 15 e entre os dias 22 e 25 pós-ovulação. Já em éguas não prenhas, padrão similar foi

observado até o dia 12 pós-ovulação, onde aumento gradual das dobras endometriais foi observado devido ao retorno ao estro (34).

Em pôneis, a fase de maior mobilidade do embrião vai do 11° ao 14° dia pós-ovulação (43), ocorrendo a fixação da vesícula aproximadamente no dia 15 (27, 33). Alta contratilidade uterina, monitorada via ultra-som, acontece nesta fase antes da fixação (33), provavelmente devido à liberação por parte do concepto de substâncias mioativas como estrógenos e prostaglandinas (27). Ao avaliar a resposta uterina à restrição da mobilidade embrionária via cirurgia em relação ao diâmetro dos cornos, presença de dobras endometriais e aumento da contratilidade foram observados nas porções expostas ao embrião (32).

O útero de éguas prenhas e não-prenhas sofre aumento gradual de sua consistência do dia 0 ao 6 do ciclo estral. Autores observaram pequena queda do 6° ao 10° dia, seguido por aumento gradual do tônus em éguas prenhas até o dia 25. Em éguas não prenhas observa-se aumento até o 13° dia e posterior queda progressiva até níveis similares ao dia 0 do ciclo estral (12, 35). Relação temporal entre o diâmetro dos cornos uterinos e registros de tônus uterino em éguas prenhas e em diestro indica que o grau de contração do endométrio e a ausência de edema estão relacionados com o aumento do tônus uterino (34). Acompanhando o aumento do tônus uterino observa-se o aumento do tônus cervical, necessário para o isolamento do ambiente uterino saudável do ambiente vaginal, que possui flora microbiológica diversificada.

A ecogenicidade e o diâmetro do corpo lúteo variam de acordo com o dia do ciclo estral. Em média, grande ecogenicidade é observada nos primeiros 6 dias e no final do diestro. O tamanho máximo do corpo lúteo é observado durante o meio da fase luteínica, quando há maior produção de progesterona (50).

As características da palpação retal e ultra-sonografia do útero e da cérvix de éguas em diestro estão diretamente correlacionadas com a concentração de progesterona. Acredita-se que altas concentrações de progesterona aumentam a fertilidade, mas estudo com éguas receptoras de embriões determinou que as concentrações de progesterona não foram diferentes em éguas que mantiveram ou perderam os embriões inovulados (45).

5. Progesterona

A progesterona é o hormônio responsável pela manutenção da gestação. É produzida pelo corpo lúteo e comanda a secreção do fluido uterino. Nos cornos e no corpo uterinos são encontradas as maiores concentrações de receptores para progesterona (57). É por meio destes receptores que a progesterona promove uma secreção favorável ao desenvolvimento do embrião. A concentração de progesterona necessária para a manutenção da gestação é bastante variável (5) e interfere no metabolismo embrionário, provavelmente por meio da produção de proteínas pelo útero (13, 39).

A aplicação de luteolítico interrompe de forma abrupta a produção de progesterona, que decresce a concentrações indetectáveis em três dias. Apesar disto, é observado crescimento embrionário por vários dias (relato de até 14 dias) (40). Caso seja feita suplementação de progesterona até quatro dias após a aplicação de luteolítico, ainda é possível o desenvolvimento de uma gestação normal (40). Fato importante a ser considerado é o tônus cervical, visto que o embrião, apesar de viável, pode ser expulso por uma cérvix aberta. Este fato foi observado em casos de perda embrionária precoce (25) e após aplicação de luteolítico (40). Perdas embrionárias em receptoras foram registradas quando concentrações séricas de progesterona ficaram abaixo de 2 ng/mL (59). Já em éguas ovariectomizadas foram observadas perdas embrionárias quando as concentrações séricas de progesterona ficaram menores que 2,56 ng/mL (49). A concentração normal de progesterona nos dias 8 e 9 do diestro é de 13,9 ng/mL e no final do estro de 0,3 ng/mL (64).

Decréscimo na concentração sérica de progestágenos foi registrada quando éguas foram submetidas a estresse severo, indicando que o principal mediador desta flutuação de progestágenos é o cortisol e que este quadro é compatível com perda embrionária (69).

Estudos demonstraram que após a aplicação de luteolítico as concentrações tornaram-se basais após três dias, com queda acentuada nas primeiras 12 h (36). Outros autores registraram acentuada queda nas primeiras 12 h, ficando abaixo de 1ng/mL após 24 h e concentrações indetectáveis após 48 h (72).

6. Prostaglandina F₂

A prostaglandina F₂ é o luteolítico endógeno produzido pelo útero não gestante próximo ao dia 14 do ciclo estral, proporcionando lise do corpo lúteo e modificações no quadro endócrino da égua que culminam com o retorno ao estro e a ovulação (1,16). A PGF₂ atinge os ovários por meio da circulação sistêmica, sendo rapidamente metabolizada a 15-keto-13,14-dihydro-PGF₂ (PGFM), metabólito utilizado para determinar a liberação de PGF₂. As células luteínicas possuem grande afinidade de ligação pela PGF₂, chegando a ser 10 vezes maior que a registrada para a espécie bovina (41). Assim consegue-se reduzir o período interovulatório, visto que o corpo lúteo é responsivo ao luteolítico a partir de cinco dias pós-ovulação, aumentando número de estros por estação de monta.

Análogos sintéticos da PGF₂ são comercializados e utilizados na rotina das fazendas, como o dinoprost trometamina (Lutalyse Upjohn®), sendo que as éguas retornam ao estro de 2 a 4 dias e ovulam de 8 a 12 dias após sua aplicação. Após a aplicação intramuscular de três diferentes doses de dinoprost (9, 4 e 2,5 µg/kg), sete dias pós-ovulação, autores relataram que todas as doses diminuíram o período interovulatório, o diestro e as concentrações de progesterona quando comparadas com animais tratados com salina (77). Utilizando técnica de aplicação intralútea guiada por ultra-som de luteolítico e aplicação intramuscular, registrou-se que 5 mg intramuscular e 0,1 mg intralútea são as menores doses capazes de promover a lise do corpo lúteo (73). Efeitos colaterais podem ser observados após a aplicação de dinoprost, sendo cólica, sudorese e inquietação observados (41).

O objetivo do presente estudo foi determinar a concentração de proteínas solúveis do fluido uterino em éguas da raça Mangalarga Marchador prenhas e não prenhas, no dia da colheita do embrião, e correlacioná-las com parâmetros reprodutivos. Também se verificou a relação entre a concentração sérica de progesterona e de proteínas solúveis do fluido uterino, a taxa de recuperação e qualidade embrionária e as taxas de prenhez de embriões inovulados em éguas receptoras 48 h após a aplicação de luteolítico.

CAPÍTULO I

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DO FLUIDO UTERINO E PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE ÉGUAS DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR PRENHAS E NÃO PRENHAS

RESUMO

Diversas substâncias do fluido uterino de éguas foram estudadas, com importante papel das proteínas no desenvolvimento dos embriões ainda livres no lúmen uterino. O objetivo do presente estudo foi determinar a concentração de proteínas solúveis do fluido uterino em éguas da raça Mangalarga Marchador prenhas e não prenhas, no dia da colheita do embrião, e correlacioná-las com características da palpação e ultra-sonografia do trato genital. Vinte e quatro ciclos estrais de 12 éguas doadoras de embriões tiveram amostras de fluido uterino obtidas no dia da colheita do embrião (dia 8 e 9 do ciclo estral) que, posteriormente, foram submetidas ao teste do Ácido Bicinconínico. A presença de embrião no lavado diferenciou éguas prenhas de não prenhas. Características da palpação retal e ultra-sonografia do útero, cérvix e corpo lúteo foram registradas de forma a determinar suas correlações com a presença do embrião. A taxa de recuperação embrionária foi de 58,3 %. A concentração de proteínas do fluido uterino de éguas prenhas foi de $36,0 \pm 22,04$ g/mL e de éguas não prenhas de $42,27 \pm 19,71$ g/mL, não sendo observada diferença ($P > 0,05$) entre os animais dos grupos experimentais. Não foi registrada diferença ($P > 0,05$) entre éguas prenhas e não prenhas com relação a ecogenicidade uterina e do corpo lúteo, o diâmetro do corpo lúteo e o tônus uterino e cervical. A interação materno-fetal nos dias 8 e 9 pós-ovulação não é suficiente para gerar modificações significativas entre as características de palpação retal e ultra-sonográficas estudadas de éguas prenhas e não prenhas. A análise da concentração de proteínas solúveis do fluido uterino é influenciada por diversos fatores que não somente a presença do embrião, sendo esta bastante variável e não eficaz para determinação indireta de condições viáveis para a manutenção da gestação.

ABSTRACT

The mare's fertility and uterine luminal environment has special interest on equine reproduction. Many substances in the uterine fluid have been studied, revealing an important role of uterine proteins in embryo development while it is free in the uterine lumen. The aim of the present study was determine the soluble uterine fluid protein concentration of Mangalarga Marchador pregnant and non pregnant mares, at the embryo collection day, and correlate those with ultrasonic and palpable characteristics of the female genital tract. Twenty four estrous cycles of 12 embryo donors' mares had a small amount of uterine fluid harvested at the embryo collection day (day 8 and 9 of the estrous cycle) which was submitted to the Bicinchoninic Acid Test. The presence of an embryo in the uterine flushing differentiated pregnant of non pregnant mares. Ultrasonographic and palpable characteristics of the uterus, cervix and corpus luteum were studied to establish correlations with pregnant and non pregnant mares. The embryo recovery rate was 58.3 %. The mean protein concentration of uterine fluid of pregnant mares was 36.0 ± 22.04 g/mL and of non pregnant mares 42.27 ± 19.71 g/mL, with no difference between groups ($p > 0.05$). Additionally, no difference was observed between groups for uterine and corpus luteum ecogenicity, corpus luteum diameter and cervix and uterine tonus. Fetal-maternal interaction at days 8 and 9 after ovulation is not strong enough to change the parameters studied between pregnant and non pregnant mares. Many factors influence the soluble uterine protein concentration besides the embryo presence, which turns it into a very variable and inefficient parameter to determine viable conditions to embryo development.

1. INTRODUÇÃO

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

Analisando os processos envolvidos desde a fertilização até o nascimento do potro diversos pontos podem gerar perdas embrionárias (25, 71). Nos primeiros momentos de sua formação, o embrião ainda não possui expressão gênica própria e depende de proteínas e RNAs herdados dos gametas para se desenvolver (23). Inicialmente o embrião fica em contato com a tuba uterina e suas secreções e posteriormente é transportado para o útero. Diferentes substâncias são encontradas no fluido uterino de éguas no início da gestação, destacando-se proteínas, esteróides (estrógenos), prostaglandinas (PGE₂), carboidratos (frutose) e enzimas (58). O útero secreta diferentes proteínas que irão nutrir o embrião antes da implantação (13, 47). O bloqueio da luteólise e a conseqüente manutenção da gestação são frutos da interação materno-fetal.

O conteúdo de proteínas no fluido uterino é influenciado pela razão estrógeno-progesterona (18), sendo o embrião exigente quanto à composição do fluido uterino (54). Além de taxas adequadas de progesterona, a presença de endometrites, endometrioses ou qualquer prejuízo à capacidade do útero produzir, de forma dinâmica, o fluido uterino irá influenciar o desenvolvimento embrionário (47).

Parâmetros indiretos foram pesquisados para predizer a qualidade do ambiente uterino e a fertilidade de éguas, como: ecogenicidade do útero e do corpo lúteo, tônus uterino e cervical e a determinação da concentração de progesterona. Uma forma direta

de analisar a qualidade uterina é determinar a concentração protéica do fluido uterino compatível com a manutenção da gestação, pois estas são importantes para o desenvolvimento inicial do embrião. Devido às interferências produzidas pelo método de colheita e a necessidade de desenvolvimento de técnicas de uso prático, seria necessário determinar correlações entre os parâmetros indiretos e a qualidade uterina, de forma a destacar qual o mais confiável em prever a fertilidade da égua.

O embrião produz diversos hormônios e citocinas durante o seu desenvolvimento. Estas secreções alteram ou modulam as respostas do ambiente ao seu redor, sendo fundamentais para o reconhecimento materno da gestação e para o transporte do embrião da tuba uterina para o útero da égua (50, 72). Ainda não se conhecem exatamente os eventos envolvidos no reconhecimento materno da gestação na égua, mas sabe-se que a migração embrionária está envolvida neste processo (48). A determinação de diferenças entre a concentração protéica do útero de éguas prenhas e não prenhas auxilia o entendimento das modificações causadas pela presença do embrião.

O objetivo do presente estudo foi determinar a concentração de proteínas solúveis do fluido uterino em éguas da raça Mangalarga Marchador prenhas e não prenhas, no dia da colheita do embrião, e correlacioná-las com características da palpação e ultra-sonografia do trato genital.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no período de setembro/2004 a fevereiro/2005, em uma fazenda de criação comercial de cavalos da raça Mangalarga Marchador, localizada no município de Ponte Nova-MG (20°30'LS/42°50'LV).

2.1. Animais e colheita de fluido uterino

Para determinação da concentração protéica do fluido uterino foram avaliados 24 ciclos estrais de 12 éguas da raça Mangalarga Marchador submetidas ao processo de colheita e transferência de embriões (em média 420 kg de peso vivo e de 2,5 a 16 anos de idade). No total, em todo o programa comercial de transferência de embriões, foram

efetuados 67 lavados uterinos. Em todos os ciclos as éguas foram submetidas a exame transretal e foram inseminadas após a detecção de folículo pré-ovulatório (>35mm) com no mínimo 500 milhões de espermatozoides viáveis provenientes de garanhão de comprovada fertilidade a cada 48 h até que se detecta-se a ovulação. Foi utilizado sêmen fresco diluído com meio comercial apropriado (Maxisêmen®).

Amostras de fluido uterino para determinação da concentração de proteínas solúveis no fluido uterino foram obtidas durante o processo de colheita dos embriões realizadas nos dias 8 ou 9 após a ovulação. A colheita dos embriões iniciou-se após transposição do cérvix com o dedo indicador e posicionamento da sonda uterina modelo bivona, cujo balonete foi inflado com 50 mL de ar e tracionado caudalmente até obstruir o óstio cervical interno. Foram infundidos 250 mL de solução de Ringer Lactato (Sanobiol®) no lúmen uterino, com objetivo de obter amostra para análise de proteínas do fluido uterino ou mesmo o embrião. Após sifonagem do líquido via filtro coletor de embriões, o conteúdo recuperado foi armazenado em dois tubos de ensaio de 10 mL. As amostras de fluido uterino foram imediatamente acondicionadas em gelo e depois congeladas a -20 °C. Posteriormente, deu-se continuidade ao lavado uterino com mais três infusões com 1L da mesma solução para cada infusão, com objetivo somente de recuperação do embrião. O conteúdo do copo coletor foi levado ao microscópio estereoscópico em placa de Petri para se efetuar o rastreamento e avaliação do embrião. Colheitas de animais com líquido recuperado turvo, considerado com endometrite, foram descartados.

O método de determinação de prenhez utilizado foi a presença de embrião no lavado uterino, diferenciando o grupo de animais com a presença do embrião no lavado uterino (éguas prenhas) e o grupo de animais que não foi encontrado embrião (éguas não prenhas).

2.2. Avaliação uterina e cervical

Antes de cada lavado uterino as éguas foram avaliadas por via transretal para determinação do tônus uterino (Tabela 1) e cervical (Tabela 2). Com o auxílio do aparelho de ultra-som (Sonovet 600®, transdutor linear de 5 mhz) foram determinadas por via transretal a ecogenicidade uterina (Tabela 3) e do corpo lúteo (Tabela 4). A ecogenicidade uterina foi mensurada a partir da visualização da escala na base dos dois

cornos uterinos, sendo utilizada a média entre as duas mensurações. O diâmetro do corpo lúteo foi determinado com auxílio do aparelho de ultra-som, utilizando a média entre a maior e menor reta passível de mensuração (em mm).

Tabela 1. Escala de tônus uterino.

Escala	Tônus Uterino
1	Muito fraco (flácido, compatível com anestro)
2	Fraco (baixo intermediário)
3	Médio (alto intermediário, compatível com meio do diestro)
4	Forte (útero túrgido, tenso, compatível com prenhez a partir da terceira semana)
5	Muito Forte (tônus excessivo, indesejável)

Tabela 2. Escala de tônus cervical.

Escala	Tônus Cervical
1	Muito fraco (aberta, transponível por dois ou mais dedos)
2	Fraco (aberta intermediário, transponível por um dedo)
3	Médio (fechada intermediário, fechada mas facilmente transponível)
4	Forte (fechada, dificilmente transponível)
5	Muito forte (extremamente fechada, compatível com gestação avançada)

Tabela 3. Escala de ecotextura uterina.

Escala	Ecotextura Uterina
1	Muito baixa (dobras endometriais evidentes, grande edema uterino, imagem extremamente hipoecóica - negra, compatível com fase estrogênica)
2	Baixa (presença discreta de dobras endometriais e edema, imagem hipoecóica)
3	Média (ausência de dobras endometriais ou edema, imagem de ecogenicidade intermediária, compatível com fase progesterônica)
4	Alta (imagem hiperecóica, compatível fase progesterônica)
5	Extrema (imagem extremamente hiperecóica - branca, indesejável)

Fonte: adaptado de 38.

Tabela 4. Escala de ecogenicidade do corpo lúteo.

Escala	Ecogenicidade do Corpo Lúteo
1	Muito baixa (imagem extremamente hipocóica - negra, compatível ovulação recente/corpo hemorrágico)
2	Baixa (imagem hipocóica intermediária)
3	Média (imagem hiperecóica intermediária)
4	Alta (imagem hiperecóica)
5	Extrema (imagem extremamente hiperecóica, compatível com corpo lúteo afuncional ou no dia da ovulação)

2.3. Determinação da concentração protéica

No Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários-BIOAGRO, localizados na Universidade Federal de Viçosa-MG, as amostras de fluido uterino foram descongeladas e submetidas ao Teste do Ácido Bicinconínico para determinação da concentração de proteínas solúveis (61).

2.3.1. Preparo dos reagentes para o Teste do Ácido Bicinconínico

De forma a tornar os reagentes estáveis e de uso prático, o Teste do Ácido Bicinconínico foi constituído dos reagentes A e B, que foram misturados no momento da execução do teste para formar a solução de trabalho (Tabela 5).

Tabela 5. Soluções empregadas para a determinação de concentração protéica pelo teste do Ácido Bicinconínico.

Reagente A	Quantidade
1% BCA- Na_2 (Ácido Bicinconínico SIGMA D8284)	1 g
2% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -----	2 g
0,16% Tartarato de Sódio -----	0,16 g
0,45% NaOH -----	0,45 g
0,95 NaHCO_3 -----	0,95 g
H_2O ----- q.s.p.	100mL

Ajustar o pH para 11,25 adicionando NaOH 50%.

Reagente B	Quantidade
4% CuSO ₄ .5H ₂ O -----	4 g
H ₂ O ----- q.s.p.	100 mL

Solução de trabalho	Quantidade
Reagente A -----	1960 L
Reagente B -----	40 L

Fonte 61.

2.3.2. Preparo da curva padrão e determinação da concentração protéica

Para determinação da curva padrão foram utilizadas concentrações conhecidas de soroalbumina bovina (BSA). Assim, foi determinada uma equação de regressão linear em função das concentrações de BSA e a absorvância no comprimento de onda de 562 nm (Figura 1). Para cada 100 L de solução de BSA foram adicionados 2 mL de solução de trabalho. As amostras foram agitadas, incubadas a 60 °C por 30 min e então analisadas em espectrofotômetro ajustado para leitura de absorvância em 562 nm.

Para a determinação da concentração de proteínas no fluido uterino, foi utilizado o mesmo método, substituindo-se a solução de BSA por amostras de fluido uterino. De acordo com a leitura da absorvância foi utilizada a equação de regressão linear da curva padrão (Figura 1) para determinar a concentração protéica.

2.4. Análise Estatística

A comparação das médias das variáveis quantitativas (ecogenicidade uterina e do corpo lúteo, diâmetro do corpo lúteo, tônus uterino e cervical e concentração protéica do fluido uterino) foram submetidos ao teste de homocedasticidade (Teste de Levene) e, posteriormente, ao Teste “t” de Student, utilizando o Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG) (60) e o Sistema de Análise de Dados STATISTICA (65).

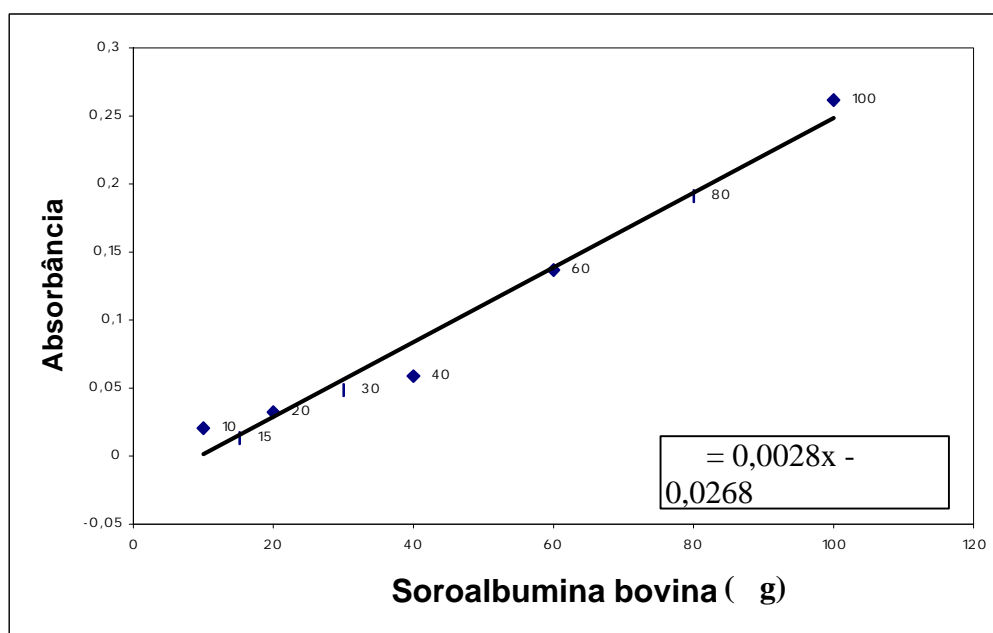


Figura 1. Equação de regressão em função das concentrações de soroalbumina bovina e a absorvância a 562 nm (curva padrão) para estimar a concentração protéica das amostras de fluido uterino.

3. RESULTADOS

Neste estudo foram utilizados 24 lavados uterinos, sendo 14 positivos (58,3 % de recuperação embrionária). A concentração de proteínas do fluido uterino de éguas prenhas e não prenhas foi de $36,0 \pm 22,04$ g/mL e $42,27 \pm 19,71$ g/mL, respectivamente, não sendo observada diferença ($P > 0,05$) entre estes. Não foi registrada diferença ($P > 0,05$) entre éguas prenhas e não prenhas com relação a ecogenicidade uterina e do corpo lúteo, diâmetro do corpo lúteo, tônus uterino e tônus cervical (Tabela 6).

Como não foram detectadas diferenças entre os parâmetros da palpação retal e ultra-sonografia e a concentração de proteínas do fluido uterino não foram determinadas correlações entre estas variáveis.

Os resultados obtidos em todas as transferências de embriões do programa comercial onde foram colhidas as amostras para este estudo estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 6. Avaliação da ecogenicidade uterina e do corpo lúteo, diâmetro do corpo lúteo (mm), tônus uterino e cervical de éguas prenhas e não prenhas da raça Mangalarga Marchador no dia da colheita do embrião.

Éguas	n	Ecogenicidade de Uterina (1-5)	Ecogenicidade do Corpo Lúteo (1-5)	Diâmetro do Corpo Lúteo (mm)	Tônus uterino (1-5)	Tônus cervical (1-5)
Prenhas	14	2,6 ± 0,57 ^a	3,3 ± 0,72 ^a	29,7 ± 4,38 ^a	3,6±0,56 ^a	4,2±0,32 ^a
Não prenhas	10	3,3 ± 0,65 ^a	3,4 ± 0,48 ^a	31,3 ± 4,57 ^a	3,4±0,48 ^a	4,4±0,48 ^a

^a = valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferiram entre si pelo teste “t” (P>0,05).

Tabela 7. Valores totais e percentuais dos lavados uterinos, embriões inovulados e taxas de prenhez aos 15 e 60 dias pós-fecundação em éguas da raça Mangalarga Marchador, em um programa comercial de transferência de embriões durante a estação reprodutiva 2004/2005.

	Colheitas de Embrião	Embriões Transferidos	Prenhez (15 dias)	Prenhez (60 dias)
Positivos	47 (70,1%)	45 (95,7%)	31 (68,9%)	29 (64,4%)
Negativos	20 (29,9%)	-	-	-
Total	67	45	31	29

4. DISCUSSÃO

As características da palpação retal e ultra-sonografia do útero nos dias 8 e 9 do diestro, não diferiram (P>0,05) entre éguas prenhas e não prenhas. Diversos autores registraram diferenças entre o tônus uterino de éguas prenhas e não prenhas a partir do dia 17 do ciclo estral, sendo este o principal parâmetro de palpação retal para diagnóstico de gestação nesta fase. O tônus uterino máximo é atingido do dia 16 ao 25 após a fecundação (28). Se não houver o reconhecimento materno da gestação, próximo ao dia 14 ocorrerá a luteólise. Tônus uterino semelhante ao de gestação não é atingido com apenas a reposição hormonal com progesterona. No entanto, em éguas cíclicas, a aplicação de progesterona exógena por determinado tempo, seguida de período de aplicação de progesterona associada a pequenas doses de estrógeno induzem tônus uterino semelhante ao observado em éguas gestantes (7, 37). Foi registrado aumento do

tônus uterino e do grau de dobras endometriais próximo ao dia 6 do diestro em éguas prenhas e não prenhas, embora não tenha sido demonstrada relação entre o aumento do tônus e a entrada do embrião ao útero, este foi relacionado a uma onda estrogênica do diestro (35). No dia 8 ou 9 do ciclo estral provavelmente os embriões ainda não tivessem interagido suficientemente com o útero para provocar alterações significativas.

A ecotextura uterina é dependente da razão estrógeno-progesterona (28). Durante a fase luteínica do ciclo estral da égua ou durante o período inicial da gestação o útero se mostra denso e com alta ecogenicidade. Por ser reflexo da quantidade de dobras endometriais e da densidade dos constituintes do endométrio, não se torna pretencioso sugerir que a ecogenicidade uterina está relacionada com o grau de irrigação sanguínea uterina e com o grau de fibrose do endométrio. A relação da irrigação sanguínea com a ecogenicidade é inversa, ou seja, quanto maior a irrigação, menor a ecogenicidade, e a relação com a fibrose é direta, quanto maior a fibrose endometrial, maior a ecogenicidade uterina. Estudos comprovam que a concentração de progesterona pode ser aumentada com o uso de vasodilatadores, de forma a melhorar a irrigação sanguínea do útero e dos ovários (10, 11) e, provavelmente, a fertilidade. Em éguas mais velhas são observados com maior frequência a presença de cistos endometriais, consequência de fibrose endometrial (68), que provavelmente influenciam negativamente a produção das glândulas endometriais. Assim, quanto maior o número de agressões sofridas pelo endométrio (gestações, endometrites, distocias, ponta da pipeta de inseminação artificial) ao longo da vida reprodutiva da égua, maior a ecogenicidade uterina e menor a sua fertilidade. Baixa irrigação sanguínea e elevada fibrose endometrial poderiam reduzir a produção de fluido uterino e, conseqüentemente, influenciar o desenvolvimento embrionário.

A principal função do corpo lúteo é a produção de progesterona. A partir da necessidade prática de determinação da capacidade do corpo lúteo em produzir concentrações adequadas de progesterona, sugeriu-se que sua ecogenicidade e seu diâmetro poderiam ser indicativos de seu funcionamento (3). No presente estudo não foram mensuradas as concentrações séricas de progesterona, mas foi observada a presença do embrião, indicativo de condições adequadas para desenvolvimento da gestação. Não foram registradas diferenças ($P > 0,05$) entre a ecogenicidade e o diâmetro do corpo lúteo e o “status” reprodutivo da égua (prenha ou não prena). Ampla variação é registrada quanto à concentração de progesterona em éguas prenhas, apesar de ser

necessária concentração mínima para garantir a gestação (49, 59). Nos dias 8 e 9 do ciclo estral, o corpo lúteo apresenta tamanho máximo e ecogenicidade mediana, mas com a luteólise (14º dia), o corpo lúteo sofre profundas modificações, tornando-se menor e mais ecogênico (50). No presente estudo, provavelmente nos dias 8 e 9 do ciclo estral as características do corpo lúteo estudadas não refletem modificações capazes de influenciar negativamente o desenvolvimento embrionário.

Durante o estro, a cérvix encontra-se aberta sob o efeito do estrógeno folicular, permitindo a entrada do sêmen e a expulsão de secreções após a cobertura. Com a atuação da progesterona, a cérvix se fecha e produz secreção mucosa, isolando o útero da vagina. Além disso, o tônus cervical impede a expulsão física do embrião. Em casos de decréscimo nas concentrações séricas de progesterona, apesar de viável, o embrião pode ser expulso pela cérvix aberta. Este fato tem sido observado em casos de perda embrionária precoce (25). No presente estudo, a presença do embrião não influenciou o tônus cervical ($P>0,05$). Sob concentrações séricas de progesterona adequadas a cérvix encontra-se suficientemente fechada de forma a não prejudicar o desenvolvimento embrionário.

A concentração de proteínas do fluido uterino de éguas prenhas e não prenhas no dia da colheita do embrião não diferiu ($P>0,05$), o que corrobora com os achados descritos na literatura (79). Diferentes técnicas de colheita do fluido uterino inviabilizam comparação direta quanto ao total de proteínas encontrado. Endometrites podem influenciar a quantidade de proteínas no fluido uterino, visto que autores comparando lavados de éguas consideradas infectadas e não infectadas observaram que as primeiras apresentaram maior concentração total de proteínas no fluido uterino (75). Da mesma forma, concentrações de proteínas do fluido uterino de éguas consideradas resistentes a endometrite tendem a serem menores que as registradas nas consideradas sensíveis (4). No presente estudo os lavados visualmente tidos como infectados (líquido turvo recuperado no lavado) foram descartados, mas pequenas diferenças, devido a endometrite subclínica, podem não ter sido observadas. Outros autores utilizaram a cultura bacteriana e a citologia uterina para determinar a presença de endometrite (42, 67). Outros autores propuseram que a menor concentração de proteínas do fluido uterino para éguas prenhas seja causada pela sua maior metabolização pelo concepto (79).

As taxas de recuperação embrionária e de prenhez após a inovulação na égua receptora (Tabela 7) em todas as transferências de embriões executadas no programa comercial confirmam as descritas na literatura (62, 63). Visto que a taxa de recuperação embrionária foi utilizada como método de determinação da prenhez, faz-se importante que a técnica de colheita dos embriões tenha sido utilizada de forma adequada, evitando que éguas prenhas fossem determinadas como não prenhas. Nos lavados uterinos monitorados no presente estudo a taxa de recuperação embrionária foi de 58,3%, menor que a registrada na compilação de todas as transferências realizadas no programa comercial de transferências de embriões (70,1%), mas ainda se encontram de acordo com as taxas descritas na literatura.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a interação materno-fetal nos dias 8 e 9 pós-ovulação não foi suficiente para gerar modificações nos parâmetros uterinos, cervicais e do corpo lúteo entre éguas prenhas e não prenhas. A análise da concentração de proteínas solúveis do fluido uterino é influenciada por diversos fatores que não somente a presença do embrião, sendo esta bastante variável e não eficaz para determinação indireta de condições viáveis para a manutenção da gestação.

CAPÍTULO II

COLHEITA DE EMBRIÕES EQÜINOS 48 H APÓS APLICAÇÃO DE LUTEOLÍTICO: CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS DO FLUIDO UTERINO E DE PROGESTERONA SÉRICA, PERÍODO INTEROVULATÓRIO, QUALIDADE E RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIAS E TAXA DE PREENHEZ EM ÉGUAS RECEPTORAS

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar a relação entre as concentrações séricas de progesterona e de proteínas solúveis do fluido uterino, relacionando-as as taxas de recuperação e qualidade embrionária, bem como as taxas de prenhez em receptoras de embriões colheitados 48 h após a aplicação de luteolítico. Também foram estudados o período interovulatório e o intervalo aplicação do luteolítico a ovulação subsequente. Vinte ciclos estrais de dez éguas diferentes foram utilizados. No primeiro ciclo as éguas foram submetidas ao protocolo normal de transferência de embriões (grupo controle), com aplicação de luteolítico no dia da colheita do embrião. No segundo ciclo estral, o luteolítico foi aplicado 48 h antes da colheita do embrião (grupo tratado). Não foram verificadas diferenças na taxa de recuperação embrionária, prenhez na égua receptora, qualidade embrionária, concentração de proteínas no fluido uterino e intervalo luteolítico-ovulação ($P>0,05$). No grupo controle observou-se 80% de lavados positivos, sendo obtidas sete prenhezes nas éguas receptoras (87,5%). No grupo tratado foram colheitados sete embriões (70% de taxa de recuperação), com seis prenhezes nas éguas receptoras (85,7%). Não houve perdas embrionárias até os 60 dias de gestação. Apenas um embrião classificado como de grau II foi colheitado e foi proveniente de animal do grupo tratado, sendo os demais classificados como grau I. A concentração sérica de progesterona somente foi determinada para os animais tratados, sendo de $13,86\pm 5,42$ ng/mL no dia da aplicação do luteolítico (48 h antes da colheita do embrião), decrescendo para $0,46\pm 0,25$ ng/mL no dia da colheita do embrião, existindo diferença ($P<0,05$) entre os grupos experimentais. A concentração de proteínas solúveis do fluido uterino nos animais tratados foi de $37,77\pm 9,87$ g/mL e nos animais controles

33,5±15,48 g/mL. O período interovulatório diferiu ($P<0,05$) entre os grupos experimentais, sendo, em média, de 18,5 dias no grupo controle e 15,9 dias no grupo tratado. A presença de embriões viáveis 48 h após a aplicação de luteolítico demonstra a capacidade uterina em manter condições favoráveis ao desenvolvimento embrionário. A diminuição do período interovulatório foi devido à antecipação da aplicação do luteolítico, propiciando uma estimativa de dois estros a mais por estação reprodutiva por égua doadora de embriões.

ABSTRACT

The aim of this study was to study the relation between serum progesterone concentration and soluble protein in uterine fluid concentration, analyzing the embryo recovery rate and quality and the pregnancy rate in recipient mares of embryos collected 48 h after luteolytic application. The interovulatory period and the luteolytic-ovulation interval were also observed. Twenty estrous cycles of ten mares were monitored. Standard protocol of equine embryo transfer was applied to the first estrous cycle (luteolytic application at the day of embryo transfer, control group). In the second estrous cycle, luteolytic application was performed 48 h before embryo transfer (treated group). No difference ($p>0.05$) was observed in recovery rate, pregnancy in the recipient mare, embryo quality, protein concentration in uterine fluid and luteolytic-ovulation interval. In the control mares 80% of positive uterine flushes were observed, with seven pregnancies in recipient mares (87.5 %). In the treated animals the recovery rate was 70 %, with six pregnant recipient mares (85.7 %). No early embryo loss was observed till 60 days of gestation. Only one embryo was classified as grade II (treated animal), the others were all of grade I. The serum progesterone concentration was only determined for the treated group, being 13.86 ± 5.42 ng/mL in the day of luteolytic application (48 h before embryo collection), decreasing to 0.46 ± 0.25 ng/mL on the day of embryo collection ($p<0.05$). The uterine protein fluid concentration in the treated animals was 37.77 ± 9.87 g/mL and in the control ones 33.5 ± 15.48 g/mL ($p>0.05$). The interovulatory period was 18.5 days in the control mares and 25.9 in the treated ones, showing difference between themselves ($p<0.05$). A viable embryo 48 h after luteolytic application shows the uterine capacity to keep favorable conditions for embryo

development. The smaller interovulatory period was due to the anticipation of luteolytic application, allowing two more estrous cycles per donor mare per reproduction season.

1. INTRODUÇÃO

O advento da ultra-sonografia e da técnica de colheita de embriões em eqüinos permitiu o estudo do desenvolvimento embrionário. Desde o início de sua clivagem o embrião passa por diversas modificações que caracterizam seu estágio de desenvolvimento. Conhecer estas modificações é fundamental para determinar alterações patológicas.

Atualmente, diversos programas de transferência de embriões eqüinos estão implantados, buscando melhores resultados. Um dos entraves encontrados é a qualidade embrionária. Etapas do processo de reconhecimento materno da gestação ocorrem ainda na tuba uterina (50, 72), existindo seleção da estrutura a ser transportada para o útero. Mesmo assim embriões de qualidade inferior são recuperados nos lavados uterinos.

Outra dificuldade para a produção de potros é a característica monovular poliestral sazonal das éguas, aliada a um período gestacional longo (15). Diferentes técnicas de superovulação e modulação do fotoperíodo já foram desenvolvidas e são empregadas junto à transferência de embriões, mas ainda apresentam resultados insatisfatórios (44). Uma forma simples de aumentar a produção de embriões é fazer com que as éguas tenham um período interovulatório menor, de forma a terem maior número de estros por estação reprodutiva. O ciclo estral pode ser encurtado com a aplicação de luteolíticos a partir do 5º dia pós-ovulação e quanto antes for a aplicação do luteolítico menor o período interovulatório. De acordo com os protocolos de transferência de embriões, faz-se a aplicação do luteolítico no dia da colheita dos embriões (dia 7 ao 9 do ciclo estral).

A progesterona é o principal hormônio relacionado à manutenção da gestação, influenciando diretamente o útero e suas secreções. O fluido uterino é responsável pela

nutrição do embrião livre no lúmen uterino (13, 39) e as proteínas presentes neste estão intimamente ligadas ao desenvolvimento embrionário normal. Alterações na capacidade do útero em produzir o fluido uterino podem estar relacionadas com infertilidade na égua.

O objetivo deste estudo foi verificar a relação entre a concentração sérica de progesterona e de proteínas solúveis do fluido uterino, a taxa de recuperação e qualidade embrionária, bem como as taxas de prenhez de embriões inovulados em éguas receptoras 48 h após a aplicação de luteolítico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado de setembro/2004 a fevereiro/2005, em duas fazendas de criação comercial de cavalos da raça Mangalarga Marchador e Campolina, localizadas nos municípios Ponte Nova-MG (20°30'LS/42°50' LW) e Matipó-MG (20°15'LS/42°20' LW), respectivamente.

2.1. Animais

Para determinação da concentração de proteínas solúveis do fluido uterino foram utilizadas sete éguas da raça Mangalarga Marchador e três da raça Campolina (em média 450kg de peso vivo, 2,5 a 10 anos de idade), totalizando 20 ciclos estrais. Cada égua teve um ciclo estral no grupo controle e outro no grupo tratado. Durante o primeiro ciclo estral acompanhado, as éguas foram mantidas no protocolo normal de transferência de embriões (grupo controle), com aplicação de agente luteolítico (Lutalyse Upjohn®, 7,5 mg por via intramuscular, dose única) imediatamente após a colheita do embrião (dia 8 ou 9 do ciclo estral, sendo dia 0 o dia da ovulação). No segundo ciclo estral, a aplicação de luteolítico se deu 48 h antes da colheita de embrião (grupo tratado). Em todos os ciclos estrais as éguas foram inseminadas como descrito no Capítulo I.

2.2. Colheita de fluido uterino e determinação da concentração protéica

As amostras de fluido uterino foram obtidas durante o processo de colheita dos embriões, realizadas nos dias 8 ou 9 após a ovulação. No Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários-BIOAGRO/UFV foi utilizado o Teste do Ácido Bicinconínico para determinação da concentração protéica (61). As técnicas de colheita e determinação da concentração protéica foram descritas no Capítulo I.

2.3. Concentração de Progesterona

Foram determinadas as concentrações séricas de progesterona nas éguas tratadas com luteolítico 48 h antes da colheita de embrião. As amostras de sangue foram colhidas no dia da aplicação do luteolítico e no dia da colheita do embrião, sendo o intervalo da aplicação do luteolítico à colheita do embrião de 48 h. Após centrifugação a 600 G por 10 min, duas alíquotas foram congeladas a -20°C. A determinação da concentração sérica de progesterona foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal-DZO/UFMG utilizando kit comercial para radioimunoensaio (Coat-a-Count®, DPC, Los Angeles/USA), sendo adotado protocolo indicado pelo fabricante.

2.4. Período interovulatório

O período interovulatório (intervalo entre duas ovulações consecutivas) foi expresso em dias, sendo a ovulação considerada como dia zero do ciclo estral, registrando-se também o intervalo da aplicação do luteolítico à ovulação subsequente (intervalo luteolítico-ovulação).

2.5. Diagnóstico de gestação

Após 15 e 60 dias de vida do embrião foi executado exame ultra-sonográfico da receptora para diagnóstico de prenhez, com uso de ultra-som (Sonovet 600®), com transdutor transretal de 5 MHz, sendo registradas as perdas embrionárias entre os dois exames consecutivos.

2.6. *Qualidade embrionária*

Para avaliação da qualidade embrionária os embriões foram analisados quanto a sua forma, presença de blastômeros extrusados, desuniformes ou picnóticos, colapso de blastocele dentre outras características (62). Embriões excelentes foram classificados como de Grau I e os degenerados como de Grau V (Tabela 1).

Tabela 1. Escala de qualidade embrionária.

Escala	Qualidade Embrionária
I	Excelente (O embrião ideal, esférico, com células de tamanho, cor e textura uniformes)
II	Bom (imperfeições menores como poucos blastômeros extrusados, forma irregular ou separação trofoblástica)
III	Regular (problemas definitivos mas não severos, blastômeros extrusados, células degeneradas ou colapso de blastocele)
IV	Ruim (problemas severos, colapso de blastocele, vários blastômeros extrusados, células degeneradas, mas com uma massa embrionária viável)
V	Degenerado (óocitos não fertilizados ou embriões totalmente degenerados)

Fonte 62.

2.7. *Éguas receptoras*

As éguas receptoras tiveram crescimento folicular e ovulação acompanhados por a palpação transretal e ultra-sonografia diariamente. Antes da inovulação, éguas do 4º ao 7º dia pós-ovulação foram selecionadas por palpação transretal, sendo observados o tônus uterino e cervical. O histórico reprodutivo das éguas também foi levado em consideração, dando-se preferência a éguas do segundo ciclo estral pós-parto em diante. Todas as éguas encontravam-se em regime de pasto e em bom escore da condição corporal, considerado satisfatório para um bom desempenho reprodutivo.

2.8. *Análise Estatística*

Para análise das variáveis qualitativas (taxa de recuperação embrionária, qualidade embrionária e prenhez na égua receptora) foi utilizado o Teste Exato de

Fisher, visto que estas variáveis não atenderam ao pressuposto de normalidade (Teste de Lilliefors). Para comparação de médias de variáveis quantitativas (concentração de proteínas no fluido uterino, intervalo luteolítico-ovulação e período interovulatório), após análise de homocedasticidade (Teste de Levene), foi utilizado o Teste "t" de Student para amostras independentes. Para a análise das concentrações de progesterona antes e depois de 48 h da aplicação do luteolítico foi utilizado Teste "t" de Student para amostras dependentes. Para as análises foram utilizados o Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG) (60) e o Sistema de Análise de Dados STATISTICA (65).

3. RESULTADOS

Não foi registrada diferença ($P>0,05$) na taxa de recuperação embrionária, prenhez na égua receptora ou qualidade embrionária. Nos animais controle observou-se 80% de lavados positivos, sendo obtidas sete prenhez nas éguas receptoras (87,5%). Nos animais tratados foram colheitados sete embriões (70% de taxa de recuperação positiva), com seis prenhez nas éguas receptoras (85,7%) (Tabela 2). Não foram observadas perdas embrionárias até 60 dias de gestação. Todos os embriões colheitados foram classificados como de grau I, exceto um colheitado de égua tratada que foi classificado como de grau II.

Tabela 2. Número de embriões recuperados, prenhez de embriões inovulados em éguas receptoras aos 15 dias, concentração de proteínas solúveis do fluido uterino (g/mL), intervalo luteolítico-ovulação (dias) e período interovulatório (dias) em éguas da raça Mangalarga Marchador e Campolina tratados ou não com luteolítico 48 h antes da colheita do embrião.

	Embriões Recuperados	Prenhez (15 dias)	Concentração de Proteína	Intervalo luteo- lítico-ovulação	Período interovulatório
Controle	8 ^a	7 ^a	33,5±15,5 ^a	10±0,9 ^a	18,5±1,1 ^a
Tratado	7 ^a	6 ^a	37,8±9,9 ^a	9,5±0,8 ^a	15,9±0,9 ^b
Total	15	13	-	-	-

^{a, b}= valores seguidos de letras iguais na mesma coluna diferiram entre si pelo teste "t" de Student ($P<0,05$).

A concentração média de progesterona sérica determinada apenas para os animais tratados foi de $13,9 \pm 5,4$ ng/mL no dia da aplicação do luteolítico (48 h antes da colheita do embrião), decrescendo para $0,5 \pm 0,3$ ng/mL no dia da colheita do embrião, havendo diferença ($P < 0,05$).

A concentração de proteínas solúveis do fluido uterino nos animais do grupo tratado foi de $37,8 \pm 9,9$ g/mL e nos do grupo controle $33,5 \pm 15,5$ g/mL, não havendo diferença ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais.

O intervalo luteolítico-ovulação não diferiu ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais. Já o período interovulatório diferiu ($P < 0,05$) entre os grupos, sendo em média de 18,5 dias no grupo controle e de 15,9 dias no grupo tratado.

4. DISCUSSÃO

As taxas de recuperação embrionária nas éguas doadoras e de prenhez nas éguas receptoras obtidas durante este estudo corroboram com os resultados descritos na literatura (62, 63), não havendo diferença ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais. Estas taxas são indicativas de manutenção da qualidade do ambiente uterino e viabilidade embrionária 48 h após a aplicação de luteolítico.

A concentração sérica de progesterona registrada nos dias 6 e 7 do diestro está de acordo com a descrita na literatura (64). Diferentes autores demonstraram queda nas concentrações de progesterona após a aplicação de luteolítico, mas existe grande variação entre os resultados. Após a aplicação do mesmo foram descritas concentrações incompatíveis com a gestação após 24 (71, 1) e 72 h (36). No presente estudo foi registrada concentração sérica de progesterona abaixo de 1ng/mL 48 h após a aplicação de luteolítico, ocorrendo lise do corpo lúteo. Concentrações tão baixas são tidas como incompatíveis com a manutenção da gestação, mas o útero ainda mantém condições favoráveis a sobrevivência do embrião por mais tempo.

A produção inadequada de progesterona pelo corpo lúteo é causa de infertilidade em éguas, estando relacionada com perda embrionária precoce (25, 49). No presente estudo, não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) entre o número e a qualidade dos embriões recuperados entre éguas tratadas ou não com luteolítico 48 h antes da colheita do embrião. Os embriões colheitados nos animais tratados foram

privados de concentrações adequadas de progesterona por não mais que 48 h, sendo mantida sua viabilidade. Está descrita na literatura a manutenção da gestação com aplicação de progesterona exógena até quatro dias após a aplicação de luteolítico, sendo observado desenvolvimento embrionário por até 14 dias após a aplicação de luteolítico (40).

A perda embrionária precoce foi acompanhada por diversos autores, sendo descritas taxas de até 14,4 % até os 50 dias de gestação e de até 30% em receptoras aos 100 dias de gestação (25). Ao se utilizar a técnica de transferência de embriões consegue-se avaliar a qualidade do embrião (62), tendo os embriões de excelente qualidade a maior probabilidade de sobrevivência na égua receptora. Nos programas comerciais de transferência de embriões não são utilizados testes laboratoriais para determinação da qualidade dos embriões, sendo utilizada somente a observação visual, que não reflete imediatamente os danos sofridos pelo embrião. Apesar do pequeno número de embriões transferidos (n=15) durante este estudo, não foram observadas perdas embrionárias até os 60 dias. A expulsão mecânica do embrião ainda viável pela cérvix aberta já foi relatada, fato pouco provável de ter ocorrido neste estudo, visto que as éguas demonstravam características de diestro no dia da colheita do embrião. A viabilidade embrionária é confirmada pela qualidade dos embriões recuperados (87% dos embriões foram classificados como grau I), pelo sucesso na manutenção da gestação após a transferência e pela ausência de absorções embrionárias até os 60 dias de gestação. Os embriões foram resistentes à baixas concentrações de progesterona por pequeno intervalo de tempo.

Não foi observada diferença ($P>0,05$) entre a concentração de proteínas solúveis do fluido uterino entre os animais tratados e controles. Tem sido relatado que a concentração de proteínas do fluido uterino de éguas cíclicas se mantém estável nos dias 14, 16 e 18 do diestro, decrescendo no dia 20 (80). Considerando que a luteólise normal ocorre no dia 14 do ciclo estral, provavelmente a concentração sérica de progesterona decresce mais rapidamente que a concentração de proteínas do fluido uterino. Apesar da redução nas concentrações de proteína do fluido uterino ser registrada após declínio das concentrações séricas de progesterona (78, 79, 80), provavelmente este decréscimo não é suficientemente rápido a ponto de tornar o útero, 48 h após a aplicação do luteolítico, um ambiente inapropriado para o desenvolvimento embrionário.

Uma das biotécnicas utilizadas na manipulação de embriões eqüinos é o resfriamento. Embriões acondicionados em meio crioprotetor e resfriados diminuem seu metabolismo e ritmo de crescimento permanecendo viáveis por até 24 h (20, 51, 52). Assim utiliza-se o frio para reduzir o metabolismo do embrião. Da mesma forma, a aplicação de luteolítico e conseqüente queda nas concentrações de progesterona poderia diminuir o metabolismo embrionário e prolongar sua viabilidade. No presente estudo não foi mensurado o tamanho do embrião, mas esta se faz necessária em estudos futuros para quantificar se há diminuição no crescimento do embrião colheitado 48 h após a aplicação do luteolítico.

As endometrites são grande causa de diminuição na fertilidade em éguas. Autores registraram maiores concentrações de proteínas do fluido uterino em éguas com endometrite que em éguas normais (5). Da mesma forma, éguas consideradas sensíveis a infecção uterina tendem a terem maiores concentrações de proteínas no fluido uterino que éguas resistentes. Desta forma, apesar dos lavados que se apresentaram turvos terem sido descartados, endometrites leves podem ter passado despercebidas e influenciado a concentração de proteínas no fluido uterino.

Éguas em diestro apresentam elevações nas concentrações de FSH, seguidas por ondas de crescimento folicular (29). De acordo com a dinâmica folicular da égua e a presença de grandes folículos no dia da aplicação do luteolítico, pode-se ter maior ou menor tempo até a ovulação subsequente. No presente estudo, o adiantamento da data de aplicação do luteolítico em 48 h em relação ao protocolo convencional não alterou ($P>0,05$) o intervalo luteolítico-ovulação (aproximadamente 10 dias em ambos os grupos experimentais), no entanto foi observada diferença ($P<0,05$) quanto ao período interovulatório. Esta diferença deve-se simplesmente a data de aplicação do luteolítico, visto que o intervalo luteolítico-ovulação foi semelhante e a diferença no período interovulatório variou em aproximadamente dois dias.

Considerando a estação reprodutiva de eqüinos da região de Ponte Nova e Matipó variando de setembro a abril (244 dias) e que o período interovulatório do grupo controle foi de 18,5 dias, seriam observados, aproximadamente, 13 ciclos estrais por égua. Aplicando-se o luteolítico 48 h antes da colheita do embrião, aproximadamente 15 ciclos estrais seriam obtidos (período interovulatório de 15,9 dias para o grupo tratado). Esta diferença de dois ciclos estrais por estação reprodutiva permitiria duas novas colheitas de embrião na égua doadora.

5. CONCLUSÃO

A aplicação de luteolítico 48 h antes da colheita e transferência de embriões mostrou-se um protocolo viável, gerando taxa de recuperação embrionária, qualidade embrionária e prenhez na égua receptora semelhantes aos animais tratados no dia da colheita do embrião. O período interovulatório foi menor e, conseqüentemente, maior número de estros de cada doadora por estação reprodutiva pode ser esperado. Os embriões eqüinos mantêm sua viabilidade 48 h após a aplicação de luteolítico, sendo resistentes à diminuição na concentração de progesterona por este período. A concentração de proteínas solúveis do fluido uterino não foi eficaz em predizer a taxa de recuperação embrionária.

CONCLUSÕES GERAIS

Conclui-se que a interação materno-fetal nos dias 8 e 9 pós-ovulação não é suficiente para gerar modificações significativas entre a ecogenicidade uterina e do corpo lúteo, diâmetro do corpo lúteo e tônus uterino e cervical de éguas prenhas e não prenhas. A análise da concentração de proteínas solúveis do fluido uterino é influenciada por diversos fatores que não somente a presença do embrião, sendo esta bastante variável e não eficaz para determinação indireta de condições viáveis para a manutenção da gestação.

A aplicação de luteolítico 48 h antes da colheita e transferência de embriões mostrou-se uma técnica viável, gerando taxa de recuperação embrionária, qualidade embrionária e prenhez da égua receptora semelhantes aos animais tratados no dia da colheita do embrião. Assim consegue-se período interovulatório menor e, conseqüentemente, maior número de estros de cada doadora durante a estação reprodutiva. Os embriões eqüinos mantêm sua viabilidade 48 h após a aplicação de luteolítico, sendo resistentes a queda na concentração de progesterona durante este período. Não foi possível determinar se a concentração de proteínas no fluido uterino foi responsável pela manutenção de ambiente uterino favorável ao desenvolvimento embrionário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, W.R. e COOPER, M.J. Prostaglandins. In: McKinnon, A.O. e VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger; 1993, 69-80.
2. ANDERSON, G.W.; GWAZDAUSKAS, F.C.; WHITTIER, W.D. et al. Uterine protein profiles in ovariectomized dairy cows administered progesterone and estradiol-17 . **Animal Reproduction Science** 11, 161-172, 1986.
3. ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A.; FLEURY, J.J. et al. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões eqüinos? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. V38, 2001.
4. ASBURY, A.C.; HALLIWELL, R.E.W.; FOSTER, G.W. et al. Immunoglobulins in uterine secretions of mares with differing resistance to endometrites. **Theriogenology** 14, 299-308, 1980.
5. BALL, B.A. Embryonic death in mares. In: McKinnon, A.O. e VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger; 1993, 517-531.
6. BALL, B.A.; LITTLE, T.V.; HILLMAN, R.B. et al. Pregnancy rates at days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertile mares. **Theriogenology** 26, 611-619, 1986.
7. BERG, S.L. e GINTHER, O.J. Effect of estrogens on uterine tone and life span of the corpus luteum in mares. **Journal of Animal Science** 47, 203-208, 1978.
8. BETTERIDGE, K.J. Comparative aspects of equine embryonic development. **Animal Reproduction Science** 60-61, 691-702, 2000.
9. BOGH, I.B.; STEEVES, T.; CARTWRIGHT, G. et al. Effects of a progesterone-induced protein with a molecular weight of 20 kDa (PIP-20) on carbohydrate

- metabolism and growth of day 8 equine embryos in culture. **Theriogenology** 58, 751-754, 2002.
10. BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; STEFFEN, S. et al. The effect of acetylsalicylic and captopril on uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology** 61, 301-309, 2004.
 11. BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; KOLBERG, B. et al. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology** 65, 2129-2138, 2002.
 12. BONAFOS, L.D.; CARNEVALE, E.M.; SMITH, C.A. et al. Development of uterine tone in nonbred and pregnant mares. **Theriogenology** 42, 1247-1255, 1994.
 13. BRUCK, I.; ANDERSON, G.A.; HYLAND, J. H. The influence of progesterone-induced proteins on glucose metabolism in early equine embryos. **Theriogenology** 47, 441-456, 1997.
 14. CHEVALIER, F. e PALMER, E. Ultrasonic echography in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supply** 32, 423-430, 1982.
 15. DAELS, P.F. e HUGHES J.P. The normal estrous cycle. In: McKinnon, A.O. e VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger; 1993, 121-132.
 16. DIAZ, F.J.; ANDERSON, L.E.; WU, Y.L. et al. Regulation of progesterone and prostaglandin F₂ production by the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology** 191, 65-80, 2002.
 17. DIPPERT, K.D.; JASKO, D.J.; SEIDEL, G.E. et al. Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares. **Theriogenology** 41, 1411-1423, 1994.
 18. ENGLE, C.C.; FOLEY, C.W.; PLOTKA, E.D. et al. Free amino acids and protein concentrations in reproductive tract fluids of the mare. **Theriogenology** 21, 919-930, 1984.
 19. FINDLAY, J.K; DRUMMOND, A.E.; DYSON, M.L et al. Recruitment and development of the follicle: the roles of the transforming growth factor-superfamily. **Molecular and Cellular Endocrinology** 191, 35 -43, 2002.
 20. FLEURY, J.J.; FLEURY, P.D.C.; LANDIN-ALVARENGA, F.C. Effect of embryo diameter and storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham's F-10 with Hepes Buffer at a temperature of 15-18°C – preliminary results. **Theriogenology** 58, 749-750, 2002.

21. FLOOD, P.F. Fertilization, early development and the establishment of the placenta. In: McKinnon, A.O. e VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger; 1993, 473-485.
22. FREEMAN, D.A.; WEBER, J.A.; GEARY, R.T. et al. Time of embryo transport through the mare oviduct. **Theriogenology** 36, 823-830, 1991.
23. GANDOLFI, T.A.L. e GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology** 55, 1255-1276, 2001.
24. GARRET, J.E.; GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T. et al. Evidence of maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **Journal of Reproduction and Fertility** 84, 437-446, 1988.
25. GINTHER, O.J. Embryonic loss in mares: incidence, time of occurrence, and hormonal involvement. **Theriogenology** 23, 77-89, 1985.
26. GINTHER, O.J. Embryonic loss in mares: incidence and ultrasonic morphology. **Theriogenology** 24, 73-86, 1985.
27. GINTHER, O.J. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. **Equine Veterinary Journal Supply** 3, 41-47, 1985.
28. GINTHER, O.J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. Cross Plains, WI, 238-417, 1992.
29. GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science** 60–61, 61–79, 2000.
30. GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; LEITH, G.S. et al. Embryonic loss in mares: incidence and ultrasonic morphology. **Theriogenology** 24, 73-86, 1985.
31. GINTHER, O.J. e PIERSON, R.A. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. **Theriogenology** 21, 505-516, 1984.
32. GRIFFIN, P.J.; CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Effects of the embryo on uterine morphology and function in mares. **Animal Reproduction Science** 31, 311-329, 1993.
33. GRIFFIN, P.J. e GINTHER, O.J. Uterine contractile activity in mares during the estrous cycle and early pregnancy. **Theriogenology** 34, 47-56, 1990.
34. GRIFFIN, P.J. e GINTHER, O.J. Dynamics of uterine diameter and endometrial morphology during the estrous cycle and early pregnancy in mares. **Animal Reproduction Science** 25, 133-142, 1991.

35. GRIFFIN, P.J.; HERMENET, M.J.; GINTHER, O.J. A transient increase in uterine tone during early diestrus in mares. **Theriogenology** 37, 1185-1190, 1992.
36. HANDLER, J.; WUSTENHAGEN, A.; SCHAMS, D. et al. Estrous cycle characteristics, luteal function, secretion of oxytocin (OT) and plasma concentrations of 15-keto-13,14-dihydro-PGF₂ (PGF₂ -metabolite) after administration of low doses of prostaglandin F₂ (PGF₂) in pony mares. **Theriogenology** 61, 1573-1582,2004.
37. HAYES, K.E.N. e GINTHER, O.J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology** 25, 581-590, 1986.
38. HAYES, K.E.N.; PIERSON, R.A.; SCRABA, S.T. et al. Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. **Theriogenology** 24, 465-477, 1985.
39. HINRICH, K.; KENNEY, R.M.; SHARP, D.C. Differences in protein content of uterine fluid related to duration of progesterone treatment in ovariectomised mares used as embryo recipients. **Equine Veterinary Journal Supply** 8, 49-55, 1989.
40. KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; GHINTER, O.J. Role of progesterone in mobility, fixation, orientation and survival of the equine embryonic vesicle. **Theriogenology** 27, 655-663, 1987.
41. KIMBALL, F.A.; WYNGARDEN, L. J. Prostaglandin F₂alpha specific binding in equine corpora lutea. **Prostaglandins** 13, 553-564, 1977.
42. LEBLANC, M.M.; HANSEN, P.J. e BUHI, W.C. Uterine protein secretion in postpartum and cyclic mares. **Theriogenology** 29, 1303-1316, 1988.
43. LEITH, G.S. e GHINTER, O.J. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology** 22, 401-408, 1984.
44. MCCUE, P. M. Superovulation. **Veterinary Clinics of North America** 12, 1-11, 1996.
45. MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D.K.; KEITH, S.L. et al. Equine embryo transfer: influence of endogenous progesterone concentration in recipients on pregnancy outcome. **Theriogenology** 51, 267, 1999.
46. MCDOWELL, K.J.; SHARP, D.C.; FAZLEABAS, A.T. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins synthesized and released by conceptuses and endometria from pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility** 89, 107-115, 1990.

47. MCDOWELL, K.J.; SHARP, D.C. e GRUBAUGH, W. Comparison of progesterone and progesterone + oestrogen on total and specific uterine proteins in pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility Supply** 35, 335-342, 1987.
48. MCDOWELL, K.J.; SHARP, D.C.; GRUBAUGH, W. et al. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. **Biology of Reproduction** 39, 340-348, 1998.
49. MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M. et al. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. **Theriogenology** 29, 1055-1063, 1988.
50. MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L.; SQUIRES, E.L. et al. Diagnostic Ultrasonography. In: McKinnon, A.O. e VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger; 1993, 266-302.
51. MOUSSA, M.; DUCHAMP, G.; MAHLA, R. et al. Comparison of pregnancy rates for equine embryos cooled for 24 h in Ham's F-10 and encare holding solutions. **Theriogenology** 58, 755-757, 2002.
52. MOUSSA, M.; TREMOLEDAC, J.L.; DUCHAMP, G. et al. Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5°C **Theriogenology** 61, 921-932, 2004.
53. NOGUEIRA, M.F.G.; MELO, D.S.; CARVALHO, L.M. et al. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF₂ and eCG? **Theriogenology** 61, 1283-1290, 2004.
54. POPE, W.F. Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. **Biology of Reproduction** 39, 999-1003, 1988.
55. PYCOCK, J.F.; DIELEMAN, S.; DRIFJHOUT, P. et al. Correlation of plasma concentrations of progesterone and oestradiol with ultrasound characteristics of the uterus and duration of oestrous behavior in the cycling mare. **Reproduction of Domestic Animals** 30, 224-227, 1995.
56. RAMADAN, A.A. e HASSAN, H.M. Isolation of immunologically active uterine luminal proteins associated with follicular and luteal phases of the ovary in buffalo (*Bubalus bubalus*). **Theriogenology** 51, 1183-1196, 1999.
57. RE, G.; BADINO, P.; NOVELLI, A. et al. Distribution of cytosolic oestrogen and progesterone receptors in the genital tract of the mare. **Research in Veterinary Science** 59, 214-218, 1995.

58. SHARP, D.C. Factors associated with the maternal recognition of pregnancy in mares. **Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice** 227-290, 1980.
59. SHIDELER, R.K.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L. et al. Progestagen therapy of ovariectomized pregnant mares. **Journal of Reproduction and Fertility Supply** 32, 459-464, 1982.
60. SISTEMA DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS E GENÉTICA (SAEG), UFV, Central de Processamento de Dados, Viçosa-MG, 1999.
61. SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry** 150, 76-85, 1985.
62. SQUIRES, E.L. Embryo transfer. In: McKinnon, A.O. e VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger; 1993, 357-367.
63. SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; MCCUE, P.M. et al. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology** 59, 151-170, 2003.
64. SQUIRES, E.L.; WENTWORTH, B.C.; GHINTER, O.J. Progesterone concentrations in blood of mares during the estrous cycle, pregnancy and after hysterectomy. **Journal of Animal Science** 39, 759-767, 1974.
65. STATISTICA (sistema de análise de dados, versão 6). StatSoft, Inc. (2001) www.statsoft.com
66. STEWART, F.; CHARLESTON, B.; CROSSETT, B. et al. A novel uterine protein that associates with the embryonic capsule in equids. **Journal of Reproduction and Fertility** 105, 65-70, 1995.
67. TUNÓN, A-M.; RODRÍGUES –MARTÍNEZ, H.; HÚLTEN, C. et al. Concentrations of total protein, albumin and immunoglobulins in undiluted uterine fluid of gynecologically healthy mares. **Theriogenology** 50, 821-831, 1998.
68. VAN CAMP, S.D. Uterine abnormalities. In: McKinnon, A.O. e VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger; 1993, 473-485.
69. VAN NIEKERK, C.H. e MORGENTHAL, J.C. Fetal loss and the effect of stress on plasma progestagen levels in pregnant Thoroughbred mares. **Journal of Reproduction and Fertility Supply** 32, 453-457, 1982.
70. VANDERWALL, D.K.; BETSCHART, R.W.; SQUIRES, E.L. Effect of PGF₂ and 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂ (PGFM) on corpora luteal function in nonpregnant mares. **Theriogenology** 53, 1263-1271, 2000.

71. VILLAHOZ, M.D.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L. et al. Some observations on early embryonic death in mares. **Theriogenology** 23, 915-924, 1985.
72. WEBER, J.A.; FREEMAN, D.A.; VANDERWALL, D.K. et al. Prostaglandin E₂ hastens oviductal transport of equine embryos. **Biology of Reproduction** 45, 544-546, 1991.
73. WEBER, J.A.; CAUSEY, R.C.; EMMANS, E.E. Induction of luteolysis in mares by ultrasound-guided intraluteal treatment with PGF₂alpha. **Theriogenology** 55, 1769-1776, 2001.
74. WIDDERS, P.R.; STOKES, C.R.; DAVID, J.S.E. et al. Effect of cycle stage on immunoglobulin concentrations in reproductive tract secretions of the mare. **Journal of Reproductive Immunology** 7, 233-242, 1985.
75. WILLIAMSON, P.; DUNNING, A.; O'CONNOR, J. et al. Immunoglobulin levels, protein concentrations and alkaline phosphatase activity in uterine flushings from mares with endometrites. **Theriogenology** 19, 441-448, 1983.
76. WOODS, G.L.; BAKER, C.B.; BALDWIN, J. et al. A field study on early pregnancy loss in Standardbred and Thoroughbred mares. **Equine Veterinary Science** 5, 264-267, 1985.
77. WÜSTENHAGEN, A.; HANDLER, J.; KINDAHL, H. et al. Luteal function and estrous cycle characteristics in mares treated with subtherapeutic doses of prostaglandin F₂. **Theriogenology** 58, 537-539, 2002.
78. ZAVY, M.T.; BAZER, F.W.; SHARP, D.C. et al. Uterine luminal proteins in the cycling mare. **Biology of Reproduction** 20, 689-698, 1979.
79. ZAVY, M.T.; MAYER, R.; VERNON, M.W. et al. An investigation of the uterine luminal environment of the non-pregnant and pregnant pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility Supply** 27, 403-411, 1979.
80. ZAVY, M.T.; SHARP, D.C.; BAZER, F.W. et al. Identification of stage-specific and hormonally induced polypeptides in the uterine protein secretions of the mare during the oestrous cycle and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility** 64,199-207, 1982