

UNIVERSIDADE DE UBERABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL NOS
TRÓPICOS

**EFICIÊNCIA DE LUZ ARTIFICIAL E SUPLEMENTAÇÃO HORMONAL NA
MANUTENÇÃO DA GESTAÇÃO DE ÉGUAS NO PERÍODO DA TRANSIÇÃO DE
PRIMAVERA**

Mestrando: Guilherme Cunha de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos

Uberaba, MG
2018

GUILHERME CUNHA DE OLIVEIRA

**EFICIÊNCIA DE LUZ ARTIFICIAL E SUPLEMENTAÇÃO HORMONAL NA
MANUTENÇÃO DA GESTAÇÃO DE ÉGUAS NO PERÍODO DA TRANSIÇÃO DE
PRIMAVERA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Linha de pesquisa: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Prof.: Dr. André Belico de Vasconcelos

Uberaba, MG
2018

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Oliveira, Guilherme Cunha de.
O4e Eficiência de luz artificial e suplementação hormonal na manutenção da gestação de éguas no período da transição de primavera / Guilherme Cunha de Oliveira. – Uberaba (MG): Universidade de Uberaba, 2018.
40 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.
Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos.

1. Reprodução animal. 2. Agronegócio. 3. Equino – Reprodução. I. Vasconcelos, André Belico de. II. Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos. III. Título.

CDD: 636.082

GUILHERME CUNHA DE OLIVEIRA

EFICIÊNCIA DE LUZ ARTIFICIAL E SUPLEMENTAÇÃO HORMONAL NA MANUTENÇÃO
DA GESTAÇÃO DE ÉGUAS NO PERÍODO DA TRANSIÇÃO DE PRIMAVERA.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

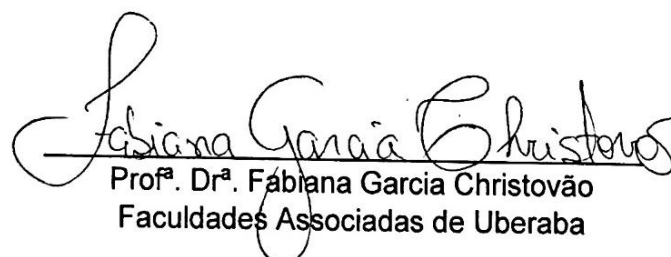
Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 20/12/2018

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos - Orientador
Universidade de Uberaba


Prof. Dr. Guilherme Costa Venturini
Universidade de Uberaba


Prof.ª Dr.ª Fábiana Garcia Christovão
Faculdades Associadas de Uberaba

AGRADECIMENTOS

Desejo proferir meus agradecimentos a todos àqueles que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Em primeiro lugar agradeço ao Universo por me proporcionar tudo que precisei!

Aos meus pais Marina e Antônio que nunca deixaram de me apoiar, mesmo nos momentos difíceis, e ainda, por serem esses exemplos de pessoas amadas por todos aqueles que tem o prazer de conhece-los. Tudo o que eu fizer para vocês, acreditem, não será o suficiente!

Aos meus irmãos Ana Carolina, Gustavo e Antônio Jr. pela confiança.

À Cecília pelo carinho, paciência e principalmente, por estar ao meu lado nas ondulações que a vida nos proporciona, sempre me trazendo para o presente.

Aos meus grandes e eternos amigos por partilhar de momentos únicos.

Aos meus familiares pelo carinho, em especial, agradeço a tia Alda e tio Afonso, Fatima e Jaime por estarem sempre presentes.

Ao prof. Dr. André Belico, pela amizade e pela orientação dada ao desenvolvimento deste trabalho.

À prof. Dra. Amanda Pifano, pela ajuda no desenvolvimento estatístico.

Em especial, gostaria de agradecer uma pessoa que se tornou uma grande e sincera amiga, a você Fabiana muito grato por todos ensinamentos e oportunidades.

Agradeço, de igual forma, ao Marcelinho (Marcelo M. Lima) pela amizade, ensinamentos, concelhos e, principalmente pelo exemplo de honestidade.

E finalmente agradeço a Universidade de Uberaba pela minha formação profissional, e a todos os professores e colaboradores que assim, fizeram presentes.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão de bolsa PROSUP/TAXA durante o programa de mestrado – Código de Financiamento 001.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

*“Príncipe Guardião e Guerreiro defendei-me e protegei-me com Vossa Espada.
Não permita que nenhum mal me atinja.
Protegei-me contra assaltos, roubos acidentes e contra quaisquer atos de violência.
Livrai-me de pessoas negativas e espalhai vosso manto e vosso escudo de proteção em meu lar, meus filhos e familiares. Guardai meu trabalho, meus negócios e meus bens.
Trazei a paz e a harmonia.
São Miguel Arcanjo, defendei-nos neste combate, cobri-nos com vosso escudo contra os embustes e ciladas do demônio.
Instante e humildemente vos pedimos, que Deus sobre ele e vós, Príncipe da milícia celeste, com esse poder divino, precipitai no inferno a Santanás e aos outros espíritos malignos que vagueiam pelo mundo para perdição das almas.
Amém!”*

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1 | |
| Figura 01: Padrão hormonal no ciclo estral da égua. Fonte: Modificado <i>Equine Reproduction</i> , McKinnon; McCue, 2011 | 13 |
| | |
| CAPÍTULO 2 | |
| Figura 01: Resultado das taxas de prenhez para os grupos G1 (controle), G2 (Luz Artificial) e G3 (éguas acíclicas) aos 14 e 30 dias de gestação..... | 31 |
| Figura 02: Resultado da porcentagem de perda embrionária para os grupos G1 (controle), G2 (Luz Artificial) e G3 (éguas acíclicas) aos 14 e 30 dias de gestação..... | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------|--|
| % | Porcentagem |
| E2 | Estrógeno |
| ng/ml | Nanograma por mililitro |
| mm | Milimetro |
| LH | Hormônio Luteinizante |
| GnRH | Hormônio Liberador de Gonadotrofinas |
| FSH | Hormônio Folículo Estimulante |
| CL | Corpo Lúteo |
| PGF2 α | Prostaglandina F2 α |
| COX-2 | Ciclooxigenase 2 |
| P4 | Progesterona |
| Lux | Fluxo Luminoso da Lâmpada por Metro Quadrado |
| W | Watts |
| m | Metro |
| LA | Longa Ação |
| BE | Benzoato de Estradiol |
| hCG | Gonadotrofina Coriônica Humana |
| UI | Unidades Internacionais |
| mg | Miligrama |
| Kg | Quilograma |
| D | Dia |
| MHz | Mega Hertz |
| DIC | Delineamento Inteiramente Casualizado |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 1 | 09 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 11 |
| 2.1. Aspectos Básicos do Ciclo Estral na Égua..... | 11 |
| 2.2. Controle Endócrino na Égua..... | 12 |
| 2.3. Sazonalidade Reprodutiva na Égua..... | 14 |
| 2.4. Métodos de Controle da Sazonalidade Reprodutiva..... | 15 |
| 2.4.1. Luz Artificial..... | 16 |
| 2.4.2. Progestágenos e Estrógenos..... | 16 |
| 2.5. Agentes Indutores da Ovulação..... | 18 |
| 2.5.1. Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)..... | 18 |
| 2.5.2. Acetato de Deslorelina..... | 19 |
| 3. OBJETIVO..... | 20 |
| 3.1. Objetivo Geral..... | 20 |
| 3.2. Objetivos Específicos..... | 20 |
| REFERÊNCIAS..... | 21 |
| | |
| CAPÍTULO 2 | 25 |
| Resumo..... | 26 |
| Abstract..... | 26 |
| Introdução..... | 27 |
| Material e Métodos..... | 28 |
| Resultados e Discussão..... | 30 |
| Conclusão..... | 34 |
| Agradecimentos..... | 34 |
| Referências..... | 34 |

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o quarto maior rebanho equino do mundo, com aproximadamente 5,3 milhões de cabeças. Desta forma o complexo do agronegócio do cavalo vem se destacando e assumindo importante papel na economia nacional, gerando três milhões de empregos diretos e indiretos, movimentando cerca de R\$ 16 bilhões por ano (LIMA; CINTRA, 2016).

As associações de criadores de cavalos estabeleceram o ano hípico como a data oficial de nascimentos para potros, sendo 1º de julho no hemisfério sul e 1º de janeiro no hemisfério norte, resultando na mesma idade oficial para os potros nascidos na mesma estação (GINTHER, 1992). Tal fato exerce uma pressão econômica em obter um potro o mais próximo possível do início do ano hípico, pois possuem melhor desempenho nas modalidades esportivas que os nascidos tardiamente.

Entretanto, a égua é classificada como poliéstrica sazonal, ou seja, manifesta vários ciclos estrais com comportamento reprodutivo durante a primavera e verão, devido a maior luminosidade diária (BERGFELT, 2009; AURICH, 2011). No hemisfério sul, a primavera e verão se apresentam entre os meses de outubro e março e no hemisfério norte, entre os meses de abril e setembro (NAGY; GUILLLAUME; DAELS, 2000).

Segundo Ginther et al. (2004) estas fases são baseadas na dinâmica folicular, sendo fase de anestro, fase de transição de primavera, fase ovulatória e fase de transição de outono. Durante o período de transição de inverno-primavera a baixa disponibilidade de alimentos em consequência do clima e principalmente do manejo realizado entre doadoras e receptoras, faz com que éguas doadoras de embriões iniciem suas atividades ovarianas mais cedo, enquanto as receptoras permanecem em anestro, o que explica o baixo número de receptoras cíclicas nesta fase (ROCHA FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2017).

Por certo, o comportamento sazonal reprodutivo representa um grande gargalo a veterinários e criadores. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi revisar o conhecimento sobre os mecanismos da sazonalidade reprodutiva para antecipar a ciclicidade das éguas e ainda a utilização de receptoras acíclicas em programas comerciais de transferência de embriões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos Básicos no Ciclo Estral na Égua

A espécie equina é classificada reprodutivamente como poliéstrica sazonal, ou seja, manifesta vários ciclos estrais com comportamento reprodutivo durante a primavera e verão, devido a maior luminosidade diária (BERGFELT, 2009; AURICH, 2011). No hemisfério sul, a primavera e verão se apresentam entre os meses de outubro e março e no hemisfério norte, entre os meses de abril e setembro (NAGY; GUILLLAUME; DAELS, 2000).

A puberdade nas fêmeas é marcada pelo primeiro estro ou primeira ovulação, todavia a fêmea ainda não é capaz de levar uma gestação a termo, pois ainda não atingiu a maturidade sexual. Geralmente as fêmeas equinas atingem a puberdade em média aos 18 meses de idade (AURICH, 2011). O que segundo Ginther et al. (2004), a puberdade pode ser precoce (14 meses) ou tardia (24 meses), por sofrer influência de três fatores: nutrição, fotoperíodo e manejo.

A égua apresenta uma combinação de eventos fisiológicos em seu ciclo estral que ocorrem entre duas fases, estro (fase folicular) e diestro (fase luteal) que são intervaladas entre dois períodos de cio. O ciclo estral apresenta uma duração média de $21,7 \pm 3,5$ dias, sendo a fase de estro com duração média $6,5 \pm 2,6$ dias e a fase de diestro com duração média de $14,9 \pm 2,8$ dias (GINTHER, 1992; BLANCHARD et al., 2003). No entanto, éguas idosas podem apresentar o ciclo estral mais longo, devido a uma taxa de crescimento folicular lenta (GINTHER et al., 2008).

A fase estral é caracterizada pela presença de um folículo dominante (> 30 mm de diâmetro) responsável pela secreção de estrógeno (E2) que induz o comportamento de cio, ou seja, receptividade ao garanhão. Assim, elevando os níveis do hormônio luteinizante (LH) pela ativação dos receptores nas células da granulosa, ocorrendo a ovulação e em seguida a formação do corpo lúteo (CL) por meio da retroalimentação positiva no sistema hipotalâmico hipofisário (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Essa elevação dos níveis de estrógenos promove no útero um aumento da vascularização e extravasamento de líquido dos vasos para a área intersticial estimulando a formação do edema endometrial, o qual tende a diminuir em dois dias antes da ovulação (McCUE et al., 2011).

A fase do diestro decorre entre 24 e 48 horas após ovulação, é a fase caracterizada a não receptividade ao garanhão. Depois da ovulação, ocorre a formação do corpo lúteo que é responsável pela produção de progesterona (P4), a qual permanece estável até o décimo segundo dia quando ocorre uma queda acentuada, seguida de luteólise entre o décimo quarto e

décimo sexto dia do ciclo estral (GINTHER, 1992), apresentando níveis plasmáticos de progesterona inferiores a 1ng/ml (SIROIS et al., 1989).

Normalmente, as éguas apresentam uma onda folicular, porém podem apresentar duas ondas (SIROIS et al., 1989; GINTHER, 1990), onde há maior predisposição para as raças Apallosa, Quarto de Milha (GINTHER, 1990) e Puro Sangue Inglês (STABENFELDT et al., 1972) na primeira metade da estação reprodutiva. Quando há ocorrência de outra onda, durante o final do estro ou início do diestro, de acordo com Ginther (1992) é denominada de onda secundária. Hafez e Hafez (2004) relatou que a onda secundária pode ser detectada entre 29 e 42% dos ciclos estrais, podendo ocorrer ainda uma ovulação no diestro ou surgimento de um folículo anovulatório (> 20 mm).

2.2. Controle Endócrino na Égua

A compreensão do funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), incluindo os hormônios participantes e as relações de retroalimentação entre eles, representa a base para o estudo da fisiologia reprodutiva (AURICH, 2011). Os órgãos que compõem esse eixo são o hipotálamo, localizado na base do encéfalo, a hipófise, dividida em adeno-hipófise e neuro-hipófise, e as gônadas (testículos ou ovários). Os principais hormônios envolvidos no eixo HHG incluem o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), testosterona, estrógeno (E2), inibina e progesterona (P4) (GINTHER et al., 2008).

O hipotálamo é o órgão responsável por converter os sinais neurológicos originados em estímulos externos e internos em descargas hormonais. Produz e secreta o GnRH pelos centros controladores de secreção tônica de forma contínua, por outro lado, durante a onda pré-ovulatória o GnRH é secretado em grandes concentrações de uma só vez, por meio do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, estimulando a liberação das gonadotrofinas, FSH e LH. Da mesma forma pelo fluxo retrógrado, mecanismo conhecido como “feedback” negativo, essas gonadotrofinas atingem o hipotálamo causando um bloqueio na liberação de tal hormônio (AURICH, 2011).

Os folículos iniciam a produção de E2 por estímulos do FSH, que ao atingir a circulação sanguínea no hipotálamo provoca um efeito positivo na secreção de gonadotrofinas na hipófise e um bloqueio da secreção tônica. Decorrente aos níveis de estrógenos provindos da produção crescente dos folículos em desenvolvimentos, a fêmea entra na fase de estro, manifestando receptividade ao macho. Segundo Ginther (1992), ao mesmo tempo são liberadas grandes quantidades de GnRH na circulação, oriundo dos centros controladores da onda pré-ovulatória.

No final desse processo, os folículos secretam a inibina bloqueando a secreção do FSH na hipófise. Em consequência, acarretará um pico de liberação de GnRH, aumentando a secreção de LH, responsável pelo amadurecimento do folículo e ovulação (HAFEZ, 1995). A ovulação consiste na ruptura do folículo dominante na fossa ovulatória, resultando na liberação do ovócito, células da granulosa e líquido folicular (BERGFELT et al., 2007) (Figura 01).

Por sua vez, as células da granulosa remanescente no local da ovulação, entram em um processo de luteinização pela ação do LH e passam a compor o corpo lúteo (CL). A luteinização modifica a atividade secretora das células da granulosa, que deixam de secretar E2 e começam a secretar P4 (BERGFELT et al., 2007). Aurich (2011) ressalta que a concentração sanguínea de P4 por volta de cinco a sete dias após a ovulação alcança seu limite máximo, ocasionando um “feedback” negativo do GnRH e, principalmente do LH.

Entre o 14° e 16° dia após a formação do corpo lúteo, considerando que a fêmea não tenha reconhecimento embrionário, haverá uma diminuição na concentração de P4 iniciando o processo de luteólise, em consequência da secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio (Figura 01) (GINTHER, 1992). Segundo Mckinnon et al. (2011) a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é dependente de receptores para ocitocina no útero e ainda, da habilidade individual em produzir $\text{PGF}_{2\alpha}$ pela autorregulação da expressão de COX-2 no endométrio.

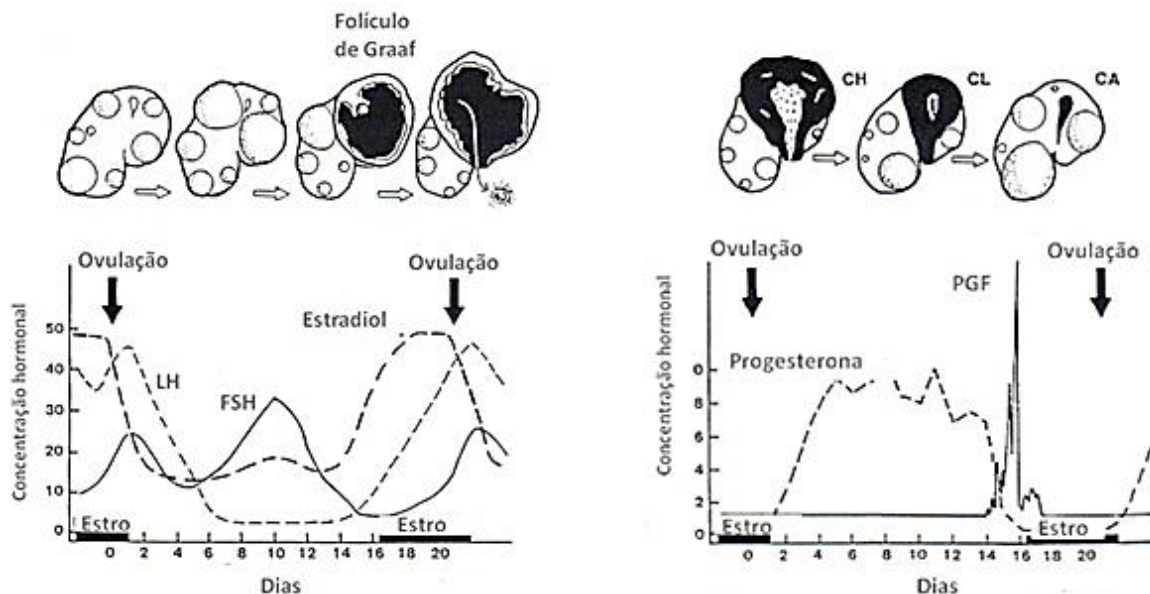


Figura 01: Padrão hormonal no ciclo estral da égua. Fonte: Modificado *Equine Reproduction*, McKinnon; McCue, 2011.

Após a luteólise, a concentração plasmática de progesterona diminui permitindo assim, o início de uma nova fase folicular (GINTHER, 1992). Entretanto se a égua tiver o reconhecimento embrionário, a principal fonte de progesterona para manter a gestação no

primeiro trimestre, é de responsabilidade do CL, que não poderá sofrer regressão (MCKINNON; VOSS, 1992; VANDERWALL, 2011).

2.3. Sazonalidade Reprodutiva na Égua

O padrão sazonal das atividades reprodutivas na égua, normalmente é decorrente da diminuição das ovulações no período de transição de outono, que se torna mínima ou ausente no inverno, aumentando lentamente na primavera e chegando ao normal durante o verão (BERGFELT, 2009). Segundo Nagy; Guillaume; Daels (2000), a sazonalidade reprodutiva nas éguas é envolvida por uma complexa rede fisiológica, dividida em fatores intrínsecos hormonais e por fatores extrínsecos como a nutrição, fotoperíodo e temperatura.

A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal, na fase escura do dia e, é controlada por estímulos nervosos partindo do nervo óptico (BERGFELT, 2009). Na espécie equina, a melatonina atua de forma negativa na endocrinologia reprodutiva inibindo a produção de GnRH, o qual envolve uma série de neurotransmissores e células alvo localizada no hipotálamo (MALPAUX; THIE´RY; CHEMINEAU, 1999).

Segundo Bergfelt (2009), na transição de verão para outono, o período de luminosidade diária diminui gradativamente até o inverno, estimulando a produção de melatonina, influenciando negativamente nos níveis de GnRH. Com essa redução na atividade folicular ovariana no período de transição, ocorre ausência de ovulação por apresentar um declínio marcante nas concentrações de LH chegando a concentrações mínimas na fase anovulatório, período esse denominado por anestro estacional (PALMER; GUILLAUME, 1992).

O anestro estacional pode durar entre dois e seis meses, período que pode ser influenciado por alterações no fotoperíodo, clima e nutrição (NAGY; GUILLAUME; DAELS, 2000). Durante esse período, os ovários ficam com a estrutura e função hormonal quiescentes, apresentando-se pequenos, duros e lisos, com poucos folículos entre 15 a 20 mm de diâmetro (KING, 2011).

Entretanto, Aurichi (2011) ressalta que 30% das fêmeas equinas apresentam ciclo ovulatório durante o inverno e, ainda se observa uma maior porcentagem de gordura corporal nesses animais comparados com os que entram em anestro estacional, provavelmente devido à alta concentração circulante de leptina (SALAZAR-ORTIS et al., 2011).

Por outro lado, na transição de inverno para primavera, a síntese do hormônio melatonina é inibida causando estímulo positivo nas atividades hipotalâmicas, devido à maior luminosidade diária. Com isso, a atividade reprodutiva volta a ser restabelecida gradativamente.

Nesta fase, a atividade cíclica ainda é irregular, podendo ocorrer crescimento e/ou atresia folicular ao mesmo tempo (HAFEZ, 1995).

A atividade reprodutiva se restabelece completamente quando ocorre a primeira ovulação do ano, caracterizando o início da estação ovulatória. Deste modo as éguas passam a apresentar seu ciclo reprodutivo regular (NAGY; GUILLLAUME; DAELS, 2000). A disponibilidade de alimento, a reserva de gordura e o peso corporal são fatores importantes na duração do período reprodutivo nas éguas. Fato que em conjunto com o fotoperíodo determina o começo e duração da estação reprodutiva (SALAZAR-ORTIS et al., 2011).

2.4. Métodos de Controle da Sazonalidade Reprodutiva

A indústria do cavalo exerce uma pressão econômica em obter um potro bem-nascido, termo esse utilizado a animais que nascem o mais próximo possível do ano hípico, sendo 1° de janeiro no hemisfério norte e 1° de julho no hemisfério sul (GINTHER, 1992; LANGLOIS; BLOUIN, 1996). Sendo esta a justificativa para antecipar a ciclicidade das éguas e ainda, a utilização de receptoras em anestro estacional otimizando os programas comerciais de transferência de embriões (MCKINNON et al., 2011).

Tradicionalmente, a exposição de éguas a um fotoperíodo artificial é a técnica mais usada para induzir o desenvolvimento folicular almejando a primeira ovulação do ano. No entanto, a terapia com luz artificial não funciona em todas as situações, por ser considerado um tratamento rico em detalhes (NAGY; GUILLLAUME; DAELS, 2000).

Como consequência, várias estratégias terapêuticas, com o uso de protocolos hormonais, têm sido investigadas ao longo dos anos para utilizar éguas receptoras acíclicas (McCUE; LOGAN; MAGEE, 2007). Uma vez que, o ciclo artificial é induzido administrando hormônios exógenos com o intuito de mimetizar um ciclo natural, preparando o útero para recepção do embrião e ainda, a manutenção da gestação (BOTELHO et., 2015).

Os primeiros relatos da utilização de éguas como receptoras de embriões acíclicas, foi em 1985 por Hinrichs et al. que estabeleceram um protocolo em éguas ovariectomizadas, com o objetivo de reduzir o manejo de rufiação e as palpações transretais. No entanto, essa técnica tornou-se desvantajosa por ser considerada uma técnica difícil e de alto custo. Por certo, o uso de receptoras acíclicas sazonais é a melhor opção, uma vez que, dispensa a realização da técnica cirúrgica e ainda, apresenta os mesmos resultados que éguas ovariectomizadas (LAGNEAUX; PALMER, 1993).

2.4.1. Luz Artificial

Segundo Mckinnon et al (2011), o tratamento com a utilização de luz artificial em éguas, é considerado um dos mais antigos e confiáveis métodos de indução da atividade ovariana e foi relatado pela primeira vez em 1947 por Bukhardt. Deste modo, pesquisadores vêm seguindo essa metodologia, demonstrando o efeito benéfico do fotoperíodo artificial na transição de primavera.

O tratamento deve ser iniciado a partir do solstício de inverno, no qual as éguas são submetidas a uma exposição diária total de 16 horas (luz natural + luz artificial), adicionando a luz artificial no final do dia. Após duas semanas de tratamento as éguas já apresentam uma considerável atividade folicular logo, entre seis a 12 semanas a ovulação é detectada (NAGY; GUILLAUME; DAELS, 2000; MCCUE; LOGAN; MAGEE, 2007; MCKINNON et al., 2011).

Outro aspecto importante é a intensidade luminosa no tratamento com luz artificial, recomenda-se a utilização de lâmpadas incandescentes de 100 lux para que ocorra um estímulo reprodutivo (BUKHARDT, 1947). Para cada lâmpada incandescente (100 W) é necessária uma área de 3,5 x 3,5 m e ainda, para medir a intensidade da luz, deve-se utilizar um medidor de luz digital portátil (MCCUE; LOGAN; MAGEE, 2007). Por outro lado, Guillaume et al. (2000) conseguiram uma resposta da atividade ovariana utilizando luz incandescente de 10 lux.

A condição corporal afeta profundamente o grau de regressão ovariana e a duração do estado anovulatório devido à estação do ano. A maioria dos estudos com atividade ovariana induzida por fotoperíodo artificial no período de transição inverno-primavera deve ser realizada em éguas com bom estado corporal (MCKINNON et al., 2011).

2.4.2. Progestágenos e Estrógenos

De acordo com Pinto (2011) o termo progestágeno se refere a um grupo de esteroides naturais ou sintéticos que causam efeito análogo ao da P4 uma vez que, apresentam alterações uterinas semelhantes as observadas em éguas cíclicas gestantes. A P4 é um hormônio esteroide, derivada do colesterol, considerada uma molécula lipofílica e é secretada pelas células luteínicas do CL, pela placenta e pelas glândulas adrenais (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Sua secreção ocorre primariamente pelo CL, com a função de preparar o útero para a recepção do embrião, assim como manter a gestação no primeiro trimestre aumentando a atividade secretora das glândulas endometriais e a tonicidade uterina (PINTO, 2011). Com o decorrer da gestação outras fontes de P4 tornam-se ativas, como os CL acessórios e a unidade feto-placentária (VANDERWALL, 2011).

Diversos estudos confirmam a eficiência de protocolos a base de estrógenos e progesterógenos em éguas acíclicas como receptoras de embriões em programas comerciais de transferência de embrião (LAGNEAUX; PALMER, 1993; CARNEVALE et al., 2000; GRECO et al., 2012; BOTELHO et al., 2015; SILVA et al., 2017).

Segundo Pinto (2011), a utilização desses hormônios possibilita a indução de mudanças desejáveis no útero, parecidas com as que ocorrem no ciclo estral de éguas cíclicas. Uma vez que o estrógeno exerce efeito na formação de edema uterino, mimetizando o estro e posteriormente ocorre aumento do tônus uterino e estímulo da secreção histotrófica provocado pela progesterona (VANDERWALL, 2011).

É recomendado a utilização dos protocolos hormonais à base de estrógeno e progesterona no período de transição de primavera ou outono. Silva et al. (2017) observaram a presença de edema uterino discreto a intermediário nas éguas antes do início do tratamento no grupo de transição em relação a éguas em anestro profundo, provavelmente devido a população folicular detectada nas éguas em anestro (folículos < 20 mm e ausência de CL) e transicionais (folículos entre 20 e 30 mm e ausência de CL). Considerando que, quanto maior a população folicular, maior a capacidade de sintetizar estrógeno.

Em pesquisas de Rocha Filho et al. (2004) e de Testa; Carmo; Alvarenga (2005) as éguas acíclicas foram tratadas com estrógenos, durante três dias consecutivos a partir do dia da ovulação da doadora. O tratamento com progesterona de longa ou curta duração iniciou-se um dia após a última aplicação de estrógeno e continuou semanalmente até os 120 dias de gestação. Os mesmos autores observaram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o grupo não cíclico e o cíclico, demonstrando que este tratamento é seguro na manutenção da gestação.

Após a administração de progesterona (P4) longa ação (LA), o edema uterino e as concentrações de estrógenos dos grupos previamente tratados com BE, diminuíram da mesma forma às concentrações de éguas cíclicas após a ovulação (SILVA et al., 2017). Entretanto, o tônus uterino e a eco textura no momento da transferência de embrião foram menores em todas as éguas tratadas com hormônios do que nas éguas do grupo controle, embora tal fato não pareça afetar as taxas de prenhez (OLIVEIRA NETO et al., 2018).

Em contrapartida, a responsabilidade da administração de progesterona seja ela de curta ou longa ação, são dos proprietários e seus colaboradores, que normalmente não estão dispostos a aplicar injeções semanais de hormônios (OLIVEIRA NETO et al., 2018), pois a progesterona por ser um veículo oleoso, apresenta o risco de inflamação no local da aplicação (BERGFELT.,

2007). Além do que, o uso de receptoras acíclicas nos programas comerciais de transferência de embriões acarreta em maiores custos com protocolos hormonais (HARTMAN, 2011).

2.5. Agentes Indutores da Ovulação

Os tratamentos hormonais para indução da ovulação são rotineiramente utilizados na indústria equina, pois fornecem vários benefícios econômicos no que diz respeito ao manejo reprodutivo assistido. A gonadotrofina coriônica humana (hCG) e análogos do GnRH, como o Acetato de Deslorelina, são os agentes indutores de ovulação mais utilizados além do que, estão disponíveis comercialmente em muitos países (MCKINNON; MCCUE, 2011).

2.5.1. Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)

O hCG é um hormônio glicoproteico produzido pela placenta humana e apresenta efeito mimetizando o LH, portanto, pode ser utilizado como um indutor da ovulação em éguas (MCKINNON; MCCUE, 2011). Alguns fatores extrínsecos como as condições ambientais e o estresse térmico podem interferir na resposta ovulatória das éguas tratadas com hCG, deste modo as éguas tratadas durante o verão, época do ano com maior umidade e temperaturas mais elevadas, mostraram uma melhor eficiência na ovulação do que na fase de transição (NEWCOMBE; CUERVO-ARANGO, 2016; TAZAWA et al., 2017).

O hCG deve ser usado na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro e edema uterino grau III, na escala entre zero e III, com eficiência de induzir a ovulação em até 48 horas, em 60% (27/45) das éguas no período ovulatório (GOMES et al., 2014). Por outro lado, McCue; Magee; Gee (2007) relataram que o mesmo agente indutor de ovulação, apresentou uma eficiência na resposta ovulatória em 88,3% das éguas das raças Quarto de Milha, Paint Horse e Árabes utilizando 2500 UI de hCG (Chorulon®; Intervet Inc., Millsboro, DE).

Algumas éguas após administrações repetidas de hCG, podem desenvolver anticorpos que reduzem significativamente a eficácia da resposta ovulatória (NEWCOMBE; CUERVO-ARANGO, 2016). Em um total de 60 éguas, 38 foram expostas a uma ou mais doses de 2500 UI de hCG entre 18 e 125 dias antes do início do experimento, destas, 42,1% (16/38) foram diagnosticadas positivas para anticorpo hCG (SIDDIQUI et al., 2009).

Os mesmos autores relataram que após 30 horas da administração do hCG, não foi possível detectar a presença do agente indutor de ovulação no plasma das 16 éguas constatadas positivas e ainda, houve uma diminuição da porcentagem de fluxo sanguíneo na parede do folículo avaliado por ultrassonografia Doppler, modo espectral. No entanto, a taxa de

recuperação de ovócitos para éguas positivas (44%) e negativas (68%), não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$).

Éguas com idade entre sete e dez anos obtiveram uma resposta ovulatória mais curta $41,8 \pm 0,8$ horas em comparação àquelas mais jovens $45,2 \pm 1,0$ horas no tratamento de 2500 UI de hCG, no entanto não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$). Além disso, as éguas mais velhas (≥ 10 anos) mostraram uma tendência a uma menor resposta ovulatória, quando comparada com éguas mais jovens (< 10 anos) (TAZAWA et al., 2017). O mesmo foi relatado por Newcombe; Cuervo-Arango (2016), no qual obtiveram uma resposta ovulatória de 25,6 % em 54 ciclos tratados com 1500 UI de hCG, apresentando idade média de $14,8 \pm 1,4$ anos.

2.5.2. Acetato de Deslorelina

O Acetato de Deslorelina é um análogo do GnRH, que estimula a liberação das gonadotrofinas da glândula pituitária anterior, portanto é considerado como um agente indutor de ovulação (McKinnon; McCue, 2011). Além disso, pode ser usado em ciclos subsequentes, conforme a necessidade, ou ainda se a égua apresentar um histórico de falha no uso do hCG para induzir a ovulação. Tal fato foi relatado por McCue; Magee; Gee (2007) que ao utilizarem o Acetato de Deslorelina em mais de um ciclo estral, não observaram diferença significativa ($p>0,05$) no intervalo de tratamento ou a porcentagem de éguas ovulando até 48 horas.

Seguindo os mesmos parâmetros para a utilização do hCG, o Acetato de Deslorelina também pode ser usado na presença de um folículo ≥ 35 mm de diâmetro e edema uterino grau III, na escala entre zero e III (McCUE; MAGEE; GEE, 2007; FERRIS et al., 2012; SANTOS et al., 2018). A utilização do Acetato de Deslorelina (SucroMate, Thorn-Biosciences, Louisville, KY) na dose de 1,8 mg, mostrou ser eficiente em induzir a ovulação em 89,9% (151/168) das éguas tratadas com intervalo médio de $41,4 \pm 9,4$ horas (FERRIS et al., 2012).

Gomes et al. (2014) relataram que não há diferença significativa ($p>0,05$) na resposta ovulatória em éguas tratadas entre o período de transição 78,6% (11/14) e período ovulatório 68,8% (108/157) com Acetato de Deslorelina (Sincrorrelin; Ouro Fino, Brasil) na dose de 1,5 mg por via intramuscular. Sob outra perspectiva, Newbombe; Cuervo-Arango (2016) utilizando outro análogo do GnRH relataram uma diferença na taxa de ovulação em até 48 horas após o tratamento entre o período de transição 61,1% e o período ovulatório 88,5%.

A combinação dos agentes indutores de ovulação hCG e análogos do GnRH pode ser utilizada, no entanto essa combinação onera o custo dos protocolos hormonais. Gomes et al., (2014) ao utilizar 1667 UI de hCG (Vetecor; Hertape-Calier, Spain) associado à 1,5 mg de

Deslorelina (Sincrorrelin; Ouro Fino, Brazil), obtiveram uma resposta ovulatória em 73% (243/333) semelhante aos grupos tratados com hCG 60% (27/45) e Acetato de Deslorelina 68.8% (108/157), não apresentando diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

A proposta geral do trabalho é comparar a taxa de prenhez em éguas receptoras de embriões cíclicas e acíclicas na fase de transição de primavera sobre o efeito de luz artificial e hormônios exógenos.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar a resposta do tratamento fotoperíodo artificial nas éguas em anestro estacional, quanto a sua ciclicidade na fase de transição de primavera;

Avaliar a resposta do tratamento hormonal nas éguas em anestro estacional, quanto a sua capacidade de receber o embrião na fase de transição de primavera;

Avaliar o desenvolvimento do conceito até os 30 dias de gestação em receptoras na fase de transição de primavera *versus* fase ovulatória (verão).

REFERÊNCIAS

- AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 220-228, 2011.
- BERGFELT, D.R. Anatomy and physiology of the mare. In: SAMPER, J.C. 2 ed. **Equine breeding management and artificial insemination**. Missouri: Saunders Elsevier, p. 113-131, 2009.
- BERGFELT, D.R.; ADAMS, G.P. Ovulation and Corpus Luteum Development. In: Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO, editors. **Current Therapy in Equine Reproduction**. Philadelphia: Saunder Elsevier, p.492, 2007.
- BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L. **Manual of Equine Reproduction**. 3ª Ed, Mosby, Elsevier, cap.2, p.9-15, 2003.
- BOTELHO, J.H.V.; PESSOA, G.O.; ROCHA, L.G.P.; YESTE, M. Hormone supplementation protocol using estradiol benzoate and long-acting progesterone is efficient in maintaining pregnancy of anovulatory recipient mares during autumn transitional phase. **Animal Reproduction Science**, v.153, p. 39-43, 2015.
- BURKHARDT, J. Transition from anestrus in the mares and the effects to artificial lighting. **Journal Agriculture Science**, v.30, p. 64-68, 1947.
- CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, R.J.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.A.; VANDERWAL, D.K; MCCUE, P.M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 54, p. 965-79, 2000.
- FERRIS, R.A.; HATZEL, J.N.; LINDHOLM, A.R.G.; SCOFIELD, D.B.; MCCUE, P.M. Efficacy of Deslorelin Acetate (SucroMate) on Induction of Ovulation in American Quarter Horse Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p.285-288, 2012.
- GINTHER, O.J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p. 311-320, 1990.
- GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects**. 2. ed. Editora Cross Plains WI: Equiservices, p. 642, 1992.
- GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Dynamics of the Equine Preovulatory Follicle and Perioovulatory Hormones: What's New? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 8, 2008.
- GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Seasonal influence on equine follicle dynamics. **Animal Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 31-44, 2004.
- GOMES, R.G; OLIVEIRA, R.L.; SCHUTZER, C.G.C.; BARREIROS, T.R.R.; SENEDA, M.M. Effect of Deslorelin and/or Human Chorionic Gonadotropin on Inducing Ovulation in Mares During the Transition Period Versus Ovulatory Season. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p.1140–1142, 2014.
- GRECO, G.M.; BURLAMAQUI, F.L.G.; PINNA, A.E.; QUEIROZ, F.J.R.; CUNHA, M.P.S.; BRANDÃO, F.Z. Use of long-acting progesterone to acyclic embryo recipient mares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.3, p.607-611, 2012.

GUILLAUME, D.; DUCHAMP, G.; NAGY, P.; PALMER, E. Determination of minimum Light treatment required for photoestimulation of winter anoestrous mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, p.205-216, 2000.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, 6 ed., São Paulo: Manole, p. 582, 1995.

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

HARTMAN, D.L. Embryo Transfer. In: MC KINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2 ed. Oxford:Wiley-Blackwell, v. 2, cap. 303, p. 2871-2879, 2011.

KING, S.S. Autumnal Transition Out of the Breeding Season. In: McKINNON, A.O. et al. **Equine Reproduction**. 2ª ed. Oxford:Wiley-Blackwell, v. 2, cap.181, p.1732-1753, 2011.

LAGNEAUX, D.; PALMER, E. Embryo transfer in anoestrous recipient mares: attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 107-110, 1993.

LANGLOIS, B.; BLOUIN, C. Effect of a horse's month of birth on its future performances. In: **Annual Meeting of The European Association for Animal Production**, v.47, 1996.

LIMA, R. A. S. & CINTRA, A. G. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. 2016. 56 p. Brasília, MAPA.

MALPAUX, B.; THIE'ry, J.C.; CHEMINEAU, P. Melatonin and the seasonal control of reproduction. **Reproduction Nutrition Development**. v.39, p.355-366, 1999.

MCCUE, P.M., SCOGGIN, F.C, LINDHOLMIN, A.R.G. Estrus In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2 ed. Oxford: Wiley-Blackwell, v. 2, cap.179, p. 1716-1727, 2011.

MCCUE, P.M.; LOGAN, N.L.; MAGEE, C. Management of the transition period: physiology and artificial photoperiod. **Equine Veterinary Education**. p.146-150, 2007.

MCCUE, P.M.; MAGEE, C.; GEE, E.K. Comparison of Compounded Deslorelin and hCG for Induction of Ovulation in Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, p. 58-61, 2007.

MCCUE, P.M.; SCOGGIN, C.F.; LINDHOLM, A.F.G. Estrus. In: MC KINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2 ed. Oxford: Wiley-Blackwell v. 2, p.1716-1727, 2011.

MCKINNON, A.O.; MCCUE, P.M.; Induction of Ovulation In: MC KINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2 ed. Oxford: Wiley-Blackwell v. 2, cap. 196, p.1858-1869, 2011.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, E.W.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**, 2 ed., v.2, 2011.

MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Ed, 1992.

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 245-62, 2000.

NEWCOMBE, J.R.; CUERVO-ARANGO, J. What are the options for induction of ovulation in the mare in Europe? Buserelin as an alternative to hCG. **Journal of Equine Veterinary Science**, 2016.

OLIVEIRA NETO, I.V.; CANISSO, I.F.; SEGABINAZZI, L.G.; DELL'AQUA, C.P.F.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA Jr., J.A. Synchronization of cyclic and acyclic embryo recipient mares with donor mares. **Animal Reproduction Science** v.190, p.1–9, 2018.

PALMER E, GUILLAUME D. Photoperiodism in the equine species—what is a long night? **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 21–30, 1992.

PINTO, C.R.F. Progestagens and Progesterone. In: MC KINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2 ed. Oxford: Wiley-Blackwell, vol. 2, cap. 189, p. 1811-1817, 2011.

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. **Animal Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 91-95, 2004.

SALAZAR-ORTIS, J.; CAMOUS, S.; BRIANT, C.; LARDIC, L.; CHESNEAU, D.; GUILLAUME, D. Effects of nutritional cues on the duration of the winter anovulatory phase and on associated hormone levels in adult female Welsh pony horses (*Equus caballus*). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, p. 16-20, 2011.

SANTOS, G.O.; BASTOS, H.B.A.; SÁ, M.A.F.; JACOB, J.C.F.; WOLF, C.A.; MATTOS, R.C.; NEVES, A.P. Combination of hCG and Deslorelin Acetate on the Induction of Ovulation in Mares: Changes in Follicular Fluid Protein Profile. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.66, p. 124-125, 2018.

SIDDIQUIL, M.A.R.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Effect of hCG in the Presence of hCG Antibodies on the Follicle, Hormone Concentrations, and Oocyte in Mares. **Reproduction Domestic Animal**, v. 44, p. 474–479, 2009.

SILVA, E.S.M.; IGNÁCIO, F.S.; FRITSCH, S.C.; ZANONI, D.S.; PANTOJA, J.C.F.; OLIVEIRA-FILHO, J.P.; MEIRA, C. Administration of 2.5 mg of estradiol followed by 1,500 mg of progesterone to anovulatory mares promote similar uterine morphology, hormone concentrations and molecular dynamics to those observed in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 97, p. 159-169, 2017.

SIROIS, J., BALL, B.A., FORTUNE, J.E. Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the oestrous cycle and after hemiovariectomy in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, p. 43-48, 1989.

STABENFELDT, G.H.; HUGHES J.P.; EVANS J.W. Ovarian activity during the estrous cycles of the mare. **Endocrinology**, Baltimore, v. 90, p. 1379 – 1383, 1972.

TAZAWA, S.P.; GASTAL, M.O.; SILVA, L.A.; EVANS, M.J.; GASTAL, E.L. Preovulatory Follicle Dynamics, Ovulatory and Endometrial Responses to Different Doses of hCG, and Prediction of Ovulation in Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, 2017.

TESTA, A.C.; CARMO, M.T.; ALVARENGA, M.A. Perda embrionária precoce em éguas receptoras de embrião em anestro tratadas com progesterona de longa ação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 198-200, 2005.

VANDERWALL, D.K. Progesterone. In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2 ed. Oxford: Wiley-Blackwell, vol.2, cap.170, p. 1637-1641, 2011.

Capítulo 2

O artigo a seguir foi redigido de acordo com as normas do periódico científico Revista Brasileira de Reprodução Animal: <http://cbra.org.br/br/publicacoes/revista-brasileira-de-reproducaoanimal/instrucoesrbra/>

Eficiência de luz artificial e suplementação hormonal na manutenção da gestação de éguas no período da transição de primavera

Efficiency of artificial light and hormonal supplementation in maintenance of earth management in the spring transition period

Guilherme Cunha de Oliveira^{1,5}, Amanda Pifano Neto Quintal², André Belico de Vasconcelos³, David Horber⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil.

²Docente da Faculdades Associadas de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil.

³Docente do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil.

⁴Médico Veterinário na *Equine Embryo Transfer Facility*

⁵Correspondência: cunhagui@gmail.com

Resumo

Como alternativa para aumentar a produtividade das doadoras no decorrer da estação reprodutiva, a proposta geral do trabalho foi comparar a taxa de prenhez aos 14 e 30 dias de gestação em éguas receptoras de embriões cíclicas e acíclicas na fase de transição de primavera sobre o efeito de luz artificial e hormônios exógenos. Foram utilizadas como receptoras de embrião 48 éguas mestiças entre quatro e 12 anos em *Weatherford – TX, EUA*. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente em G1 (controle, n=16) éguas cíclicas na fase ovulatória, G2 (luz artificial, n=16) éguas acíclicas, tratamento de luz artificial por 60 dias na fase de transição e G3 (acíclico, n=16) éguas acíclicas na fase de transição, tratamento hormonal. Foi aplicado análise descritiva em percentual, seguida do teste de contingência Qui-quadrado, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A porcentagem de prenhez foi de 81,25% (13/16), 87,5% (14/16) e 81,25 (13/16) para G1, G2 e G3, respectivamente aos 30 dias. Não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos G1 e G2; G1 e G3; G2 e G3. Dessa forma, a utilização de receptoras em anestro estacional, submetidas a tratamento hormonal ou estimuladas por luz artificial, mostraram-se eficazes para atender ao programa de transferência de embrião, no período de transição de primavera.

Palavras-chave: equino, sazonalidade reprodutiva, anestro, protocolo hormonal.

Abstract

As an alternative to increase donor productivity during the reproductive season, the general proposal of the study was to compare the pregnancy rate at 14 and 30 days gestation in recipient

mares of cyclic and acyclic in the spring transition phase on the effect of artificial light and exogenous hormones. 48 crossbred mares between four and 12 years old were used as embryo recipients in Weatherford - TX, USA. The animals were randomly assigned to G1 (control, n = 16) cyclic mares in the ovulatory phase, G2 (artificial light, n = 16) acyclic mares, artificial light treatment for 60 days in the transition phase and G3 (acyclic, n = 16) acyclic mares in the transition phase, hormonal treatment. A descriptive analysis was applied in percentage, followed by the chi-square contingency test, at a significance level of 5% ($p < 0.05$). The percentage of pregnancy was 81.25% (13/16), 87.5% (14/16) and 81.25 (13/16) for G1, G2 and G3, respectively at 30 days. There was no significant difference ($p > 0.05$) between groups G1 and G2; G1 and G3; G2 and G3. Thus, the use of recipients in seasonal anoestrus, submitted to hormonal treatment or stimulated by artificial light, were shown to be effective for the embryo transfer program during the spring transition period.

Keywords: *equine, reproductive seasonality, aneustrous, hormonal protocol.*

Introdução

A espécie equina é classificada reprodutivamente como poliéstrica sazonal, manifestando vários ciclos estrais com comportamento reprodutivo durante a primavera e verão, devido a maior luminosidade diária, esse período é caracterizado pela fase ovulatória (Aurich, 2011). Durante os períodos de baixa luminosidade diária a atividade reprodutiva é reduzida gradativamente até a fase de anestro sazonal (Bergfelt, 2009).

Estas fases podem ser baseadas quanto a dinâmica folicular apresentada pelas éguas nos diferentes períodos, sendo fase de anestro estacional, fase de transição de primavera, fase ovulatória e fase de transição de outono (Ginther et al., 2004). Por tanto, o fotoperíodo apresenta ação direta sobre o início da estação reprodutiva nas éguas (Bergfelt, 2009).

O período de transição de primavera (inverno – primavera), implica em baixo número de éguas receptoras de embriões (Silva et al., 2017). Rocha Filho et al. (2004) explica que durante esse período de transição a baixa disponibilidade de alimentos em decorrência do clima e principalmente do manejo realizado entre doadoras e receptoras, faz com que éguas doadoras de embriões iniciem suas atividades ovarianas mais cedo, enquanto as receptoras permanecem em anestro estacional (Rocha Filho et al., 2004; Silva et al., 2017).

Por certo, o comportamento sazonal reprodutivo representa um grande gargalo a veterinários e criadores. Dessa forma, grupos de pesquisas implementaram uma linha de pesquisa que busca antecipar a ciclicidade das éguas, e utiliza-las como receptoras acíclicas em

programas comerciais de transferência de embriões (Nagy; Guillaume; Daels, 2000; Botelho et al., 2015).

O tratamento com luz artificial é utilizado como método de controle da sazonalidade reprodutiva e normalmente é iniciado em meados de inverno para antecipar a primeira ovulação, objetivando aumentar a produtividade das doadoras ao longo do ano (Nagy; Guillaume; Daels, 2000).

A eficiência de protocolos hormonais que utilizam estrógeno e progesterona em éguas acíclicas receptoras de embriões, é esclarecida por vários pesquisadores pois propiciam taxas de gestação similares às de receptoras cíclicas (Carnevale et al., 2000; Rocha Filho et al. 2004; Botelho et al., 2015; Silva et al., 2017), uma vez que a utilização desses hormônios possibilita a indução de mudanças desejáveis no útero, parecidas com as que ocorrem nas éguas cíclicas (Pinto, 2011).

Vale ressaltar, que há décadas os pesquisadores se confrontam entre os diferentes protocolos hormonais em relação a dose e/ou frequência de administração. Baseado neste contexto, a proposta geral deste trabalho foi a comparação da taxa de prenhez em éguas receptoras de embriões cíclicas e acíclicas na fase de transição de primavera sobre o efeito de luz artificial e hormônios exógenos.

Materiais e Métodos

Período e Local do Experimento

O trabalho foi realizado em uma Central Especializada em Reprodução Equina, localizada no município de *Weatherford*, situado no interior do estado do *Texas*, durante a estação de monta 2017 e 2018.

Animais

Foram utilizadas como receptoras de embrião 48 éguas mestiças, com idade entre quatro e 12 anos, ginecologicamente sadias e com bom estado corpóreo, pesando entre 400-500 kg. Os animais foram mantidos em piquetes sobre o mesmo manejo alimentar, com *Bermuda grass* (*Cynodon dactylon*) e *Alfafa* (*Medicago sativa*), arraçoadas com concentrado de 12% de proteína bruta uma vez ao dia e livre acesso à água em bebedouro coletivo e sal mineralizado.

Grupos Experimentais

Dentre as 48 éguas utilizadas, haviam éguas acíclicas na fase de transição de primavera e éguas cíclicas na fase ovulatória (verão). Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em

três grupos com 16 animais, denominados G1 (grupo controle) composto por éguas cíclicas na fase ovulatória, as quais apresentaram ciclos estrais normais com presença de folículo ovulatório e/ou CL, G2 (grupo luz artificial) composto por éguas acíclicas que por sua vez, receberam tratamento de luz artificial almejando a primeira ovulação na fase de transição, tornando-as cíclicas e G3 (grupo acíclico) éguas acíclicas na fase de transição, as quais apresentaram folículos com diâmetro inferior a 20 mm e ausência de CL que por sua vez, receberam tratamento hormonal previamente a transferência de embrião e durante a gestação.

Todas as éguas foram examinadas a cada 48 horas por meio de ultrassonografia transretal modo-B (Hitachi, ALOKA Prosound 2, Japão) usando transdutor linear de cinco MHz de frequência. O exame ultrassonográfico auxiliou a avaliação da condição uterina e ovariana das receptoras assim como o diagnóstico de gestação aos 14 e 30 dias.

Protocolo de Luz Artificial

As éguas do G2 foram estimuladas por 60 dias de luz artificial, para tal foram distribuídos igualmente holofotes, em um piquete previamente preparado, a uma intensidade de 100 lux de luz incandescente fria, durante cinco horas (17:00 às 22:00). Após o período de exposição a luz artificial, os animais eram transferidos para o piquete, com os demais animais.

Após 30 dias de tratamento pode-se observar atividade ovariana em alguns animais, os quais iniciaram o ciclo estral com presença de folículo ovulatório, almejando a primeira ovulação do ano, tornando-se cíclicas na fase de transição de primavera.

Protocolo Hormonal

Os animais cíclicos, pertencentes aos grupos G1 (verão) e G2 (primavera), quando observada a presença de folículo ≥ 35 mm de diâmetro e edema uterino \geq grau II, utilizou-se 1,5 mg de Acetato de Deslorelina*, por via intramuscular e 1500 UI de hCG*, por via intravenosa para induzir a ovulação. Esses animais foram novamente avaliados a cada 24 horas para verificar o dia da ovulação, sendo considerado o dia zero (D0).

Inicialmente, as éguas acíclicas, G3 foram tratadas com três doses de 1,5 mg de Benzoato de Estradiol*, por via intramuscular, sendo uma dose por dia. Um dia após a terceira dose as éguas foram examinadas por meio de ultrassonografia para avaliação do edema uterino. Confirmada a presença de edema uterino \geq grau II, estas foram consideradas aptas para administrar-se 180 mg de P4 de curta ação*, por via intramuscular em um único ponto, sendo esse dia considerado o D0, ou seja, o mesmo utilizado para o G1 e G2.

*Todos os hormônios foram manipulados pela empresa *Equine Embryo Transfer Facility* (Não serão fornecidas as concentrações e detalhes da formulação, por contrato ético).

Transferência de Embrião

As receptoras foram sincronizadas com as doadoras para a recepção do embrião entre quatro a sete dias após a ovulação, ou seja, entre D4 e D7 do ciclo. Previamente as receptoras foram classificadas de acordo com o tônus uterino, ecogenicidade endometrial e presença de corpo lúteo somente nas éguas cíclicas (Fleury et al., 2006), posteriormente foram ordenadas pela qualidade uterina para recepção do embrião.

Os embriões eram oriundos de programas comerciais de TE de todo o estado do *Texas*, os quais chegavam até a central de reprodução refrigerados em caixas térmicas comerciais e em diversos meios de cultivo. Todos os embriões utilizados no experimento foram considerados homogêneos com blastômero de tamanho e cor uniformes.

Os diagnósticos de gestação foram realizados em dois momentos, 14 e 30 dias após a data de ovulação da doadora com a utilização de exame ultrassonográfico, onde se verificou a presença da vesícula embrionária no útero. Nas éguas do G1 e G2, verificou-se também a presença de corpo lúteo compacto e uniformemente ecogênico no ovário. Nas receptoras do G3, após a confirmação do diagnóstico de gestação, estas permaneceram com a administração de P4 injetável (180 mg) semanalmente, até os 120 dias de gestação devido à fisiologia individual da espécie quanto à produção de tal hormônio (Alvarenga, 2010).

Análise Estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa *GraphPadPrism 6.0* (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, USA). O modelo matemático foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC), e aplicando análise descritiva em percentual, seguida do teste de contingência Qui-quadrado, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

No geral, os resultados do grupo controle (G1) apresentam índices reprodutivos de 87,5% (14/16) aos 14 dias de gestação (figura 01), sendo considerado satisfatório em um programa comercial de TE, os quais foram superiores aos observados por Greco et al. (2012) 44,12% (319/723), Botelho et al. (2015) 53,3% (16/30) e Oliveira Neto et al. (2018) 75% (15/20). Este incremento nas taxas de prenhez pode estar relacionado à escolha da égua receptora em função da avaliação ginecológica realizada no momento da ovulação, que influencia diretamente sobre as taxas de prenhez (Hartman, 2011).

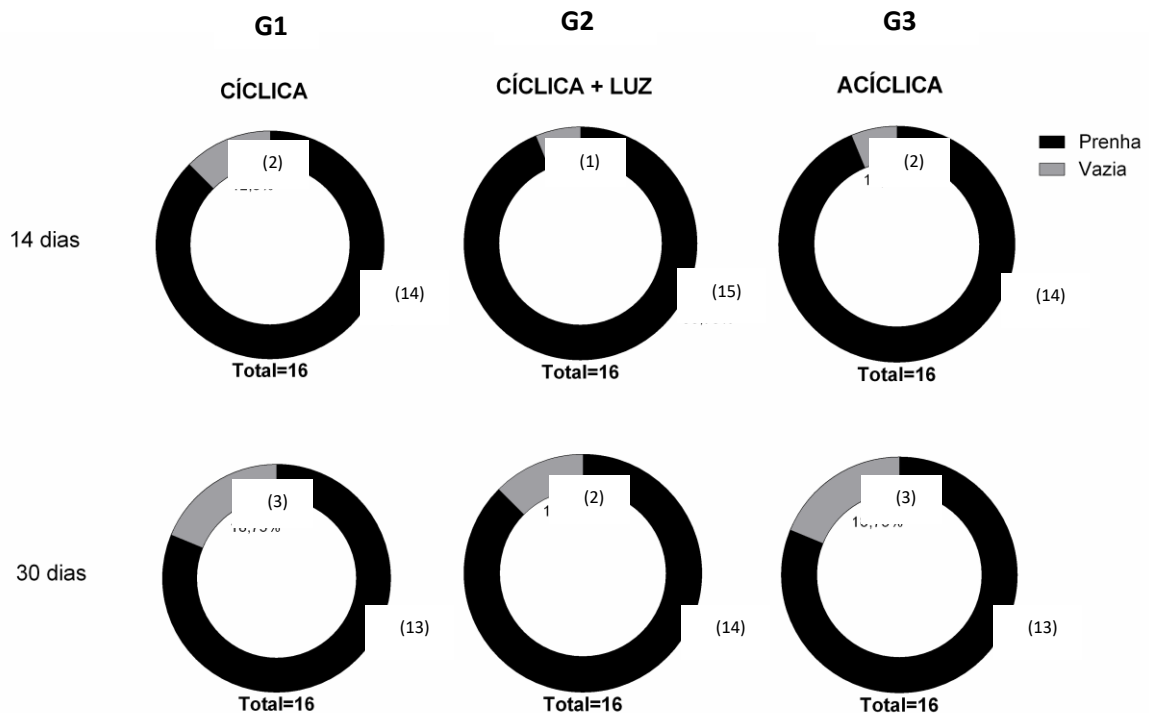


Figura 01: Resultado das taxas de prenhez para os grupos G1 (controle), G2 (Luz Artificial) e G3 (éguas acíclicas) aos 14 e 30 dias de gestação.

Na análise comparativa entre os 32 animais cíclicos, sendo G1 na fase ovulatória *versus* G2 na fase de transição de primavera, verificou-se que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre a taxa de prenhez aos 14 e 30 dias de gestação (figura 01).

Portanto, o tratamento com luz artificial (G2), mostrou-se como uma alternativa para o controle da sazonalidade reprodutiva e, ainda apresentou taxa de prenhez similar ao grupo controle (G1), na fase de transição de primavera.

Como já descrito por Nagy; Guillaume; Daels (2000), é de suma importância a existência de um período mínimo de escuridão diário, dessa forma, fica claro que a exposição maior que 16 horas de luz total por dia, não apresentaria melhora nos resultados em antecipar a ovulação na fase de transição. Outro aspecto fundamental é a utilização de luz incandescente com a intensidade de 100 lux (Guillaume et al., 2000).

Analisando os resultados obtidos entre o grupo controle G1 *versus* G3 composto por éguas acíclicas na fase de transição de primavera, verificou-se que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre a taxa de prenhez aos 14 e 30 dias de gestação. Provavelmente as taxas de prenhez obtidas no G3 estão relacionadas ao uso exógeno dos hormônios, E2 e P4, que possibilitam mudanças no útero, semelhantes às que ocorrem nas éguas cíclicas. Dessa forma, o E2 promove a formação de edema uterino similar ao estro e, posteriormente, a administração

da P4 promove aumento do tônus uterino equivalente ao observado no diestro, preparando-o para receber o embrião (Pinto, 2011).

Os resultados dos grupos G1 87,5% (14/16) e G3 87,5% (14/16) aos 14 dias de gestação corroboram com os resultados encontrados por Kaercher et al. (2013), Silva et al. (2016), Silva et al. (2017), Oliveira Neto et al. (2018), que por sua vez, também não observaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre éguas cíclicas e éguas acíclicas.

Kaercher et al. (2013) relataram que o tratamento de receptoras acíclicas com 400 mg de P4 de longa ação (BioRelease Technologies LLC, Lexington, KY) administrada semanalmente, mostrou-se eficiente em manter a gestação até os 120 dias e ainda, taxas de prenhez similares as éguas cíclicas da raça Quarto de Milha. No total, 59 receptoras foram detectadas positivas, sendo 27 acíclicas (27/ 45) e 32 cíclicas (32/ 45), com taxas de prenhez de 60% e 71,1%, respectivamente. A concentração de P4 semanal, utilizada no G3 foi duas vezes menor do que a utilizada por Kaercher et al. (2013), apresentando taxa de prenhez superior.

Com o intuito de avaliar qual protocolo produziria edema uterino e concentrações plasmáticas de estrogênio similares às aquelas observadas em éguas cíclicas, Silva et al. (2016) avaliaram três diferentes protocolos à base de BE em 21 éguas mestiças. Sendo, Grupo A: 2,5 mg BE (D-2, dose única), Grupo B: 5 mg BE (D-2, 3 mg e D-1, 2 mg) e Grupo C: 10 mg BE (D-3, 5 mg, D-2, 3 mg e D-1, 2 mg) e, igualmente para os grupos 1500 mg de Progesterona de longa ação no D0. Os autores concluíram que o uso de uma única dose de 2,5 mg de BE parece ser um protocolo mais apropriado para preparar éguas acíclicas, pois produz edema uterino e níveis de estrógeno semelhantes aos observados em éguas cíclicas.

A mesma conclusão foi observada por Silva et al. (2017), que ao utilizar uma única dose de 2,5 mg de Benzoato de Estradiol (Estrogin®, Farmavet, SP, Brasil) foi eficaz em causar concentrações semelhantes de edema endometrial, tônus uterino e estradiol no plasma às aquelas observadas durante o estro tardio e diestro precoce em éguas cíclicas.

O protocolo utilizado na central de reprodução em *Weatherford*, no G3, para o presente experimento foi de três doses de 1,5mg de BE, o que propiciou uma melhor condição uterina nas éguas acíclicas. Este resultado foi o mesmo apresentado por Oliveira Neto e colaboradores (2018), em que doses mais frequentes de BE resultam em maior expressão do receptor de progesterona no trato reprodutivo do que dose única e de baixa concentração (2,5 mg).

A comparação entre os dois grupos na fase de transição de primavera, G2 éguas cíclicas após o tratamento com luz artificial *versus* G3 éguas acíclicas, verificou-se que não há diferença significativa ($p>0,05$) entre a taxa de prenhez aos 14 e 30 dias de gestação. No entanto, o

trabalho se torna relevante ao comparar os tratamentos luz artificial e protocolo hormonal na fase de transição de primavera, período esse, considerado delicado devido à baixa oferta de éguas cíclicas. Tal qual não há registro na literatura.

A exposição ao fotoperíodo artificial seguindo rigorosamente os protocolos supracitados, é de fato a forma mais efetiva para que se consiga a primeira ovulação do ano (Guillaume et al., 2000; Nagy; Guillaume; Daels, 2000; Mccue; Logan; Magee, 2007). No período de transição de primavera, a atividade ovariana e as concentrações de LH são menores do que na fase ovulatória conseqüentemente, acarreta em baixa concentrações de hormônios endógenos (Aurich, 2011). O que torna justificável a utilização de protocolos hormonais à base de estrógeno e progesterona em períodos transicionais, obtendo índices de prenhez similares a éguas cíclicas em programas comerciais de transferência de embriões (Botelho et al., 2015; Silva et al., 2017; Oliveira Neto et al., 2018).

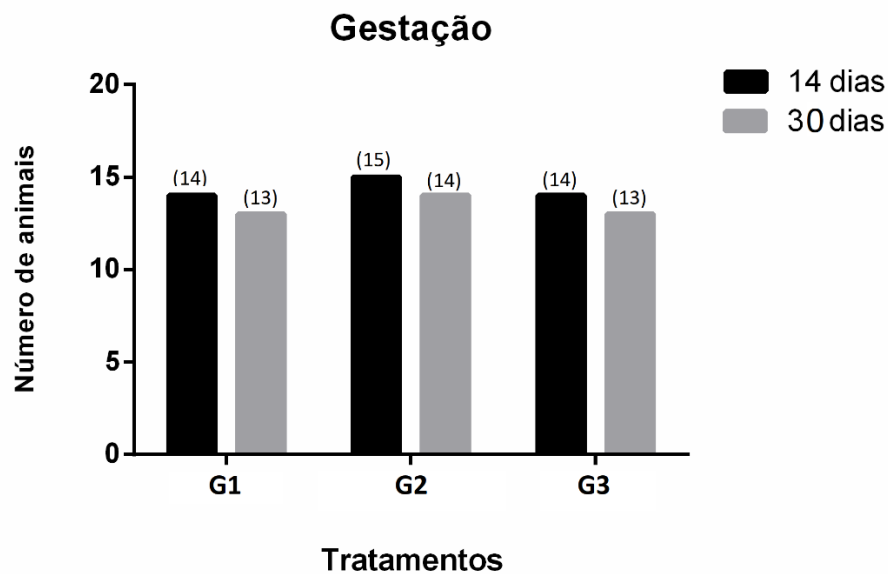


Figura 02: Resultado da porcentagem de perda embrionária para os grupos G1 (controle), G2 (Luz Artificial) e G3 (éguas acíclicas) aos 14 e 30 dias de gestação.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na perda embrionária entre os grupos G1 (87,55% - 81,25%), G2 (93,75% - 87,5%) e G3 (87,55% - 81,25%) aos 14 e 30 dias de gestação (Figura 03). Resultados semelhantes, foram observados por Botelho et al. (2015) na transição de outono, que obtiveram melhores taxas de prenhez em éguas acíclicas (76,1%, 74%) quando comparadas com éguas cíclicas (53,3%, 40%), aos 13, 30 dias de diagnóstico de gestação, respectivamente, no entanto não se diferiram entre 13 e 30 dias de gestação.

Conclusão

A utilização de éguas receptoras em anestro estacional, submetidas a tratamento com benzoato de estradiol e progesterona injetável, bem como éguas estimuladas por fotoperíodo artificial, mostraram-se eficazes para atender ao programa de transferência de embrião, no período de transição inverno-primavera, onde normalmente há uma baixa oferta de éguas receptoras cíclicas em decorrência da sazonalidade reprodutiva da espécie.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão de bolsa PROSUP/TAXA durante o programa de mestrado – Código de Financiamento 001.

Referências

- Alvarenga MA.** Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 38, p. 319-333, 2010.
- Aurich C.** Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*, v. 124, p. 220-228, 2011.
- Bergfelt DR.** Anatomy and physiology of the mare. In: SAMPER, J.C. 2 ed. *Equine breeding management and artificial insemination*. Missouri: Saunders Elsevier, p. 113-131, 2009.
- Botelho JHV, Pessoa GO, Rocha LGP, Yeste M.** Hormone supplementation protocol using estradiol benzoate and long-acting progesterone is efficient in maintaining pregnancy of anovulatory recipient mares during autumn transitional phase. *Animal Reproduction Science*, v.153, p. 39-43, 2015.
- Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwal DK, Mccue PM.** Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, v. 54, p. 965-79, 2000.
- Fleury PDC, Alonso MA, Balieiro JCC.** Avaliação da receptora: efeito de característica uterina e tempo de ovulação. In: XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Araxá. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p. 502, 2006.
- Ginther OJ.** *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*. 2. ed. Editora Cross Plains WI: Equiservices, p. 642, 1992.
- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA.** Seasonal influence on equine follicle dynamics. *Animal Reproduction*, v. 1, n. 1, p. 31-44, 2004.
- Guillaume D, Duchamp G, Nagy P, Palmer E.** Determination of minimum Light treatment required for photoestimulation of winter anoestrous mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 56, p.205-216, 2000.
- Hartman DL.** Embryo Transfer. In: **Mc Kinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD.** *Equine Reproduction*. 2 ed. Oxford:Wiley-Blackwell, v. 2, cap. 303, p. 2871-2879, 2011.

Kaercher F, Kozicki LE, Camargo CE, Weiss RR, Santos IW, Muradas PR, Bertol MAF, Abreu RA. Embryo Transfer in Anovulatory Recipient Mares Treated with Estradiol Benzoate and Long-Acting Progesterone. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 33, p. 205-209, 2013.

Langlois B, Blouin C. Effect of a horse's month of birth on its future performances. In: *Annual Meeting of The European Association for Animal Production*, v.47, 1996.

Mccue PM, Logan NL, Magee C. Management of the transition period: physiology and artificial photoperiod. *Equine Veterinary Education*. p.146-150, 2007.

Nagy P, Guillaume D, Daels P. Seasonality in mares. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 245-62, 2000.

Oliveira Neto IV, Canisso IF, Segabinazzi LG, Dell'aqua CPF, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'aqua Jr JA. Synchronization of cyclic and acyclic embryo recipient mares with donor mares. *Animal Reproduction Science* v.190, p.1-9, 2018.

Pinto CRF. Progestagens and Progesterone. In: **Mc Kinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD.** *Equine Reproduction*. 2 ed. Oxford: Wiley-Blackwell, vol. 2, cap. 189, p. 1811-1817, 2011.

Rocha Filho AN, Pessoa MA, Gioso MM, Alvarenga MA. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. *Animal Reproduction*, v. 1, n. 1, p. 91-95, 2004.

Silva ESM, Ignácio FS, Fritsch SC, Zanoni DS, Pantoja JCF, Oliveira-Filho JP, Meira C. Administration of 2.5 mg of estradiol followed by 1,500 mg of progesterone to anovulatory mares promote similar uterine morphology, hormone concentrations and molecular dynamics to those observed in cyclic mares. *Theriogenology*, v. 97, p. 159-169, 2017.

Silva ESM, Roser JF, Gomes ARC, Fritsch SC, Pantoja JCF, Oliveira Filho JP, Meira C. Comparison of different regimens of estradiol benzoate treatments followed by long-acting progesterone to prepare noncycling mares as embryo recipients. *Theriogenology*, p. 1-8, 2016.

Revista Brasileira de Reprodução Animal – Instruções para autores

1. PREPARAÇÃO DO TRABALHO PARA SUBMISSÃO

Texto e formato dos arquivos: o artigo deve ser digitado em folha A4 (21.0 x 29.7) com 3 cm de margem, fonte *Times New Roman* 12, espaço entrelinhas duplo, com linhas numeradas consecutivamente e paginadas sequencialmente. O arquivo eletrônico deverá ser compatível com *Word for Windows*.

Tamanho do artigo: O artigo submetido, incluindo as ilustrações e as referências, deverá apresentar no máximo 15 páginas (artigo de revisão), 15 páginas (artigo científico), 05 páginas (relato de caso) e 05 páginas (comunicação).

Seções de um manuscrito científico

Artigo científico: Título; Título em inglês; Autor (es); Afiliação(ões); Resumo; Palavras-chave; *Abstract*; *Keywords*; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão (ou Resultados e Discussão); Conclusões; Agradecimentos; Referências; Ilustrações. O artigo científico deve conter no máximo 30 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados. (ver detalhes abaixo).

Artigo de revisão: Título; Título em inglês; Autor(es); Afiliação(ões); Resumo; Palavras-chave; *Abstract*; *Keywords*; Introdução; Desenvolvimento do assunto (organizado em partes com títulos próprios e, eventualmente, subtítulos); Considerações finais; Agradecimentos; Referências; Ilustrações. As referências devem conter no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Comunicação : Mesma estrutura do artigo científico, de forma sucinta, mas sem subtítulos. A comunicação deve conter no máximo 10 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Relato de caso: Título; Título em inglês; Autor(es); Afiliação(ões); Resumo; Palavras-chave; *Abstract*; *Keywords*; Introdução; Metodologia diagnóstica utilizada; Resultados e Considerações finais; Referências, Ilustrações. O relato de caso deve conter no máximo 10 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Descrição das seções de um artigo científico (os demais tipos de manuscritos devem se adaptar ao modelo):

- **Título:** O título deve ser sucinto, mas representativo do conteúdo do artigo. Apenas a primeira palavra do título com a inicial em maiúscula (exceção para nomes próprios). A citação de suporte financeiro deverá ser colocada junto dos agradecimentos, antes da lista de referências.
- **Título em inglês:** Logo abaixo do título em português, versão em inglês do título em português.
- **Autor(es):** Os nomes dos autores virão abaixo dos títulos em português e inglês, na ordem direta, prenomes e nomes intermediários representados pela inicial seguida de ponto, seguidos dos sobrenomes paternos por extenso. A afiliação de cada autor deverá ser indicada por algarismos arábicos sobrescritos no final do sobrenome.
- **Afiliação(ões):** Deve ser citada somente a instituição principal e um segundo nível de filiação, quando da execução do trabalho submetido, seguida da cidade, estado e país. Não citar título, cargo e função. O autor para correspondência deve ser indicado com endereço completo, telefone, fax e e-mail.
- **Resumo:** Narrativa sucinta dos objetivos, material e métodos (quando pertinente), principais resultados e conclusões, limitado a 200 palavras (1374 caracteres com espaço) em um só parágrafo.
- **Palavras-chave:** Palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo, não ultrapassando o limite de cinco.
- **Abstract:** Versão em inglês do Resumo.
- **Keywords:** Versão em inglês das Palavras-chave.
- **Introdução:** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.
- **Material e Métodos:** Devem ser citados o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. É recomendado o uso restrito de subtítulos. Nos artigos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados, deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.
- **Resultados:** Devem ser apresentados clara e objetivamente os principais resultados encontrados.
- **Discussão:** Devem ser discutidos somente os resultados obtidos no trabalho.

- **Conclusões:** As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.
- **Agradecimentos:** Devem ser concisamente expressados.
- **Referências:** Referenciar somente artigos citados e publicados. As referências devem ser listadas em ordem alfabética do(s) sobrenome(s) do(s) autor(es) e a seguir do título.
- **Ilustrações:** Compreende as tabelas e as figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data), e a correspondente referência deve figurar na lista final. **Recomendações:** 1) Ilustrações idênticas ao original: os autores devem encaminhar à RBRA a autorização do autor ou detentor dos direitos autorais para reprodução. No artigo, além da identificação da fonte, os autores devem mencionar a autorização nos agradecimentos; 2) Ilustrações adaptadas ou modificadas: os autores devem identificar a fonte, acrescentando a informação "adaptado de ...".
- **Tabela:** Conjunto de dados alfanuméricos organizados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais apenas na separação do cabeçalho e ao final da tabela. A separação de grupos de dados no corpo da tabela deverá ser feita inserindo-se uma linha em branco. A legenda, colocada acima da tabela, recebendo inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico, e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura: Refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda deverá ser colocada abaixo da ilustração, recebendo inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico, e é referida no texto como Fig., mesmo quando se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.tif, com alta resolução.

2. NORMAS PARA CITAÇÃO NO TEXTO E REDAÇÃO DE REFERÊNCIAS

Citação de referência no texto

A citação no texto será feita segundo as circunstâncias, podendo o(s) autor(es) e as data(s) ser(em) citado(os) entre parênteses, ou somente a data. No caso de citação de diversos autores, listar cronologicamente e, havendo coincidência de data, usar a ordem alfabética de autor. Exemplo: Dunne (1967), Morrill (1967), Nutrient... (1968), Lopes e Moreno (1974)

Ferguson et al. (1979), **OU** (Dunne, 1967; Morril, 1967; Nutrient..., 1968; Lopes e Moreno, 1974; Ferguson et al., 1979).

Referências

São adotadas as normas da ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos abaixo. Para documentos não exemplificados usar a norma original (www.abnt.org.br).

Periódicos

Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, v.48, 1987/88. p.351.

Ferguson JA, Reeves WC, Hardy JL . Studies on Immunity to alphaviruses in foals. *Am J Vet Res*, v.40, p.5-10, 1979.

Holenweger JA, Tagle R, Wasserman A, Schim FA, Franckel S . Anestesia geral del canino. *Not Med Vet* , n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

Dunne HW lang=EN-US (Ed.). lang=ES-TRAD *Enfermedades del cerdo* lang=ES-TRAD . México: UTEHA, 1967.

Lopes CAM, Moreno G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 14, 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: CBMV, 1974. p.97. Resumo.

Morril CC. Infecciones por clostrídios. In: Dunne HW (Ed.). lang=ES-TRAD *Enfermedades del cerdo* lang=ES-TRAD . México: UTEHA, 1967. lang=ES-TRAD p.400-415.

Nutrient requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. p.19-20.

Silva NQ. *Peritoniaoscopia na égua*. 1971. 38f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1971.

Documentos eletrônicos

Documento publicado disponibilizado em meio eletrônico

Arranjo tributário. *Diário do Nordeste On Line*, Fortaleza, 27. nov. 1998. Disponível em <http://www.diariodonordeste.com.br>. Acesso em 28 nov. 1998.

Guncho MR. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: Seminário de Bibliotecas Universitárias, 10, 1998, Fortaleza. *Anais ...* Fortaleza: Tec Treina, 1998. CD-ROM.

Política . In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática, 1998. Disponível em <http://www.priberam.pt/didplo>. Acesso em 8 mar. 1999.

Quality food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acesso em: 27 abr. 2000.

Silva RN, Oliveira R. Os limites pedagógicos do paradigma style='letter-spacing:.2pt'>da qualidade total na educação. In: Congresso de Iniciação Científica da UFPe, 4, 1996, Recife. Anais eletrônicos ... Recife: UFPe, 1996. Disponível em: <<http://www.prospeq.ufpe.br/anais/anais/educ/ce04.htm>>. Acesso em: 21 jan. 1997.

Documento de acesso exclusivo em meio eletrônico

Birds from Amapá; banco de dados. Disponível em: <<http://www.bdt.org/bdt/avifauna/aves>>. Acesso em: 25 nov. 1998.

Bioline Discussion List. List maintained by the Bases de Dados Tropical, BDT, in Brasil. Disponível em: <lisserv@bdt.org.br>. Acesso em: 25 nov. 1998.

Civitas . Coordenação de Simão Pedro Marinho. Desenvolvido pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 1995-1998. Apresenta textos sobre urbanismo e desenvolvimento de cidades. Disponível em: <gcsnet.com.br/oamis/civitas>. Acesso em 27 nov. 1998.

Citação de citação

Devem ser evitadas. Somente a obra consultada no original deverá aparecer na lista de referências. No texto, serão citados o autor e a data do documento original, seguido da expressão "citado por" e do autor e data da obra consultada.

Artigos no prelo

Incluir na lista de referências apenas os artigos já aceitos para publicação. Após a referência, colocar a informação "No prelo". Os artigos apenas submetidos entram na categoria "Informação pessoal".

Informação pessoal

Os dados obtidos por informação oral (palestras, debates, artigos submetidos e em fase de análise, comunicação pessoal etc.) são identificados apenas no texto. Após a informação, coloca-se o autor, a data, instituição do autor e a expressão "Informação pessoal".