

CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE UTERINO EM ÉGUAS RECEPTORAS ACÍCLICAS DE EMBRIÕES

CHARACTERIZATION OF THE UTERINE ENVIRONMENT IN ACYCLIC EMBRYO RECIPIENT MARES

CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE UTERINO EN YEGUAS RECEPTORAS DE EMBRIONES ACÍCLICOS

 <https://doi.org/10.56238/arev7n9-009>

Data de submissão: 05/08/2025

Data de publicação: 05/09/2025

Juli Angélica Narváez Cancimansi

Doutor em Ciências Animal

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)

E-mail: jancvet@gmail.com

José Renato Costa Caiado

Doutor em Produção Animal

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)

E-mail: jrccaiado@uenf.br

Eduardo Shimoda

Doutor em Produção Animal

Instituição: Universidade Cândido Mendes (UCAM)

E-mail: shimoda@ucam-campos.br

José Frederico Straggiotti Silva

Doutor em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade de Medicina Veterinária de Hannover (TiHo) - Alemanha, Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Universidade Estadual do Norte

Fluminense Darcy Ribeiro

E-mail: straggio@uenf.br

RESUMO

Foram avaliadas 19 éguas sadias em anestro sazonal quando submetidas à progesterona de longa ação em duas diferentes doses. Baseados nestas condições, dois grupos experimentais foram conformados e avaliados em diferentes tempos. Foram estudadas as seguintes características: concentração de P4 plasmática mediante radioimunoensaio (RIA), concentração de proteína presente no líquido uterino obtido mediante lavado uterino com baixo volume mediante o método do ácido Bicíncônico (BCA), assim como, perfil proteico através de eletroforese unidimensional (SDS-PAGE 12%). As bandas de interesse provenientes da eletroforese foram submetidas à digestão com tripsina e analisadas por espectrometria de massas (LC-MSE) para posterior identificação pela ferramenta BLAST/NCBI. Os resultados demonstraram que a aplicação de benzoato de estradiol aumentou concentração de progesterona plasmática de 0,55 para 30,15 ng/mL no G1 ($p<0,05$), e de 12,03 ng/mL para 16,50 no G2, não havendo diferença significativa. Não houve diferença significativa na concentração de progesterona plasmática entre os dias avaliados do G2. No G1 não foi observada diferença significativa ($p<0,05$) para as concentrações de proteína no líquido uterino. No G2, a média da concentração de

proteína no D4 ($0,31\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foi inferior quando comparada com a média do D9 ($0,78 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). A eletroforese e espectrometria demonstrou o aparecimento da uterocalina nos dois grupos no D4, até o D15 e D9 do G1 e G2, respectivamente. A presença da Lipocalina 2 e uteroferina foi constatada unicamente no D15 do G1. A expressão e concentração das proteínas uterinas foram dependentes da dose administrada de P4LA em éguas em anestro.

Palavras-chave: Progesterona. Uteroferina. Uterocalina. Anestro. Égua.

ABSTRACT

Nineteen healthy mares in seasonal anestrus were evaluated when subjected to long-acting progesterone at two different doses. Based on these conditions, two experimental groups were formed and evaluated at different times. The following characteristics were studied: plasma P4 concentration by radioimmunoassay (RIA), protein concentration present in the uterine fluid obtained by low-volume uterine lavage using the bicinchoninic acid (BCA) method, as well as protein profile by one-dimensional electrophoresis (SDS-PAGE 12%). The bands of interest from the electrophoresis were subjected to trypsin digestion and analyzed by mass spectrometry (LC-MSE) for subsequent identification by the BLAST/NCBI tool. The results demonstrated that the application of estradiol benzoate increased the plasma progesterone concentration from 0.55 to 30.15 ng/mL in G1 ($p<0.05$), and from 12.03 ng/mL to 16.50 in G2, with no significant difference. There was no significant difference in the plasma progesterone concentration between the days evaluated in G2. In G1, no significant difference ($p<0.05$) was observed for the protein concentrations in the uterine fluid. In G2, the mean protein concentration on D4 ($0.31\mu\text{g}/\mu\text{L}$) was lower when compared to the mean on D9 ($0.78\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Electrophoresis and spectrometry demonstrated the appearance of uterocalin in both groups on D4, up to D15 and D9 of G1 and G2, respectively. The presence of Lipocalin 2 and uteroferin was observed only on D15 of G1. The expression and concentration of uterine proteins were dependent on the administered dose of P4LA in anestrous mares.

Keywords: Progesterone. Uteroferin. Uterocalin. Anestrous. Mare.

RESUMEN

Diecinueve yeguas sanas en anestro estacional fueron evaluadas al ser sometidas a progesterona de acción prolongada en dos dosis diferentes. Con base en estas condiciones, se formaron dos grupos experimentales y se evaluaron en diferentes momentos. Se estudiaron las siguientes características: concentración plasmática de P4 por radioinmunoensayo (RIA), concentración proteica presente en el fluido uterino obtenido por lavado uterino de bajo volumen utilizando el método del ácido bicinchonínico (BCA), así como el perfil proteico por electroforesis unidimensional (SDS-PAGE 12%). Las bandas de interés de la electroforesis fueron sometidas a digestión con tripsina y analizadas por espectrometría de masas (LC-MSE) para su posterior identificación mediante la herramienta BLAST/NCBI. Los resultados demostraron que la aplicación de benzoato de estradiol incrementó la concentración plasmática de progesterona de 0,55 a 30,15 ng/mL en G1 ($p<0,05$), y de 12,03 ng/mL a 16,50 en G2, sin diferencia significativa. No se observaron diferencias significativas en la concentración plasmática de progesterona entre los días evaluados en G2. En G1, no se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) en las concentraciones de proteínas en el fluido uterino. En G2, la concentración media de proteínas en D4 ($0,31 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) fue menor en comparación con la media en D9 ($0,78 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). La electroforesis y la espectrometría demostraron la presencia de uterocalina en ambos grupos en D4, hasta D15 y D9 en G1 y G2, respectivamente. La presencia de lipocalina 2 y uterocalina se observó solo en D15 en G1. La expresión y la concentración de proteínas uterinas dependieron de la dosis administrada de P4LA en yeguas en anestro.

Palabras clave: Progesterona. Uteroferrina. Uterocalina. Anestro. Yegua.

1 INTRODUÇÃO

Segundo Rambags (2007), apesar do avanço em termos de desempenho reprodutivo, através da aplicação de novas técnicas reprodutivas, a incidência da perda precoce de prenhes continua sendo uma fonte significativa de perdas econômicas para o agronegócio, desta maneira é importante desvendar os processos iniciais relacionados ao ambiente uterino antes e durante o inicio de prenhes.

Em equinos, o desenvolvimento do embrião antes da fixação e implantação, depende unicamente do ambiente uterino circundante que suprem nutrientes e estimula o crescimento (RAMBAGS 2007). O útero tem o papel importante de promover a ciclicidade dos eventos reprodutivos nas éguas não prenhes; de receber o embrião oferecendo um ambiente e nutrição adequados, favorecendo assim seu crescimento e manutenção. O ambiente adequado é preparado pela síntese e secreção de substâncias ao lúmen o que depende de progesterona. Entre essas substâncias podemos encontrar proteínas, lipídeos, carboidratos, aminoácidos e íons como cálcio, entre outros (ASHWORTH 1995).

Em programas de transferência de embriões equinos (TEE), as receptoras de embriões são um importante fator que incide de forma preponderante no custo e no sucesso da mesma. Para a escolha de uma égua receptora em um programa de TEE, é necessária a apresentação de uma série de qualidades que demonstrem sua aptidão para o recebimento de um embrião. Entre elas podemos citar saúde uterina, avaliada por meio de exame citológico; palpação retal (cerviz firme e fechado e útero tônico, arredondado e tubular); no exame ultrassonográfico (deve ser observado a eco textura homogênea e a presença de uma linha branca no corpo do útero que é identificada como a sobreposição intima das superfícies luminais) (SQUIRES 2006). Além disto, a presença de um corpo lúteo de bom tamanho e boa ecogenicidade em éguas cíclicas (SQUIRES et al., 2003; CARNEVALE et al., 2000). No caso de éguas acíclicas ou em anestro preparadas com progesterona é necessário, inicialmente, ovários pequenos com folículos ≤ 20 mm e sem corpo lúteo e que tenham edema endometrial significativo depois da aplicação de 10 mg I.M. de 17β -estradiol (ZERLOTTI 2012). Embora, estas características sejam importantes sabemos que existem outros fatores endógenos relacionados à presença e concentração de elementos inorgânicos, proteínas, enzimas, hormônios e outras substâncias presentes nas secreções uterinas que favorecem o crescimento e desenvolvimento do embrião até sua fixação e posterior implantação (ASHWORTH 1995).

2 JUSTIFICATIVA

O aumento do período de inovulação de receptoras tem sido sempre um desafio que possibilita recompensas na redução de custos da técnica. O período de inovulação das receptoras cíclicas varia do

2º dia pós-ovulação (aplicando progesterona de ação diária em receptoras a partir do D0 (dia da ovulação) (CAIADO et al., 2007) até D8 (dia 8 pós-ovulação). Em éguas em anestro, este tempo varia desde o dia 3 (D3) até o dia 8 (D8) pós aplicação de 1500 mg de progesterona de longa ação (P4LA) (ZERLOTTI 2012). É de grande importância aumentar este lapso de tempo da inovulação para além desse período, de forma que esta intervenção venha a incidir nos custos da TEE, otimizando a utilização das receptoras acíclicas. Para tanto, deve-se caracterizar o ambiente uterino neste período útil para assim, compreender os mecanismos uterinos responsáveis pela perda crescente da faculdade de manter um embrião inovulado a partir do D7, com o intuito de intervir e reverter estas circunstâncias.

3 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi determinar a presença das substâncias abordadas na metodologia e suas possíveis variações no período experimental, com o intuito de conhecer quais são as condições uterinas específicas que caracterizam o período de inovulação embrionária em éguas em anestro que permitem unicamente receber e manter a viabilidade embrionária.

4 REFERÊNCIAL TEÓRICO

A égua é um animal poliéstrico sazonal que, anualmente apresenta distintas fases quanto ao ciclo reprodutivo, determinado principalmente pela mudança do fotoperíodo. Estudos realizados na década dos 70 e 80 demonstraram que, a diminuição do fotoperíodo durante o outono e o inverno suprimem a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), mediado por alterações na secreção de melatonina pela glândula pineal (GINTHER, 1992). Os baixos níveis de GnRH resultam na redução marcada das concentrações de LH (10 a 20 vezes) e não tão marcada para as concentrações do hormônio folículo-estimulante (FSH), levando assim, à redução do crescimento folicular e subsequentemente à anovulação. Com o aumento da duração dos dias durante a primavera, o estímulo luminoso aumenta, e a síntese e secreção de melatonina é inibida, acarretando a liberação do GnRH pelo hipotálamo que estimula a liberação dos hormônios FSH e LH pela hipófise anterior, desencadeando o recomeço do crescimento folicular e eventualmente a ovulação (GINTHER 1992).

O anestro sazonal têm sido dividido em três períodos: transição de outono, correspondente ao período de declínio de atividade ovariana e do eixo hipotálamo-hipofise-ovário; anestro profundo, correspondente ao período de inverno, caracterizado pela diminuição quase total da atividade do eixo e presença de folículo de tamanho < 20 mm (AURICH 2011); e a transição de primavera um período de reinício das atividades do eixo (DONADEU et al., 2007; WILLIAMS et al., 2012,).

Estudos baseados em mensurações hormonais de fluido folicular determinaram que as concentrações de estradiol, andrógenos e progesterona foram mais baixas em folículos anovulatórios no período de transição, quando comparadas com folículos ovulatórios da época de monta, e que, os valores mais baixos foram apresentados nos folículos <12 mm, presentes no período de anestro profundo (DONADEU 2006).

Nos períodos de transição é comum o uso de estratégias de alimentação diferenciada, tratamento hormonal ou com luz artificial que antecipam ou mantêm o ciclo reprodutivo prevendo o uso das receptoras. Já no período de anestro profundo têm sido desenvolvidos protocolos hormonais que permitem a utilização destas receptoras nos programas de TE com ótimos resultados (CARNEVALE et al., 2000; ROCHA FILHO et al., 2004). Estes protocolos priorizam o uso de estrógeno e progesterona, mimetizando assim o ciclo reprodutivo e, portanto, a preparação do útero para inovação embrionária. As taxas de gestação nas receptoras em anestro são similares às das receptoras cíclicas e, portanto, o uso destas nos programas de TE tem tido sucesso.

Hinrichs e colaboradores (1986) em um estudo com éguas ovariectomizadas, realizaram tratamento apenas com altrenogest (dose de 22 mg e 66 mg por dia) ou progesterona (300 mg por dia) e obtiveram baixas taxas de prenhez em relação ao grupo controle (éguas cíclicas não tratadas) (1/6, 2/6 e 2/5 e 13/19), sendo considerado resultado negativo, provavelmente, relacionado ao não uso do estradiol. Em 1988, Mckinnon e colaboradores, trataram éguas receptoras de embriões, ovariectomizadas com estradiol e progesterona conseguindo taxas de prenhez de 70% quando comparadas com o grupo controle (80%). Atualmente sabe-se que a aplicação do estradiol é necessária para a formação dos receptores para P4, sendo importante sua aplicação ante do inicio do tratamento com P4 exógena.

Segundo Jasko (2002), um dos desafios que possibilita a diminuição de custos da técnica de TEE, é aumentar o período de uso das receptoras que normalmente era de 4 até 9 dias pós-ovulação. Caiado e colaboradores (2007) conseguiram ampliar este tempo de uso para inovação dessas receptoras, ao utilizarem receptoras de embriões dois dias após ovulação (D2), desde que tratadas com progesterona no dia da ovulação. Eles obtiveram taxas de gestação de 72,72% nas receptoras tratadas e 76,36% nas receptoras não tratadas usadas a partir do D5, mostrando que as taxas de prenhes foram similares estatisticamente. Outro estudo demonstrou que, ao inovular receptoras no segundo dias após ovulação obteve 71% na taxa de prenhes, quando estas eram tratadas com 1500 mg de P4LA no dia da ovulação, não havendo diferença estatística com o grupo controle, de receptoras inovuladas no quarto (D4) ao oitavo (D8) dias após a ovulação (RODRIGUES 2009).

Variações destes tratamentos têm sido usadas na prática diária de centrais de reprodução, com bons resultados. Em éguas receptoras cíclicas, têm sido empregadas receptoras no D2 após ovulação, com aplicação de 600 mg I.M. de P4LA (no dia da ovulação, D0), obtendo como resultado gestações positivas. Em éguas acíclicas, é de rotina, a aplicação de benzoato de estradiol (9 mg I.M.) e 48 horas depois, a aplicação de P4LA (1500 mg I.M.), podendo ser usadas a partir do D2 até o D8 após a aplicação da P4LA (BARRETO 2012 comunicação pessoal).

Testa e colaboradores (2005) utilizaram receptoras acíclicas tratadas com cipionato de estradiol e P4LA e verificaram a taxa de perda embrionária precoce, sendo esta semelhante entre as éguas cíclicas (controle) (13%) e as acíclicas tratadas (15%).

Zerlotti (2012) comparou as taxas de prenhes aos 12 e 50 dias de gestação entre receptoras cíclicas e acíclicas usadas no período compreendido entre fevereiro e agosto de 2009 e não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos. O grupo de receptoras acíclicas, com folículos ≤ 20 mm e sem CL, receberam 10 mg de 17β -estradiol, I.M., e aproximadamente 48h depois, apenas as éguas com edema endometrial significativo receberam 1500 mg de P4, intramuscular. O grupo das éguas cíclicas, quando em estro, foram induzidas com 1,5 mg de deslorelin e posteriormente foi confirmada a ovulação. As éguas cíclicas receberam embrião a partir do D3 até o D7 e as éguas acíclicas a partir do D3 até o D8. As taxas de prenhes das éguas cíclicas e acíclicas no dia 12 foram de 91% e 84% e no dia 50 de 89% e 72%, respectivamente.

O fornecimento contínuo da progesterona materna é a condição mais importante para a manutenção da gestação que é, inicialmente conseguido pelo prolongamento do tempo de vida do CL primário. Este processo de prolongamento é reconhecido como reconhecimento materno da gestação e é inicialmente coordenado pelo embrião (ALLEN 2001). Em equinos, a sinalização para o reconhecimento materno deve começar antes do dia 10 da ovulação e ser finalizada antes do dia 14-16 (HERSHMAN; DOUGLAS, 1979), momento este crucial para manutenção do CL. Como resultado da forma esférica concedida pela cápsula e das contrações miometriais, se obtém uma interação completa do embrião com o endométrio, suprimindo assim, a liberação cíclica da PGF 2α , sendo considerado o mecanismo antiluteolítico (STOUT; ALLEN, 2001). Estudos têm demonstrado que este mecanismo antiluteolítico é baseado na supressão dos receptores de ocitocina no endométrio. Durante os dias 10 a 16 depois da ovulação, o aumento em numero dos receptores de ocitocina e a liberação de PGF 2α responsiva a ocitocina, que fundamentam a luteólise cíclica, são eliminados completamente em éguas prenhas. É conhecido que o embrião equino secreta substâncias como PGE2 e PGF 2α (STOUT; ALLEN, 2002), IGF-1 e estrógenos (WALTERS et al., 2001) que, se não estão relacionados diretamente com o mecanismo de reconhecimento, têm um papel importante no processo de migração

(ALLEN 2001), aumento da vascularidade e estabelecimento e manutenção de um ambiente capaz de suportar a prenhes (WALTERS et al., 2001).

O embrião equino somente chega ao útero após atingir um estágio de maturidade que lhe permita a secreção de prostaglandina E2 (PGE₂), o que ocorre a partir do quinto dia após a ovulação. Este retardo pode ser necessário para que a chegada somente ocorra no momento em que o útero já esteja hormonalmente preparado para nutrir o embrião. A preparação do ambiente uterino para manter o crescimento e desenvolvimento embrionário equino depende criticamente das concentrações circulantes de esteroides reprodutivos maternos, principalmente, a progesterona que é essencial para a manutenção da gestação, pois, esta prepara o útero para a chegada do embrião estimulando a proliferação das glândulas endometriais (KENNEY 1978) que produzem substâncias histotróficas ricas em proteínas (leite uterino), considerada como a única fonte de nutrientes para o embrião antes da implantação (ALLEN, 2001).

Zavy e colaboradores (1982) demonstraram que a presença de muitas proteínas na secreção uterina de éguas estava associada com as mudanças cíclicas dos hormônios esteroidais ao longo do ciclo estral e a gestação precoce. Também foi comprovado que a albumina sérica está presente em lavados uterinos de éguas prenhas e não prenhas ao longo do ciclo e que a atividade da fosfatase ácida, provavelmente, estaria envolvida no transporte de ferro, sendo maior nos dias 16 a 20 pós-ovulação em éguas prenhas quando comparado com éguas vazias (ZAVY et al., 1982). Certos polipeptídeos com peso molecular na faixa de 15.000 a 23.000 e 32.000 a 45.000 aumentaram progressivamente durante a gestação a partir do dia 12, entretanto, unicamente estiveram presente entre os dias 12 a 18. As mesmas proteínas apareceram nas secreções uterinas de éguas ovariectomizadas tratadas com progesterona ou estrógeno seguido de progesterona, o que indicou que esses polipeptídeos foram induzidos pela progesterona. A diminuição da concentração total de proteínas na secreção uterina ao longo do ciclo estral está relacionada com o declínio dos níveis séricos de progesterona. Como resultado da permanente produção de progesterona associado à atividade do corpo lúteo, o conteúdo proteico da secreção uterina se mantém elevado (ZAVY et al., 1979) e muitas dessas proteínas são essenciais para o crescimento e desenvolvimento embrionário.

As secreções uterinas ou histotróficas são um componente crítico para a sobrevivência inicial dos embriões, funcionando como o único fornecimento de nutrientes necessários para o conceito em desenvolvimento (MULLEN et al., 2012) O histotrofo, contém proteínas essenciais para o desenvolvimento do conceito (BAZER et al., 2011) e as principais proteínas encontradas são a uteroglobina (UGL), a uteroferrina (UF) e a uterocalina (UCA ou proteína P19), uma das maiores

proteínas secretada unicamente pelo endométrio da égua (BEIER-HELLWIG et al., 1995; HOFFMAN et al., 2009).

A uterocalina (UC) é a proteína uterina mais dependente de progesterona e é a de maior expressão durante o início da gestação e o período de formação dos cálices endometriais, possuindo massa molecular aproximada de 18,8 kDa (CROSSETT et al., 1996; ELLEBERGER et al., 2008). Estudos iniciais mostraram que a uterocalina é incorporada pela cápsula embrionária e transporta pequenas moléculas hidrofóbicas provenientes da égua para o embrião. Entre as moléculas transportadas estão minerais vitais, lipídeos (ácidos graxos poli-insaturados importantes para o metabolismo energético) e vitaminas (vitamina A na forma de retinol importante na formação tecidual durante a embriogênese, na hematopoiése e diferenciação celular) (CROSSET et al., 1996, SUIRE et al., 2001). A cessação da secreção coincide com a desintegração da cápsula embrionária, indicando que a UC é essencial para a manutenção do embrião antes que o contato direto entre os tecidos fetais e maternos sejam estabelecidos (SUIRE et al., 2001). Em estudos de imunomarcação endometrial dessa proteína, foi observado que a marcação no epitélio endometrial diminui por volta do dia 25 da gestação e aumenta por volta do dia 40 quando se inicia a formação dos cálices endometriais e permanece estável até a degeneração dos cálices ao redor do dia 100-120 da gestação, este período é caracterizado pelo aumento das concentrações séricas de P4. As concentrações da UC permanecem presentes em níveis mínimos até o termo da gestação (ELLEBERGER et al., 2008).

A uteroferrina (UF) é outra proteína endometrial induzida pela progesterona, de massa molecular aproximada de 35 kDa, tem sido encontrada em secreções uterinas de éguas prenhas (ELLEBERGER et al., 2008). Tem um papel importante no transporte de ferro desde o endométrio materno para o embrião (McDOWELL et al., 1982) e atua como fator de crescimento hematopoietico no desenvolvimento embrionário (DUCSAY et al., 1984; HOFFMANN et al., 2009; PADUA et al., 2012). Esta proteína pode ser tanto empacotada em lisozimas ou liberada ao lúmen uterino (PADUA et al., 2012). Um estudo realizado em éguas ovariectomizadas mostrou que administração de progesterona aumentou a uteroferrina nas secreções uterinas e que, o estrógeno atuou sinergicamente junto à progesterona para aumentar a secreção (McDOWELL et al., 1987) e em éguas prenhas, a secreção é induzida pela progesterona e o efeito sinérgico é do estrógeno, liberado pelo embrião equino (BAZER et al., 1991). Estudos de imunohistoquímica demonstraram que, a secreção da uteroferrina durante o ciclo estral na égua é máxima nas glândulas endometriais desde o meio até o final do diestro, parecendo ter uma relação com a diminuição das concentrações séricas de progesterona (HOFFMANN et al., 2003) e na prenhas sua produção aumenta a partir do dia 38 da gestação quando os cálices endometriais são formados e permanece assim até o termo da gestação (ELLEBERGER et al., 2008).

Lipocalina 2 (LCN2) ou Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL), é uma lipocalina associada ao transporte de pequenos compostos e ao parecer responsável da imunidade inata da mucosa, com propriedades antibacterianas devido ao seu papel no sequestro de ferro privando as bactérias deste elemento (LI e CHAN, 2011). O gene codificador de LCN2 é responsivo ao estrógeno e aumenta no inicio da gestação, sua função tem sido considerada importante desde que reconhece e facilita a ligação de sideróforos bacterianos impedindo então a aquisição de ferro pelas bactérias, causando, assim, a morte dela. (STUCKEY et. al, 2006; LI et al., 2011). Segundo Hayes e colaboradores (2012) a lipocalina foi a quarta proteína mais abundante no fluido uterino de éguas prenhas, sendo que no dia 20 as quantidades no fluido uterino foram maiores em éguas prenhas do que em éguas não prenhas. Segundo um estudo realizado em éguas com endometrite, sua presença no útero não teve diferença significativa quando comparado com éguas sadias (AMORIM, 2014).

Outra proteína de grande importância é a uteroglobina (UG) que ajuda a manter a prenhes protegendo as células trofoblásticas do sistema imune de defesa da mãe, tendo também atividade anti-inflamatória e anti-quimiotática (MIELE et al., 1990).

A proteína ligante-cálcio calbindina-D9K (CAL) é uma proteína citosólica pequena expressa pelo útero que transporta cálcio desde a parte baso-lateral para o ápice do epitélio glandular e desde o sangue até o lúmen do útero, mantendo estáveis as concentrações de cálcio intraluminal através do ciclo estral (WOODING et al., 1996).

Um total de 17 genes que se acredita contribuir para um "endométrio receptivo" para o desenvolvimento e viabilidade embrionária foram avaliados por RTqPCR. Dos genes avaliados, a expressão de FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos-2) diminuiu com aumento do comprimento do estro anterior, enquanto a expressão de P19 (uterocalina) foi maior no grupo de estro longo do que nos grupos de estro curto ou sem estro. Em conclusão, uma menor abundância de FGF-2 e maior abundância de uterocalina, uma proteína lipocalina conhecida por desempenhar um papel importante no fornecimento de lipídios ao embrião, pode contribuir para um endometrio mais receptivo (SILVA et al., 2019).

A diferença na abundância das proteínas entre as éguas cíclicas e inseminadas no 5º dia de pós-ovulação deste estudo, demonstrou alterações proteicas necessárias no ambiente uterino antes da entrada do conceito no útero. As proteínas envolvidas na resposta imunológica e no metabolismo do ferro, apresentam significativas alterações na sua abundância durante a prenhez inicial, provavelmente como rota de sinalização do embrião dentro do ambiente ovidutal para o útero e como um mecanismo de preparação endometrial para a implantação e desenvolvimento de um potencial embrião equino (BUITRAGO 2019).

5 MATERIAL E MÉTODO

Foram usadas 20 éguas sadias, em anestro, entre três e 18 anos de idade, localizadas em haras na região Norte Fluminense-RJ. A amostragem foi realizada fora da estação de monta no período de inverno nos meses de julho e agosto. As éguas foram mantidas em regime de campo com gramíneas (*Brachiaria humidicola*, *Brachiaria purpurascens* e *Panicum maximum*), água e sal mineral *ad libitum*.

O trabalho se dividiu em experimento I, com a avaliação do efeito da aplicação de 3000 mg I.M. de P4LA (300 mg/mL) sobre a concentração de progesterona plasmática e perfil proteico uterino de 11 éguas sadias em anestro sazonal pré-induzidas a estro com 9 mg I.M. de benzoato de estradiol (BE) (3 mg/mL) e experimento II, utilizando 1500 mg I.M. de P4LA (150 mg/mL) em 9 éguas. A aplicação do BE (dia -2) foi realizada 48 h antes da aplicação da P4LA nos dois experimentos. No primeiro dia (-2) foi realizado em todas as éguas o exame ultrassonográfico e palpação do trato reprodutivo, para constatação do anestro; coleta de sangue, para determinação de concentração de progesterona sérica e aplicação do BE. No dia 0 (D0), foi realizada a citologia, para confirmação de saúde uterina, coleta de sangue e aplicação de P4LA, assim como o exame ultrassonográfico e palpação em todas as éguas. Foi realizada também, a obtenção de fluido uterino (OFU) unicamente em três éguas para amostragem do dia. O exame ultrassonográfico, palpação e coleta de sangue foi realizado no experimento I nos dias 4 (D4), 8 (D8), 12 (D12) e 15 (D15) após aplicação da P4LA e no experimento II nos dias 4 (D4), 7 (D7) e 9 (D9). A OFU, por ser uma intervenção que altera o ambiente uterino foi realizada uma única vez em um dado grupo de éguas, em um determinado dia do protocolo, sem ser repetida na mesma égua durante o decorrer do experimento.

A coleta de sangue foi realizada em todas as éguas e em todos os dias de avaliação de cada um dos experimentos sempre às 8 horas da manhã antes da realização de qualquer outro procedimento. O sangue obtido por punção na veia jugular foi depositado em tubos estéreis heparinizados, preservados a 5 °C. Posteriormente, foi centrifugado a 1500 G por 3 minutos para obtenção do plasma. Logo após, o plasma foi aliquotado em microtubos de 1,5 mL de polipropileno e congelados a -20 °C até o dia da análise progesterona plasmática.

O fluido uterino foi obtido como descrito por Alghamdi (2005) com modificações. Com ajuda de uma pipeta de inseminação flexível de 70 cm de cumprimento (PROVAR®), foram infundidos 50 mL de soro fisiológico aquecido a 37°C no útero, posteriormente, o útero foi massageado por 5 minutos, e com ajuda de um tampão feminino O.B.® (Johnson & Johnson) adaptado a um aplicador de aço inox estéril, foi coletado o líquido presente no útero. Com o objetivo de facilitar a retirada do tampão foi feita uma extensão ao fio de remoção com fio grosso estéril que ficou exposto à parte externa 5 cm abaixo da comissura ventral da vagina. Transcorrido os 5 minutos o tampão foi extraído

com a mão enluvada por via vaginal, puxando o fio de remoção e evitando o contato do tampão com as paredes vaginais. Depois da recuperação do tampão, este foi colocado dentro de uma seringa de 50 mL estéril, e pressionado até recuperar todo o líquido absorvido em um tubo tipo Falcon® estéril de 15 mL. As amostras foram resfriadas a 5 °C, centrifugadas a 1500G/10min. O sobrenadante foi separado em microtubos de 1,5 mL devidamente marcados e separados para análise proteica. Posteriormente, as amostras foram congeladas a -20 °C.

As concentrações de progesterona foram determinadas pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida, sendo utilizado o conjunto diagnóstico comercial da Beckman Coulter Laboratories®. Os procedimentos laboratoriais foram realizados de acordo com a metodologia proposta pelo fabricante. A leitura foi realizada através do contador gama Wizard 2470. Foram realizados dois ensaios. O controle de qualidade do RIE foi realizado através do coeficiente de variação intra-ensaio para cada ensaio sendo 0,45 % e 1,14 %, e o coeficiente de variação interensaio foi de 0,87 %. A sensibilidade mínima detectada para os dois ensaios foi 0,065 ng/ml. As concentrações das amostras foram expressas em ng/mL.

O conteúdo proteico foi determinado pelo método de BCA (ácido bicinconílico) segundo SMITH et al. (1985), utilizando albumina sérica bovina como padrão. A dosagem proteica foi feita utilizando uma microplaca de 96 poços e a absorbância foi medida em um aparelho leitor de microplacas (Thermo plate TP-Reader) no comprimento de onda de 562 nm. Para identificação das proteínas presentes nas amostras foi realizado eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) para evidenciar o aparecimento de proteínas no decorrer do tempo de cada um dos experimentos e conhecer o peso molecular; posteriormente, foi realizada a espectrometria de massas (MS) para identificação das proteínas. Foi empregado o método descrito por Laemmli (1970), uma alíquota das amostras de fluido intrauterino foi diluída em tampão de amostra com SDS e β-mercaptoetanol (TRIS/HCL 0,5M Ph 6,8 contendo glicerol 10%, SDS 10% e azul de bromofenol 1%) e mantidas em fervura em banho Maria por 3 minutos. A eletroforese unidimensional se processou em gel de poliacrilamida 12% e a corrida foi realizada em um sistema de eletroforese Mini Protean III Bio-Rad utilizando placas de vidro com espaçador de 1 mm. Levou aproximadamente 3 horas em corrente constante de 50 V. Após a migração eletroforética das proteínas os géis foram corados com uma solução de azul brilhante de Coomassie R-250 0,1% em Metanol 40% e ácido acético a 10% (REISNER, 1984) e descorados com uma solução de Metanol a 40% e ácido acético a 10%, para remover o excesso do corante. Os géis corados foram digitalizados e as imagens obtidas foram arquivadas para posterior análise a partir da distância de migração das bandas de proteínas usando o marcador de proteínas como padrão. Foram utilizados como marcadores de massa molecular: uma

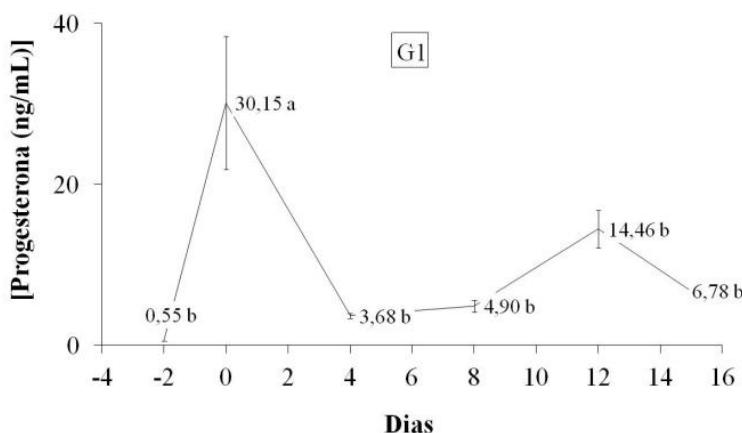
solução com BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e tripsinogênio (24 kDa) ou o marcador de peso molecular colorido (Rainbow molecular weight marker, Amersham Life Science, Arlington Heights, IL). Para a Espectrometria de Massas procedeu-se com a digestão tríptica e preparo para LC-MS^E, usando o Sistema 2D nanoAcquity. Todos os reagentes químicos utilizados nesta etapa foram de grau MS. Após análise dos géis as bandas proteicas de interesse visualizadas foram excisados do gel, reduzidos em partículas menores e colocadas em microtubos de 1,5 mL com uma solução descorante de bicarbonato de amônia 25 mM e 50% de acetonitrila (ACN) por 24 horas a 5°C. Posteriormente, esta solução foi retirada e adicionado 350 µL de água grau MS e mantido por 5 minutos; após este tempo, retirou-se a água, adicionou-se ACN e manteve por 20 min. (até que os pedaços de gel ficassem opacos); finalmente, o ACN foi removido totalmente por centrifugação a vácuo a 30 °C por 60 minutos. Após secagem, os pedaços de gel foram re-hidratados com uma solução de tripsina grau sequenciamento modificada (33ng/µL)(Promega, Madison, WI, EUA) de forma a cobri-los e incubados a 37°C por aproximadamente 17 horas. Após a digestão, os peptídeos foram extraídos pela adição de 25 µL de uma solução 50 % ACN e 5 % ácido trifluoracético (TFA) e agitação por 30 min. A solução com os peptídeos foi removida para um novo microtubo e o mesmo processo de extração foi realizado obtendo-se um volume final de 50 µL sendo reduzida para um volume de 10 µL por centrifugação a vácuo a 30 °C. Os peptídeos resultantes da digestão foram purificados com o auxílio de Zip Tip (Pipette Tip, C₁₈, tip zise P10 Merck Milipore). Os zip tips foram ativados com ACN, equilibrados com solução de TFA 0,1% (v/v) em água grau MS. Cada amostra foi aspirada e dispensada por 8 ciclos seguidos, posteriormente, o zip Tip foi lavado com a solução de TFA 0,1% (v/v) em água. Os peptídeos retidos foram eluidos com solução de eluição (60% ACN/0,1%TFA/água). A fração purificada foi depositada (5 µL) em frascos (Waters Total Recovery Vial, Waters Part No. 186000384c, 100/pkg, preslit PTFE/silicone c aps) e levada para o sequenciamento. Os peptídeos trípticos foram separados utilizando desempenho cromatográfico em nano escala utilizando um nano ACQUITY UPLC (Waters) acoplado a um espectrômetro de massas SYNAPT G2 Si HDMS (Waters). Experimentos em fase reversa (RP) unidimensional de nano ACQUITY com coluna *trapping* foram realizados. Os peptídeos separados foram analisados com o aparelho operando de uma forma *data-independent* acoplado com um *ion mobility* (HDMS^E). O processamento dos dados da espectrometria de massas foi obtido utilizando o software protein lynx global Server 3.0.2. As sequências de peptídeos obtidas foram submetidas à análise na ferramenta BLAST da base de dados NCBI (National Center for biotechnology information) para a identificação de proteínas. A partir dos dados obtidos foram comparadas as médias, pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, das concentrações de P4 e proteína entre os dias, para cada grupo experimental. Adotou-se o nível de 5% de significância para

todas as análises, sendo estas procedidas no aplicativo Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, versão 9.1).

6 RESULTADOS

A concentração de P4 média nos dois grupos experimentais no decorrer do tempo encontra-se na figura 1 e 2, respectivamente. A concentração sérica média de P4 no G1 apresentou diferença estatística ($p<0,05$) no D0 em comparação aos outros dias do experimento (Fig. 1). Cabe ressaltar que a colheita de sangue no D0 e no dia (-2), para ambos os grupos, foi realizada antes da aplicação IM da P4LA e do BE, respectivamente.

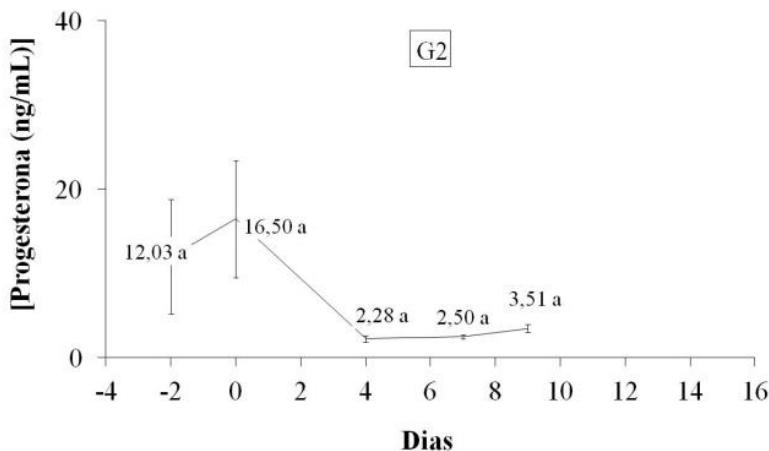
Figura 1. Média da concentração de Progesterona plasmática em ng/mL nas éguas submetidas a 3000 mg I.M de progesterona de longa ação, nos dias -2 (D-2) 0 (D0), 4 (D4), 8 (D8), 12 (D12) e 15 (D15) em receptoras de embrião aciclicas. * médias seguidas por uma mesma letra não diferem significativamente ($P<0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelos autores.

No G2, a média de P4 plasmática não teve diferença estatística entre os dias avaliados ($p<0,05$) (Fig. 2). Ao que parece a simples aplicação IM de 9 mg de BE foi suficiente para induzir o aumento das concentrações de P4 plasmáticas em ambos os grupos, sendo significativo para o G1 mas não significativo para o G2 (Fig. 1 e 2).

Figura 2. Média da concentração de Progesterona plasmática em ng/mL nas éguas 1500 mg I.M de progesterona de longa ação, nos dias -2 (D-2) 0 (D0), 4 (D4), 7 (D7) e 9 (D9) em receptoras de embrião acíclicas. * médias seguidas por uma mesma letra não diferem significativamente ($P<0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

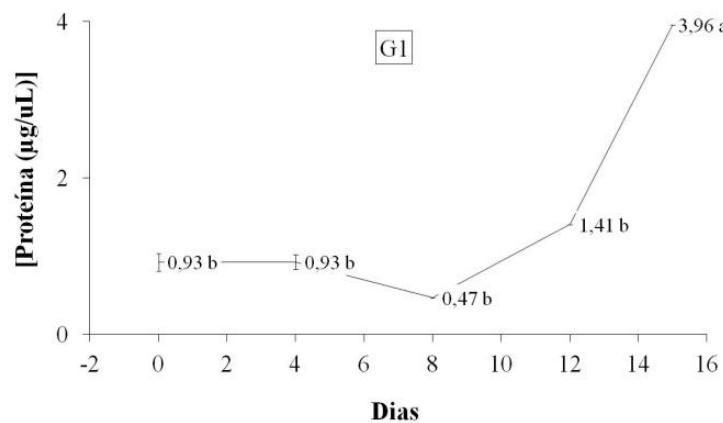


Fonte: Elaborado pelos autores.

A tendência das concentrações de progesterona nos dois grupos foi a de diminuir em função do tempo a partir do D0, ou seja, começando com 30,15 ng/mL no G1 e 16,50 ng/mL no G2, e terminando com 6,78 ng/mL no G1 para o D15 e 3,51 ng/mL no G2 para o D9 (Fig. 1 e 2). Se compararmos o período compreendido entre os D4 e D7 (usados para inovulação embrionária em éguas receptoras em anestro em programas de TE) em ambos os grupos, observamos que, mesmo com o dobrar da dose de P4LA usada no G1, as concentrações médias mantiveram-se entre 3,68 e 4,90 ng/mL no G1 (Fig. 1) e entre 2,28 e 2,5 ng/mL no G2 (Fig. 2), não sendo maiores que as apresentadas no D0 para cada grupo.

Nas figuras 3 e 4 são apresentadas as médias da concentração de proteína uterina para cada um dos dias de avaliação no G1 e G2, respectivamente. No G1, nos dias 0, 4, 8 e 12, não foi observada diferença estatística, mas, no D15, a concentração proteica foi maior em comparação aos outros dias avaliados (Fig. 3).

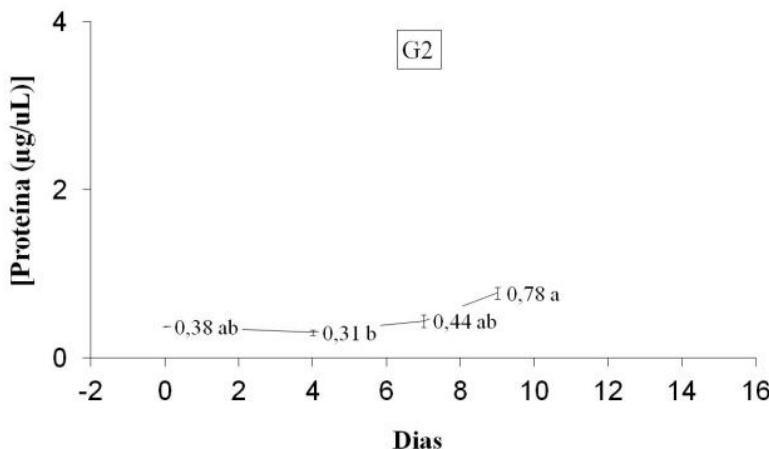
Figura 3. Médias da concentração de proteína uterina em $\mu\text{g/mL}$ nas éguas submetidas a 3000 mg I.M de progesterona de longa ação (G1), nos dias -2 (D-2), 0 (D0), 4 (D4), 8 (D8), 12 (D12) e 15 (D15). * médias seguidas por uma mesma letra não diferem significativamente ($P<0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelos autores.

No G2 (Fig. 4), a concentração de proteínas teve diferença estatística ($p<0,05$) quando comparados entre si os dias 4 e 10, sendo maior no D10. Os dias 0 e 7 apresentaram as mesmas concentrações de proteína total quando comparados entre si com os outros dias avaliado.

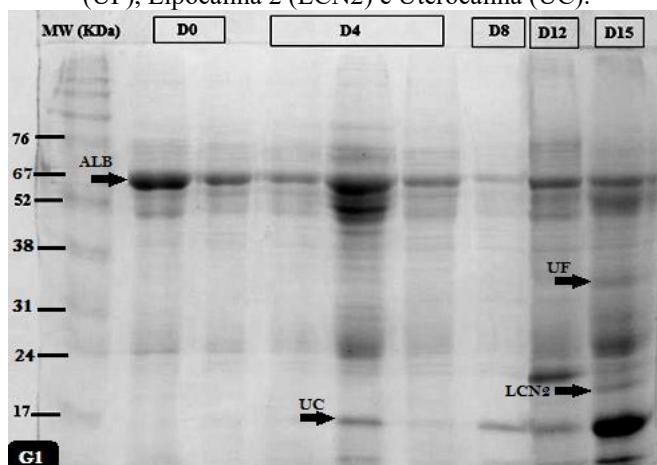
Figura 4. Médias da concentração de proteína uterina em $\mu\text{g/mL}$ nas éguas submetidas a 1500 mg I.M de progesterona de longa ação (G2), nos dias -2 (D-2), 0 (D0), 4 (D4), 7 (D7) e 9 (D9). * médias seguidas por uma mesma letra não diferem significativamente ($P<0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelos autores.

A concentração proteica uterina nos dias 0, 4, 12 e 15 do G1 foram maiores quando comparados com as médias de todos os dias do G2 (Fig. 3 e 4).

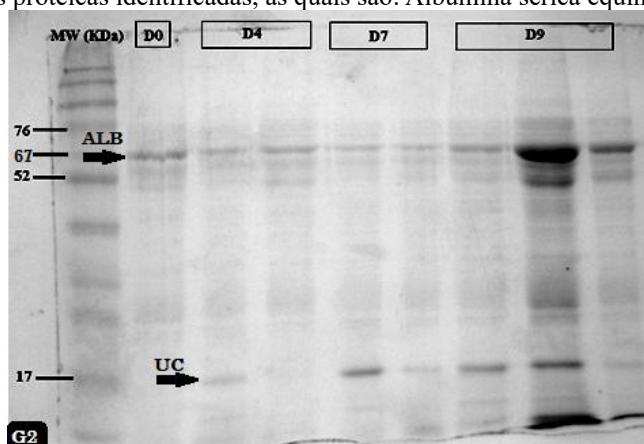
Figura 5. Fotografia do gel de eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) de amostras provenientes do fluido uterino das éguas receptoras de embrião acíclicas submetidas a 3000 mg I.M de progesterona de longa ação (G1) no dia 0 (D0), 4 (D4), 8 (D8), 12 (D12) e 15 (D15). As barras com valores numéricos indicam o peso molecular (MW) em quilodaltons (kDa). As setas mostram as bandas proteicas identificadas, as quais são: Albumina sérica equina (ALB), Uteroferrina (UF), Lipocalina 2 (LCN2) e Uterocalina (UC).



Fonte: Elaborado pelos autores.

No D4, do G1 e G2, foi observado o aparecimento de uma banda proteica de peso molecular aproximado de 17 kDa, que não foi observada no D0, permanecendo presente até o último dia de análise do G1 (D15) e G2 (D9). Esta banda proteica foi identificada como uterocalina (UC). Também foi observada nos dois grupos uma banda proteica de aproximadamente 67 kDa compatível com albumina sérica equina sendo mais marcada sua expressão no G1 quando comparada com o G2.

Figura 6. Fotografia do gel de eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) de amostras provenientes do fluido uterino das éguas receptoras de embrião acíclicas do grupo 2 (G2) no dia 0 (D0), 4 (D4), 7 (D7) e 9 (D9) pós aplicação de progesterona de longa ação. As barras com valores numéricos indicam o peso molecular (MW) em quilodaltons (kDa). As setas mostram as bandas proteicas identificadas, as quais são: Albumina sérica equina (ALB) e Uterocalina (UC).



Fonte: Elaborado pelos autores.

Nas figuras 5 e 6 pode-se observar o perfil proteico do ambiente uterino das éguas do G1 e G2, respectivamente. No G1 foi detectada o aparecimento de uma banda proteica entre 24 e 17 kDa unicamente no D15, sendo identificada como lipocalina 2 (LCN2). No mesmo dia, também foi

identificada outra banda proteica de peso molecular entre 31 e 38 kDa conhecida pelo nome de uteroferrina (UF) (Fig.5).

Na fotografia do gel do G1 (Fig.5) é possível observar uma maior espessura de bandas proteicas quando comparado com o gel do G2 (Fig.6), por uma maior concentração de proteínas uterinas, provenientes das éguas que receberam uma maior concentração de P4LA. Foi observada variação no aparecimento e espessura de uma mesma banda proteica, em um mesmo dia de avaliação e grupo experimental, isto indica que, existiram éguas que apresentaram maior secreção de proteínas que outras.

7 DISCUSSÃO

O ambiente uterino deve oferecer ótimas condições para a fertilização e desenvolvimento do embrião. O fluido uterino está constituído por hormônios, enzimas, substratos de energia (lipídeos), íons, vitaminas, aminoácidos, peptídeos, proteínas séricas e proteínas uterinas. Qualquer mudança fisiológica no ambiente uterino quanto à produção ou quantidade dos seus constituintes é mediada por esteroides, principalmente a P4, conhecida como o hormônio da reprodução que atua através dos seus receptores e vários cofatores, que orquestra as interações fisiológicas, bioquímicas e moleculares no útero que afetam o crescimento e desenvolvimento embrionário (HINRICHES e KENNY, 1987; SPENCER et al., 2004).

A secreção e expressão de proteínas são reguladas pelos esteroides, sendo constatado, neste experimento, pela variação das concentrações de proteínas, assim como pela expressão das mesmas no decorrer do tempo em cada um dos grupos, as quais foram dependentes, inicialmente da aplicação do BE e posteriormente da concentração de P4. Diferenças significativas têm sido observadas nas concentrações de proteína total no fluido uterino de éguas cíclicas, sendo maiores durante a dominância da progesterona e com pico observado no dia 12 do diestro que declinou mais tarde (ZAVY et al., 1979 e 1982). No G1 deste experimento foi observado um aumento das concentrações de proteína total a partir do dia 12 até o dia 15, e no GII a partir do dia 4 até o dia 9.

A sincronia entre a receptora e a doadora nos programas de TE é fundamental para o sucesso da transferência de embriões, isto é possível graças a uma rápida alteração do ambiente uterino que permite a preparação de um meio altamente específico. As proteínas de origem sanguínea e aquelas produzidas pelo endométrio preparam o ambiente ideal para o recebimento do embrião (ALAVI-SHOUSHARI et al. 2006).

Segundo McDowell e colaboradores (1999) e Zavy e colaboradores (1979) a progressão do diestro e o aumento da dose e duração do tratamento de progesterona aumentam as concentrações de

proteína nos lavados uterinos, fato que pode ser constatado ao comparar as concentrações de proteína do G1 e G2. Também é possível observar que a intensidade e tamanho das bandas proteicas foram maiores no G1, no qual foi usado o dobro da dose de P4 do G2.

A concentração proteica obtida no D0 nos dois grupos foi superior à encontrada por Reilas e Katila (1998) em um estudo com éguas ovariectomizadas ($<0,3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) submetidas a injeções diárias de 5 mg de BE durante 5 dias e lavado uterino 48 horas após a ultima aplicação, provavelmente, porque no nosso trabalho, a dose de BE foi de maior (9 mg) e mesmo que, a dose fosse única, o tempo de amostragem após a aplicação do BE foi o mesmo para os dois grupos.

Diferentes estudos comprovaram que, as concentrações de proteína total no fluido uterino em todos os estado do ciclo estral são maiores que os encontrados em sangue. Ao observar as variações no ciclo estral foi observado em éguas que a concentração de proteína total uterina foi maior no período do estro quando comparado com o diestro, sendo causado pelo aumento do fluxo sanguíneo e maior permeabilidade dos capilares endometriais como consequência do efeito do estradiol (STRZEMIENSKI et al., 1984 citado por ALAVI-SHOUSHARI et al. 2006) fato que foi observado em ambos os grupo (G1 e G2) deste trabalho.

No estudo de Reilas e Katila (1998) foi aplicado um protocolo associando BE + altrenogest (via oral) e a concentração de proteína avaliada no dia 15 foi inferior à apresentada neste trabalho para o G1 no mesmo dia (D15), provavelmente, porque o efeito requerido da dose do progestágeno utilizado foi inferior e a via de administração foi diferente.

Foi observada, neste trabalho, uma banda proteica de 67 kDa compatível com albumina sérica equina verificada todos os dias de cada um dos grupos que esta presente em éguas prenhas e não prenhas. Esta proteína não é produzida pelo endométrio e sua presença no fluido uterino é resultado da transudação (TUNON et al., 1998). Segundo Thomas (2000), citado por Alavi-Shoushtari e colaboradores (2006), esta proteína é fonte de aminoácidos, regula a pressão osmótica, transporta e liga uma ampla variedade de moléculas e íons.

Entre as proteínas identificadas por espectrometria de massas estão a uterocalina (UC), uteroferrina (UF) e a lipocalina 2 (LCN2).

A uterocalina (UC) com peso aproximado de 18,7 kDa é uma proteína predominante e dependente de P4, facilmente detectável em secreção uterinas e no tecido endometrial de éguas durante a parte final do diestro e no inicio da prenhas entre os dias 16 e 18 (CROSSET et al., 1998 e ELLENBERG et al., 2008), porém, neste estudo sua produção foi induzida nos dois grupos a partir do D4 e apareceu até o D15 no GI. Esta proteína não esta presente no endométrio de éguas em anestro e potras antes da puberdade (ELLENBERG et al., 2008), que foi compatível com os achados no D0 de

ambos os grupos. Sua presença no fluido uterino foi induzida pela aplicação de P4LA, concordando com Crosset e colaboradores (1996). Isto indica que concentrações de P4 sérica inferiores a 4 ng/mL ainda que não sejam compatíveis com prenhes também induzem a produção da UC. A UC pode ser uma proteína sinalizadora de condições uterinas propícias ao desenvolvimento de embriões equinos. A banda proteica correspondente à uteroferrina (UF) esteve presente unicamente nas éguas do G2 apenas no D15, concordando com os achados de Bazer e colaboradores (1991) em éguas prenhas a partir do dia 15-16, sendo que as concentrações de P4 sérica nas éguas do G2, para este dia, foram superiores a 4 ng/mL, valores compatíveis com prenhes. No nosso estudo foi estimulada uma alta concentração de P4 pela aplicação de 3000 mg P4LA, compatível com os resultados de McDowell e colaboradores (1987) que demonstraram que a secreção da UF em éguas ovariectomizadas foi induzida pela P4, tendo um efeito sinérgico quando associado a estrógeno. A lipocalina 2 (LCN2) de peso molecular aproximado de 24 kDa foi outra proteína uterina detectada unicamente no D15 nas éguas do G1, as quais receberam maior dose de progesterona de longa ação, desta maneira considera-se como o primeiro relato de expressão desta proteína em éguas em anestro tratadas hormonalmente com P4LA. Não foi possível afirmar se a dose usada no G2 foi suficiente para induzir a secreção da LCN2 ao fluido, pois, as avaliações foram feitas até o D9. A expressão, secreção e concentração de qualquer proteína uterina são dependentes da variação individual, explicando a variação da espessura e presença de uma mesma banda proteica em um mesmo dia. Isto indica que, existem outros fatores que influenciam na preparação do ambiente uterino, além da progesterona, podendo explicar perdas embrionárias causadas em programas de T.E.

Todas as moléculas são capazes de influenciar direta ou indiretamente o desenvolvimento embrionário. A secreção uterina alterada é provavelmente, devido a uma estimulação paracrína alterada, causada por degeneração fibrosa das glândulas endometriais, alteração epitelial e/ou problemas hormonais. E por isto, que qualquer alteração na produção e nas concentrações destas proteínas pode implicar deficiência nutricional do embrião, podendo causar a morte (HOFFMANN et al., 2009).

O conhecimento estratégico dos mecanismos fisiológicos ocorridos no período de inovação podem oferecer esquemas terapêuticos para melhorar a capacidade uterina de receber o embrião, aumentando o período de inovação e permitindo a melhor utilização da receptora acíclica nos programas de TE

Conclui-se que a aplicação de BE em éguas em anestro está relacionada com o aumento das concentrações de P4 plasmática. A expressão e concentração das proteínas uterinas foram dependentes da dose de P4LA aplicada nas éguas em anestro. A uterocalina (UC) com peso aproximado de 18,7

kDa foi induzida nos dois grupos a partir do D4 e apareceu até o final do período de análise (D15 no GI e até o D9 no GII). A UC pode ser uma proteína sinalizadora de início de condições uterinas propícias ao desenvolvimento de embriões equinos.

A lipocalina 2 (LCN2) de peso molecular aproximado de 24 kDa foi detectada no D15 nas éguas do G1. Considera-se este dado como o primeiro reportado de expressão desta proteína em éguas em anestro tratadas hormonalmente com P4LA.

REFERÊNCIAS

ALLEN, W.R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction*, v. 121(4), p. 513-527, 2001. Disponível em:

<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/121/4/513.xml>, Acesso em: 05/03/2024.

AMORIM, M. Diagnostic Aspects and Proteomic Analysis of Uterine Flush Fluid from Mares with Endometritis. 2014. 162p. Tese de Doutorado. The University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 2014. Disponível em: <https://atrium.lib.uoguelph.ca/server/api/core/bitstreams/d04b29c6-1229-44bb-bf65-afefc7afda76/content>, Acesso em: 05/08/2024.

AUPPERLE, H.; OZGEN SSHOON, H.A.; SCOOON, D.; HOPPEN, H.O.; SIEME, H.; TANNAPFEL, A. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equine Veterinary Journal*, v. 32(3), p. 228-232, 2000 (Abstract). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10836478/>, Acesso em: 12/08/2024.

AURICH, C. Reproductive cycles of horses. *Anim Reprod Sci*, v. 124, p. 220 – 228, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432011000340>, Acesso em: 08/10/2024.

ALAVI-SHOUSHARI, S.M.; ASRI-REZAI,S.; ABSHENAS, J. A study of uterine protein variations during the estrus cycles in the cow: A comparison with the serum proteins. *Animal Reproduction Science*, v. 96, p. 10-20, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432005003659>, Acesso em: 12/08/2024.

ASHWORTH, J.C. Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livestock Production Science*, v. 44, p. 99-105. 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0301622695000455>, Acesso: 13/09/2024.

BAZER, F.W.; WORTHINGTON-WHITE, D.; FLISS, M.F.; GROSS, S. Uteroferrin: a progesterone-induced hematopoietic growth factor of uterine origin. *Exp Hematol*, v. 19, p. 910–5, 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1893968/>, Acesso em: 11/11/2024.

BAZER, F. W.; WU, G.; JOHNSON, G. A.; KIM, J.; SONG, G. Uterine Histotroph and Conceptus Development: Select Nutrients and Secreted Phosphoprotein 1 Affect Mechanistic Target of Rapamycin Cell Signaling in Ewes. *Biology of Reproduction*, v.85, n.6, p. 1094-1107, 2011. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/21865556>, Acesso em: 03/06/2024.

BEIER-HELLWIG, K.; KRENER, H.; BONN, B.; LINDER, D.; BADER, H.; BEIER, H. M. Partial sequencing and identification of three proteins from equine uterine secretion regulated by progesterone. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 30, p. 295-298, 1995. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/227595844_Partial-Sequencing_and_Identification_of_Three_Proteins_from_Equine_Uterine_Secretion_Regulated_by_Progesterone, Acesso em: 26/07/2024.

BUITRAGO, D.J.L. Proteínas do fluido uterino equino no quinto dia pós-ovulação. 2019. 64 p. Tese (Mestre em Medicina Animal: Equinos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RGS, 2019. Disponível em: https://lume.ufrgs.br/handle/10183/195715?locale-attribute=pt_BR, Acesso: 16/08/2024.

CAIADO, J.R.C.; FONSECA, F.A.; SILVA, J.F.S.; FONTES, R.S. Tratamento de éguas receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação. *R. Bras. Zootecnia*, v.36, n.2, p. 360-368. 2007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/250039680_Tratamento_de_eguas_receptoras_de_embrioes_visando_sua_utilizacao_no_segundo_dia_pos-ovulacao, Acesso: 12/08/2024.

CARNEVALE, E.M.; RAMIRES, R.J.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.; VANDERWAL, L.D.K.; McCUE, P.M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, v. 54, p. 965-979. 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X00004052>, Acesso em: 12/06/2024.

CROSSETT, B.; ALLEN, W.R.; STEWART, F. A 19 kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. *Biochem. J.*, v. 320, p. 137-143, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8947478/>, Acesso em 23/07/2024.

CROSSETT, B.; SUIRE, S.; HERRLER, A.; ALLEN, W.R.; STEWART, F. Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus. *Biol Reprod.*, v. 59, p. 483-90. 1998. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/13568005_Transfer_of_a_Uterine_Lipocalin_from_the_Endometrium_of_the_Mare_to_the_Developing_Equine_Conceptus1, Acesso em: 23/07/2024.

DONADEU, F.X. Early indicators of follicular growth during the anovulatory season in mares. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 94, p. 179-181, 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/278162731_Early_indicators_of_follicular_growth_during_the_anovulatory_season_in_mares, Acesso em: 11/08/2024.

DONADEU, F. X.; WATSON, E.D. Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horse. *Animal Reproduction Science*, v. 100, p. 225-242, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432006005410>, Acesso em: 08/10/2024.

DUCSAY, C.A.; BUHI, W.C.; BAZER, F.W.; ROBERTS, R.M.; COMBS, G.E. Role of uteroferrin in placental iron transport: effect of maternal iron treatment on fetal iron and uteroferrin content and neonatal hemoglobin. *J Anim Sci.*, v. 59, p. 1303-8. 1984.
https://www.researchgate.net/publication/16684004_Role_of_Uteroferrin_in_Placental_Iron_Transport_Effect_of_Maternal_Iron_Treatment_on_Fetal_Iron_and_Uteroferrin_Content_and_Neonatal_Hemoglobin, Acesso em: 19/07/2024.

ELLENBERGER, C.; WILSHER, S.; ALLEN, W.R.; HOFFMANN, C.; KÖLLING, M.; BAZER, F.W.; KLUG, J.; SCHOON, D.; SCHOON, H.A. Immunolocalisation of uterine secretory proteins uterocalin, uteroferrin and uteroglobin in the mares uterus and placenta throughout pregnancy. *Theriogenology*, v. 70, p. 746-57, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X08002902>, Acesso em 19/02/2024.

HINRICHES, K.; SERTICH, P. L.; KENNEY, R. M. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. *Theriogenology*, v. 4, p. 455-460, 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16726211/>, Acesso em: 23/05/2024.

HINRICHSS, K.; KENNEY, R.M. Effect of timing of progesterone administration on pregnancy rate after embryo transfer in ovariectomised mares. *J. Reprod. Fert., Suppl.* v. 35, p. 439-443. 1987.

Disponível em: <https://madbarn.com/research/effect-of-timing-of-progesterone-administration-on-pregnancy-rate-after-embryo-transfer-in-ovariectomized-mares/>, Acesso em: 23/08/2024.

HERSHMAN, L.; DOUGLAS, R.H. The critical period for the maternal recognition of pregnancy in pony mares. *J Reprod Fertil Suppl*, v. 27, p. 395-401. 1979. Disponível em: <https://madbarn.com/research/the-critical-period-for-the-maternal-recognition-of-pregnancy-in-pony-mares/>, Acesso em: 03/10/2024.

HOFFMANN, C.; BAZER, F.W.; KLUG, J.; AUPPERLE, H.; ELLENBERGER, C.; SCHOON, H.-A. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium expression patternins for mares suffering from endometrosis. *Theriogenology*, v. 71, p. 264-274. 2009. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X08004871>, Acesso em: 14/03/2024.

JASKO, D. J. Comparison of pregnancy rates following nonsurgical transfer of day 8 equine embryos using various transfer devices. *Theriogenology*, v.58, p.713-715, 2002. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/290691783>

Comparison_of_pregnancy_rates_following_nonsurgical_transfer_of_day_8_equine_embryos_using_various_transfer_devices, Acesso em: 29/03/2024.

KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J Am Vet Med Assoc*, v.172(3), p. 241-262, 1978. Disponível em: <https://madbarn.com/research/cyclic-and-pathologic-changes-of-the-mare-endometrium-as-detected-by-biopsy-with-a-note-on-early-embryonic-death/>, Acesso em: 05/04/2024.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970. Disponível em: <https://scispace.com/papers/cleavage-of-structural-proteins-during-the-assembly-of-the-n16enerpsb>, Acesso em 23/02/2024.

LI, C.; CHAN, Y.R. Lipocalin 2 regulation and its complex role in inflammation and cancer. *Cytokine*, v. 56(2), p. 435-41, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466611002547>, Acesso em: 13/03/2024.

McDOWELL, K.J.; ADAMS, M.H.; ADAM, C.Y.; SIMPSON, K.S. Changes in equine endometrial oestrogen receptor α and progesterone receptor mRNAs during the oestrus cycle, early pregnancy and after treatment whit exogenous steroids. *J. Reprod. and Fert.*, v. 117, p. 135-142, 1999. Disponível em: https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/117/1/jrf_117_1_016.xml, Acesso em: 11/05/2024.

McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; CARNEFVALE, E. M.; HERMENET, M. J. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as model to study the role of progestin in pregnancy maintenance. *Theriogenology*, v.29, n. 5, p.1011-1063, 1988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16726427/>, Acesso em: 09/08/2024.

MIELE, L.; CORDELLA-MIELE, E.; FACCHIANO, A.; MUKHERJEE, A.B. Inhibition of phospholipase A2 by uteroglobin and antiflammatory peptides. *Adv Exp Med Biol*, v. 279, p. 137–60, 1990. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-0651-1_9, Acesso em: 23/05/2024.

MULLEN, M. P.; ELIA, G.; HILLIARD, M.; PARR, M. H.; DISKIN, M.G.; EVANS, A. C.O.; CROWE, M. A. Proteomic characterization of histotroph during the preimplantation phase of the estrous cycle in cattle. *Journal of Proteome Research*, v.11, n.5, p. 3004-3018, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22463384/>, Acesso em: 24/09/2024.

PADUA, M.B.; LYNCH, V.J.; ALVAREZ, N.V.; GARTHWAITE, M.A.; GOLOS, T.G.; BAZER, F.W.; KALKUNTE, S.; SHARMA, S.; WAGNER, G.P.; HANSEN, P.J. ACP5 (uteroferrin): Phylogeny of an ancient and conserved gene expressed in the endometrium of mammals. *Biol Reprod*, v. 86(4), p.1-8, 2012. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3338662/pdf/bire_86_04_0123.pdf, Acesso em 23/06/2024.

RAMBAGS, B.P.B. Embryonic quality and survival in the horse: maternal and intrinsic aspects. Thesis Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine. 2007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/27705354_Embryonic_quality_and_survival_in_the_horse_maternal_and_intrinsic_aspects, Acesso em: 14/09/2024.

REILAS, T.; RISTINIEMI, M.; KATILA, T. Influence of hormone replacement therapy and bacterial inoculation on proteins and enzymes in uterine lavage fluid of ovariectomized mares. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 33, p. 11-19, 1998. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/228014169_Influence_of_Hormone_Replacement_Therapy_and_Bacterial_Inoculation_on_Proteins_and_Enzymes_in_Uterine_Lavage_Fluid_of_Ovariectomized_Mares, Acesso em: 05/06/2024.

REISNER, A.H. Gel protein stain: A rapid procedure. *Met. Enzimol. Part C*. p. 439-441, 1984. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687984041100>, Acesso em: 07/09/2024.

ROCHA FILHO, A. N.; PESSÔA, M. A.; GIOSO, M. M.; ALVARENGA, M. A. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. *Anim. Reprod.*, v. 1, p. 91-95, 2004. Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a608bf7783717068b4810>, Acesso em: 12/09/2024.

RODRIGUES, T. G. Uso de progesterona de longa duração e inovação de éguas no segundo dia após a ovulação. 2009. 55 p. Tese (Mestrado em ciência animal). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ, 2009.

SILVA, E.S.M.; CUERVO-ARANGO, J.; RUIJTER-VILLANI, M.; KLOSE, K.; PEDRO S. OQUENDO, P.S.; STOUT, T.A.E. Effect of the duration of estradiol priming prior to progesterone administration on endometrial gene expression in anestrous mares, *Theriogenology*, v. 131, p. 96-105, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X1930072X>, Acesso em: 18/06/2024.

SMITH , P.K.; KRHON, R.I.; HERMASON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARDNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v. 150, p. 76-85. 1985. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269785904427>, Acesso: 23/08/2024.

SPENCER, T.; BURGHARDT R.; JOHNSON, B.; BAZER F. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 82, p. 537-550, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432004000703>, Acesso em: 17/04/2024.

SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, v. 51, p. 91-104. 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02012682>, Acesso em: 29/03/2024.

SQUIRES, E.L. Factors affecting embryo recovery and pregnancy rates after embryo transfer. Società Italiana Veterinari per Equini- SIVE- XII Congresso Multisala, Bologna, Italy, www.ivis.org, 2006.

STOUT, T.A.E.; ALLEN, W.R. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. *Reproduction*, v. 121(5), p. 771-775, 2001. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/121/5/771.xml>, Acesso em: 14/08/2024.

STOUT, T.A.E.; ALLEN, W.R. Prostaglandin E(2) and F(2 alpha) production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. *Reproduction*, v. 123(2), p. 261-268. 2002. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/123/2/261.xml>, Acesso em: 26/04/2024.

STUCKEY, R.; ALDRIDGE, T.; LIM, F.L.; MOORE, D.J.; TINWELL, H.; DOHERTY, N.; DAVIES, R.; SMITH, A.G.; KIMBER, I.; ASHBY, J.; ORPHANIDES, G.; MOGGS, J.G. Induction of iron homeostasis genes during estrogen-induced uterine growth and differentiation. *Mol Cell Endocrinol.*, v. 253, p. 22-29, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720706001122>, Acesso: 02/04/2024.

SUIRE, S.; STEWART, F.; BEAUCHAMP, J.; KENEDDY, M.W. Uterocalin, a lipocalin provisioning the preattachment equine conceptus: fatty acid and retinol binding properties, and structural characterization. *Biochem. J.*, v. 356, p. 369-376, 2001. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1221847/>, Acesso em: 27/08/2024.

TUNÓN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; HULTÉN, C.; NUMMIJARVI,A.; MAGNUSSON, U. Concentration of total protein, albumin and immunoglobulins in undiluted uterine fluid of gynecologically healthy mares. *Theriogenology*, v. 50(6), p. 821-831, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X98001873>, Acesso em: 22/05/2024.

VANDERWALL, D. K.; MARQUARDT, J. L.; WOODS, G. L. Use of a Compounded Long-Acting Progesterone Formulation for Equine Pregnancy Maintenance. *J Eq Vet Sci*, v.27, n.2, p. 62-66, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080606006952>, Acesso em: 15/09/2024.

WALTERS, K.W.; ROSER, J.F.; ANDERSON, G.B. Maternal-conceptus signalling during early pregnancy in mares: oestrogen and insulin-like growth factor I. *Reproduction*, v. 121(2), p. 331-338, 2001. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/121/2/331.xml>, Acesso em 07/05/2024.

WILLIAMS, G.L., THORSON, J.F., PREZOTTO, L.D., VELEZ, I.C., CARDOSO, R.C., AMSTALDEN, M. Reproductive seasonality in the mare: neuroendocrine basis and pharmacologic control. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 43, p. 103-115, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22579068/>, Acesso em: 30/03/2024.

WOODING, F.B.; MORGAN, G.; JONES, G.V.; CARE, A.D. Calcium transport and the localisation of calbindin-D9k in the ruminant placenta during the second half of pregnancy. *Cell Tissue Res*, v. 285, p. 477–89, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8772162/>, Acesso em: 12/09/2024.

ZAVY, M.T. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. *J Reprod Fert Suppl*, v. 27, p. 403-11, 1979. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/289817>, Acesso em: 16/08/2024.

ZAVY, M.T.; SHARP, D.C.; BARER, F.W.; FAXLEABAS, A.; SESSIONS, F.; ROBERTS, R.M. Identification of stage-specific and hormonally induced polypeptides in the uterine protein secretions of the mare during the estrous cycle and pregnancy. *J Reprod Fertil*, v. 64, p. 199-207, 1982. Disponível em: https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/64/1/jrf_64_1_030.xml, Acesso em: 07/07/2024.

ZERLOTTI M. Como selecionar e preparar éguas receptoras para a transferência de embriões. XIII CONFERENCIA ANUAL DA ABRAVEQ. Campinas, SP. 2012. Disponível em: <https://www cpt.com.br/artigos/como-escolher-e-preparar-a-egua-para-receber-embriao>, Acesso em 03/03/2025.