



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SOFIA BOTSARIS DELCHIARO

**RELAÇÃO DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIIS COM AS
CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE ÉGUAS RECEPTORAS
DE EMBRIÃO**

Londrina - PR
2022

SOFIA BOTSARIS DELCHIARO

**RELAÇÃO DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIIS SOBRE
CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE ÉGUAS RECEPTORAS
DE EMBRIÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Londrina - PR
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Delchiaro, Sofia.

RELAÇÃO DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIIS COM AS CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE ÉGUAS RECEPTORAS DE EMBRIÃO / Sofia Delchiaro. - Londrina, 2022.
46 f. : il.

Orientador: Marcelo Seneda.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Equinos - Tese. 2. Contagem de folículos antrais - Tese. 3. Transferência de embriões - Tese. 4. Receptora de embrião - Tese. I. Seneda, Marcelo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

SOFIA BOTSARIS DELCHIARO

**INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS SOBRE
CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE ÉGUAS RECEPTORAS
DE EMBRIÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros
Universidade Estadual do Norte do Paraná

Prof. Dra. Roberta Garbelini Gomes
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 25 de Fevereiro de 2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Kriçula e Marcelo, pelo apoio incondicional, incentivo, amor, sabedoria e educação que me proporcionaram até hoje para que eu me desenvolvesse e realizasse meus sonhos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que permitiu que eu pudesse concluir mais essa etapa da minha vida, que me deu calma e confiança e aumentou minha fé cada dia mais durante toda essa caminhada. Muito obrigada por tudo que tenho e que alcancei até agora!

Ao meu professor e orientador Dr. Marcelo Marcondes Seneda por toda paciência e oportunidades durante esse período no Laboratório de Biotecnologias da Reprodução Animal (ReproA). O senhor foi fundamental tanto para o meu crescimento profissional quanto pessoal. Com toda certeza um dos maiores exemplos de vida que tenho

Ao meu professor e coorientador Dr. Fábio Morotti, que me deu todo apoio que precisei, não mediu esforços para me ajudar em todos os momentos e me proporcionou tanto conhecimento. A você professor, todo meu respeito e admiração pela pessoa e profissional que é, certamente tenho o senhor como um grande exemplo.

Aos professores membros da banca, Prof. Dr. Thales Rigo e Profa. Dra. Roberta Gomes, por terem aceito o convite e por toda paciência e ajuda para a defesa, minha gratidão por tudo!

A todos os pós-graduandos do ReproA que tanto me ajudaram e por todo conhecimento passado.

Ao Rubens José Paulossi Júnior, agrônomo e gerente da HS Agropecuária e amigo, sem você nada disso seria possível! Obrigada a você e toda minha equipe da HS Agropecuária por todo empenho com os animais e a fazenda!

A toda minha família, tios e tias, primos e primas, minhas avós Divina e Nora, e Marinês por todo amor que sempre me deram e por continuarem cuidando de mim.

Aos meus pais Marcelo e Kriçula, que fizeram de mim a pessoa que sou hoje, me ensinaram a ser uma pessoa decente e com princípios, que sempre me ampararam, permitiram que eu fizesse o que me faz feliz e deram todo o amor do mundo para mim. Que me incentivaram e apoiaram nas minhas escolhas e me mostraram o caminho certo quando tive dúvidas, certamente vocês são as pessoas mais importantes da minha vida e meus exemplos. Todas as vezes que achei que eu não fosse capaz vocês me deram forças e segurança de que eu nunca estarei sozinha! Eu tenho orgulho de dizer que sou filha de vocês e amo vocês, pai e mãe, eternamente!

Ao meu irmão, Hiago, por todo companheirismo e conselhos sempre. Por compartilhar todos os momentos mais felizes em família que temos. Tenho orgulho de você e do médico que você será!

Agradeço também ao Centro de Reprodução de Equídeos CMG UniFil pela ajuda na coleta de dados e disponibilização dos animais. Em especial ao M.V. Geidson Cassiano e ao residente M.V. Nasser André pelo tempo, dedicação e ajuda para que esse trabalho pudesse ser concluído! Meus sinceros agradecimentos a equipe!

Finalmente, agradeço ao Msc. M. V. Pedro Victor Oliveira, você que me aconselhou e me fez seguir o caminho certo, que tanto me ensina da profissão. Agradeço pela disposição e tempo dedicado a me ajudar na reta final desse mestrado. Parabéns pela tamanha dedicação ao seu trabalho.

Muito obrigada!

DELCHIARO, Sofia Botsaris. **Influência da contagem de folículos antrais sobre características reprodutivas de éguas receptoras de embrião.** 2022. 47 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar a estimativa da contagem de folículos antrais (CFA) em éguas receptoras de embrião através da ultrassonografia transretal e relacionar a CFA com a fertilidade. Um grupo de fêmeas equinas ($n=77$) de diferentes idades (entre 5 e 16 anos) e raças (sem raça definida) foi avaliado para CFA. O grupo de baixa foi definido com $CFA \leq 11$ folículos ($n=43$ éguas) e alta > 11 folículos ($N = 34$ éguas). O protocolo hormonal das receptoras dependeu da fase do ciclo estral em que elas se encontravam. Receptoras cíclicas foram sincronizadas juntamente com as doadoras e receberam o embrião entre os dias 4 e 6 (D4 – D6). As receptoras acíclicas receberam 5 mg de benzoato de estradiol (BE) via intramuscular (IM) no dia da ovulação da doadora (D0), 4 mg de BE via IM no dia seguinte (D-3 receptora; D1 doadora) e 3 mg de BE via IM (D-2 receptora; D2 doadora). Ademais, mais 1500 ml de progesterona (P4) via IM foram aplicados no D0 da receptora (D4 da doadora) e mais 1500 ml de P4 via IM aplicados no dia da TE (D4-6). No dia da transferência de embrião (TE) foram aferidos, além da CFA, o peso do animal, escore de condição corporal (ECC), diâmetro do corpo lúteo (CL), idade e grau de edema uterino, para estabelecer a relação desses parâmetros com a CFA. Ademais, foram considerados a ciclicidade da receptora e estação do ano da TE. No D12 foi feito o diagnóstico de gestação da receptora por meio da ultrassonografia transretal em modo B. Os dados foram analisados quanto à normalidade de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade de variâncias pelo teste F. Diferenças entre os grupos estudados foram analisadas por ANOVA empregando modelo de efeito misto, em que o grupo CFA, a estacionalidade reprodutiva e a estação do ano foram consideradas efeitos fixos. Foi adotado um nível de significância quando $P \leq 0,05$. A taxa de concepção foi maior em receptoras com baixa CFA em relação àquelas com alta CFA ($P = 0,016$). Não houve influência da estação do ano ($P = 0,798$), mas foi observado efeito de sazonalidade reprodutiva ($P = 0,005$; cíclica 81,40% vs. anestro estacional 58,82%), além de uma tendência ($P = 0,06$) a interação entre CFA e sazonalidade reprodutiva. A taxa de concepção foi maior em receptoras de baixa CFA e nas que eram cíclicas, demonstrando um efeito da sazonalidade reprodutiva. Contudo, não foi identificada interação entre a CFA e a ciclicidade. Ainda, o edema uterino também foi influenciado pela sazonalidade reprodutiva, éguas em anestro demonstraram um maior grau de edema uterino quando comparadas com as cíclicas.

Palavras-chave: Contagem de folículos antrais; transferência de embrião; receptora de embrião; equinos; corpo lúteo.

DELCHIARO, Sofia Botsaris. 2022. **Influence of antral follicle count on reproductive characteristics of embryo recipient mares.** 47 fls. Dissertation (Master's in animal science) – State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

The objective of this work was to estimate the antral follicle count (AFC) in embryo-receiving mares through transrectal ultrasound and to relate AFC to fertility. A group of equine females (n=77) of different ages (between 5 and 16 years) and breeds (undefined) were evaluated for AFC. The low group was defined with $AFC \leq 11$ follicles (n=43 mares) and high > 11 follicles (N=34 mares). The hormonal protocol of the recipients depended on the phase of the estrous cycle in which they were. Cyclic recipients were synchronized with the donors and received the embryo between days 4 and 6 (D4 – D6). Acyclic recipients received 5 mg of estradiol benzoate (EB) intramuscularly (IM) on the day of donor ovulation (D0), 4 mg of BE via IM the following day (D-3 recipient; D1 donor) and 3 mg of BE via IM (D-2 recipient; D2 donor). Furthermore, another 1500 ml of progesterone (P4) via IM were applied on D0 of the recipient (D4 of the donor) and another 1500 ml of P4 via IM applied on the day of ET (D4-6). On the day of embryo transfer (ET), in addition to AFC, the animal's weight, body condition score (ECC), corpus luteum (CL) diameter, age and degree of uterine edema were measured to establish the relationship between these parameters with the AFC. Furthermore, the cyclicity of the recipient and the season of the year of the ET were considered. On D12, the recipient's pregnancy diagnosis was made through B-mode transrectal ultrasound. Data were analyzed for normality of distribution by the Shapiro-Wilk test and for homogeneity of variances by the F test. Differences between the groups studied were analyzed by ANOVA using a mixed effect model, in which the AFC group, the reproductive seasonality and the season of the year were considered fixed effects. A significance level was adopted when $P \leq 0.05$. The conception rate was higher in recipient mares with low AFC compared to those with high CFA ($P = 0.016$). There was no influence of season ($P = 0.798$), but there was an effect of reproductive seasonality ($P = 0.005$; cyclic 81.40% vs. seasonal anestrus 58.82%), in addition to a tendency ($P = 0.06$) to interaction between AFC and reproductive seasonality. The conception rate was higher in recipients with low AFC and in those that were cyclic, demonstrating an effect of reproductive seasonality. However, no interaction between AFC and cyclicity was identified. Also, uterine edema was influenced by reproductive seasonality, mares in anestrus showed a greater degree of uterine edema when compared to cyclic mares.

Key words: Antral follicle count; embryo transfer; embryo recipient; equine; corpus luteum.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 – Esquema da formação da linhagem germinativa.....14

Figura 2 –Folículos ovarianos (pré-antrais e antrais) durante o processo de foliculogênese.15

Artigo

Figura 1 – Protocolo de sincronização hormonal de éguas doadoras de embrião.....36

Figura 2 – Protocolo de sincronização hormonal das receptoras de embrião cíclicas e acíclicas.....36

Figura 3 – Efeito da interação entre contagem de folículos antrais (CFA; baixa e alta) e a estacionalidade reprodutiva (cíclicas e anestro) sobre a taxa de concepção de receptoras de embrião equina.....39

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1 - Parâmetros reprodutivos de receptoras de embrião equina classificadas em alta (> 11 folículos) e baixa (\leq 11 folículos) contagem de folículos antrais (CFA) durante o programa de transferência de embrião.....	37
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	- <i>anti-Müllerian hormone</i> - hormônio antimuleriano
ANOVA	- análise de variância
BE	- benzoato de estradiol
CFA	- contagem de folículos antrais
CL	- corpo lúteo
ECC	- escore de condição corporal
FD	- folículo dominante
FSH	- <i>follicle stimulating hormone</i> ; hormônio folículo estimulante
hCG	- gonadotrofina coriônica humana
IA	- inseminação artificial
IM	- intramuscular
LH	- <i>Luteinizing hormone</i> ; hormônio luteinizante
M	- média
ml	- mililitro
Mg	- miligrama
P4	- progesterona
PGF2- α	- prostaglandina F2 α
SE	- <i>standard error</i> ; erro padrão
TDF	- <i>testis determining factor</i> ; fator determinante testicular
TE	- transferência de embrião
UI	- unidade internacional
μ g	- micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Oogênese e Folículogênese	13
2.2	Fisiologia da reprodução em éguas	15
2.3	Inseminação artificial e transferência de embriões em equinos.....	16
2.4	Influência da Contagem de Folículos Antrais (CFA) sobre aspectos reprodutivos	17
2.5	Influência da idade na taxa de prenhez	19
2.6	Corpo Lúteo e taxa de prenhez	19
2.7	Grau de edema uterino e taxa de confirmação da prenhez	20
2.8	Dia da transferência de embrião e taxa de confirmação do embrião na receptora	20
2.9	Época do ano e taxa de confirmação do embrião.....	21
	REFERÊNCIAS	22
3	HIPÓTESE	29
4	OBJETIVOS	30
4.1	Objetivo geral.....	30
4.2	Objetivos específicos.....	30
5	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	31
	INTRODUÇÃO	32
	MATERIAL E MÉTODOS	33
	<i>Animais</i>	33
	<i>Realização da contagem de folículos antrais por meio da ultrassonografia trans-</i> <i>retal</i>	33
	<i>Avaliação ultrassonográfica do útero e Corpo Lúteo</i>	34
	<i>Inseminação artificial e colheita de embriões</i>	34
	<i>Protocolo de transferência de embrião para as receptoras</i>	35

	<i>Análise Estatística</i>	37
	RESULTADOS	37
	DISCUSSÃO	39
	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45

1. INTRODUÇÃO

A indústria equestre brasileira representa uma das principais influenciadoras na economia do país, movimentando em torno de R\$ 16,5 bilhões ao ano. Com 5,9 milhões de animais no rebanho nacional, o Brasil tem hoje o terceiro maior rebanho de equinos do mundo, perdendo apenas para China e México (SANTOS et al., 2018). Responsáveis pelo desenvolvimento dos principais ciclos econômicos do país, as atividades que envolvem os equinos geram cerca de 3 milhões de empregos, o que significa 6 vezes mais postos de trabalho do que a indústria automobilística. (LIMA et al., 2006; LIMA e SINTRA, 2016).

O notório aumento do rebanho de equinos no Brasil se deve principalmente à crescente procura de animais voltados para atividades esportivas. Uma das maiores vertentes que envolvem o cavalo no país são as competições equestres. No entanto, as funções tradicionais dos equinos como o trabalho no campo e transporte de cargas, também continuam tendo papel importante na utilização do cavalo, assim como atividades voltadas para o lazer e reabilitação de portadores de necessidades especiais, a chamada equoterapia (VIEIRA, 2011; LIMA e SINTRA, 2016).

Neste contexto, juntamente com a evolução da indústria esportiva voltada para os equinos, surgiu uma maior demanda pela melhoria genética desses animais e com isso, as pesquisas científicas voltadas para eficiência reprodutiva da espécie se intensificaram (CUERVO-ARANGO et al., 2020; GONÇALVES et al., 2020). As fêmeas equinas apresentam menor eficiência reprodutiva quando comparada com fêmeas bovinas, provavelmente devido à utilização de éguas mais velhas que possuem alto valor comercial na reprodução (TEZZA, 2006; ALVARENGA e TONGU, 2017).

Estudos voltados para a eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas têm abordado a contagem de folículos antrais (CFA), que demonstra o estoque folicular ovariano, como uma potencial ferramenta de seleção da fêmea bovina por apresentar relação com diversos aspectos relacionados à fertilidade (MOROTTI, 2016; 2017). Muito ainda precisa ser estudado sobre a CFA, contudo sabe-se que a variação na CFA durante ondas foliculares está associada positivamente com concentrações circulantes de hormônio anti-mülleriano (AMH), tamanho do ovário, bem como ao número total de oócitos morfologicamente saudáveis (IRELAND et al., 2008). Ademais, a CFA é uma característica ovariana marcante na espécie bovina, sendo altamente variável entre as fêmeas, mas de alta repetibilidade num mesmo indivíduo (BURNS et al., 2005).

Além disso, sabe-se que folículos préovulatórios maiores e mais vascularizados produzem um corpo lúteo (CL) maior e conseqüentemente, mais funcional. Esse CL é capaz de produzir maiores concentrações sistêmicas de progesterona (P4), o que pode levar a um ambiente uterino mais aprimorado e melhor adaptado para o estabelecimento da prenhez em éguas (ISHAK et al., 2017).

Dentre as biotécnicas reprodutivas aplicadas em equinos, a transferência de embriões é uma atividade altamente lucrativa. Tal estratégia consiste em realizar a coleta de embriões de alto potencial genético de um animal doador e transferi-lo para uma égua receptora. Assim sendo, a viabilidade de um programa comercial de transferência de embriões depende muito da manutenção e do manejo de éguas receptoras, representando o componente mais caro de um programa. Em programas de sucesso as receptoras alcançam altas taxas de prenhez após a transferência de embriões (MCCUE E SQUIRES, 2015). Desse modo, a sincronização de receptoras de embriões com éguas doadoras é um dos fatores limitantes para a obtenção de boas taxas gestacionais (MCCUE e SQUIRES, 2015; OLIVEIRA NETO et al., 2018). Embora, um grande número de embriões equinos seja produzido e transferido em todo o mundo, a literatura é particularmente escassa sobre fatores que influenciam na fertilidade dessas receptoras.

Considerando o vasto campo de estudo sobre a CFA na espécie bovina e os resultados promissores que relacionam a CFA com a fertilidade, faz-se necessário pesquisas científicas que explorem a relação da CFA com aspectos reprodutivos de éguas, principalmente receptoras de embrião, uma vez que a CFA tem demonstrado ser uma variável influente no potencial reprodutivo das fêmeas e possuir relação com diversos aspectos relacionados a fertilidade, como aos ovários, taxas de prenhez no final da estação reprodutiva, responsividade ao tratamento superovulatório, potencial para produção de embriões, concentrações circulantes de progesterona e AMH e espessura endometrial (IRELAND, 2007;2008; MOROTTI et al., 2018).

Fatores como a concentração de AMH circulante, nutrição e escore de condição corporal (ECC) de éguas já foram descritos por possuírem relação direta com a fertilidade (MORLEY e MURRAY, 2015; CLAES et al., 2015). A relação da CFA e do AMH em equinos já foi estudada por Claes et al. (2015), apontando que há uma correlação positiva entre o respectivo hormônio e a CFA, além dessa correlação variar de acordo com a idade do animal. Além disso, o mesmo trabalho demonstrou que a CFA foi significativamente menor em éguas mais velhas, mostrando que a idade também é uma variante importante quando estudamos a CFA.

Adicionalmente, estudar a relação do ECC das fêmeas equinas e a CFA é de grande importância para elucidar a influência da nutrição no ciclo estral e no crescimento folicular de éguas (MORLEY e MURRAY, 2014). Ademais, a mensuração do diâmetro do CL tem extrema

importância para que possa ser estudada a relação que a funcionalidade do CL em éguas tem com o estabelecimento e manutenção da prenhez em receptoras de embrião.

Em suma, o presente estudo busca o melhor entendimento com relação a CFA e sua influência na fertilidade de fêmeas equinas receptoras de embriões estudando diversas variáveis como idade, ECC, peso, diâmetro de CL e grau de edema uterino, sazonalidade e ciclicidade. Além disso, em sabendo que a espécie equina possui um índice de fertilidade relativamente inferior às outras espécies como os bovinos, os estudos sobre a fisiologia reprodutiva se mostram importantes para maior conhecimento e, assim, aprimorar o desempenho reprodutivo destes animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Oogênese e Folículogênese

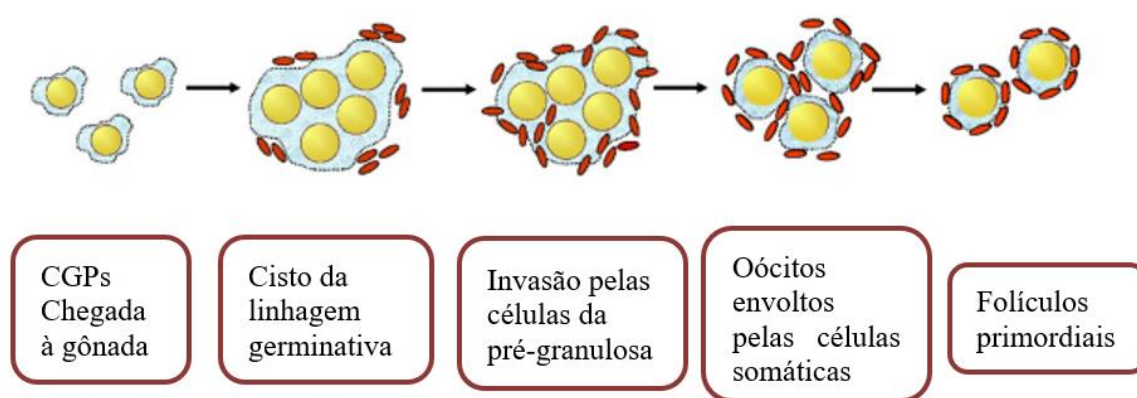
A origem do sistema reprodutor feminino se dá ainda na vida embrionária na região sublombar localizada caudalmente aos rins. As células germinativas primordiais, que darão origem à formação da linhagem germinativa, originam-se no epiblasto proximal e depois se direcionam do saco vitelínico para as cristas gonadais através do mesentério, perto do dia 30 do desenvolvimento germinativo (GARCIA e FERNÁNDEZ, 2012). Nesse momento ainda estão presentes os ductos de Müller e Wolff que darão origem ao trato reprodutivo da fêmea e do macho, respectivamente.

Após a colonização das cristas, em torno de 35 dias de gestação, inicia-se o processo de diferenciação através da especificação das células somáticas da crista, onde as células de Sertoli originarão o cromossomo XY e as células da granulosa originarão o cromossomo XX. Nas fêmeas, há involução do ducto de Wolff (ou mesonefro) e desenvolvimento do ducto de Müller (ou paramesonefro). Já nos machos, como herdam do cromossomo Y o fator determinante de testículo (TDF), as células de Sertoli liberam o hormônio anti-mülleriano (AMH) e inibem o desenvolvimento dos ductos de Müller (SILVA-SANTOS et al., 2016; LANDIM-ALVARENGA, 2017). Após esse processo, são formadas as oogônias que através de divisões mitóticas e meióticas formam um ninho de oogônias em formato tubular, e então, inicia-se um processo de diferenciação em oócitos (SENEDA e SILVA, 2009).

Estruturas gonadais chamadas de cistos da linhagem germinativa são criadas nos cordões ovígeros e circundadas por uma membrana basal logo em seguida da colonização das cristas gonadais pelas células germinativas primordiais, processo esquematizado na Figura 1

(BRISTOL-GOULD et al., 2006). As divisões meióticas são iniciadas, até que o processo é interrompido na prófase I da meiose, quando já estão formados os oócitos primários. Os oócitos primários, também ilustrados na Figura 1, são envoltos por uma camada de células indiferenciadas da pré-granulosa (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). A interrupção da meiose pode durar anos, até que um determinado folículo entre em processo de crescimento retomando a meiose e dando continuidade ao desenvolvimento folicular através do folículo primordial até seu estágio final em folículo antral (EPPIG et al., 1992).

Figura 1. Esquema de formação da linhagem germinativa.



CGPs - células germinativas primordiais.

Fonte: Adaptado de Bristol-Gould et al. (2006).

O crescimento folicular é marcado por uma série de modificações celulares do oócito, das células foliculares e da teca (RAJKOVIC et al., 2006). É iniciada na vida pré-natal e caracteriza-se pela formação, crescimento e maturação folicular. Este evento origina-se com a formação do folículo primordial e culmina com o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório (SAUMANDE, 1981; MOORE e PERSAUD, 1994). Sendo assim, a foliculogênese começa depois do início e termina antes do fim da oogênese (FIGUEIREDO et al., 2008).

Folículos primordiais que se encontram estacionados na prófase I da meiose iniciam seu desenvolvimento até se tornarem folículos primários e, depois, secundários caracterizando a fase pré-antral. Por fim, os folículos atingem seu estágio final chamado de terciário, caracterizando a fase antral (FIGUEIREDO et al., 1995).

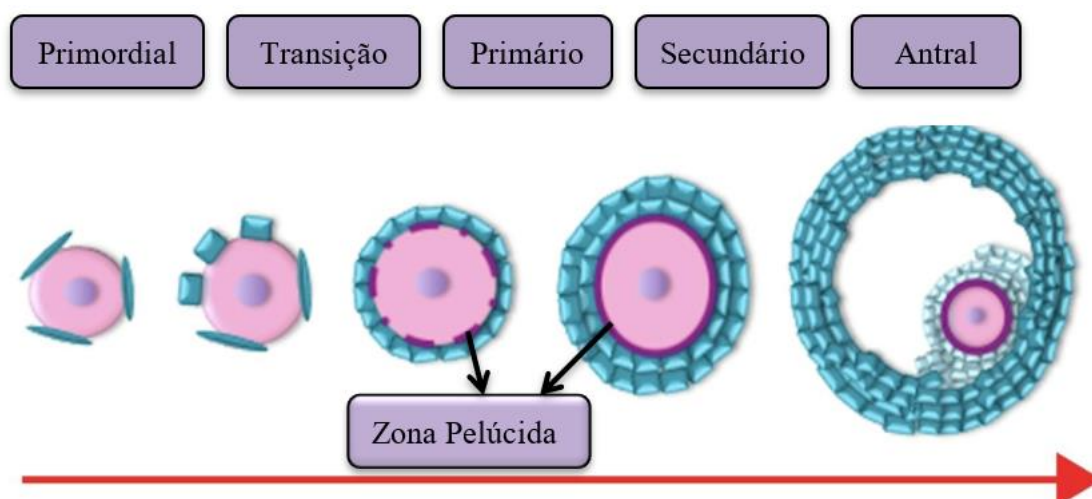
Uma vez recrutado o folículo primordial, cujas células da granulosa são achatadas, ele passa a ser folículo primário, onde ocorre uma transição dessas células achatadas para o formato cuboide. A Figura 2 mostra que nessa fase há surgimento da zona pelúcida que permanecerá ao

redor do oócito por todo desenvolvimento do folículo. Continuando a crescer, o folículo secundário é constituído quando as células da granulosa se multiplicam e formam duas camadas de morfologia cúbica, além do surgimento das primeiras células da teca (VAN DEN HURK et al., 2000). Na Figura 2 também é possível observar essa expansão das células da granulosa no folículo caracterizado como secundário.

O crescimento desses folículos secundários (quando atingem aproximadamente 6 mm é regulado pelo hormônio folículo estimulante (FSH), que possui seus receptores nas células da granulosa e quando estes atingem um tamanho maior (aproximadamente de 13 mm de diâmetro) passam a ser controlados pelo hormônio luteinizante (LH). Nesse estágio o folículo já é caracterizado como terciário e possui receptores de LH nas células da teca que já estão completamente organizadas, podendo ser observado a formação do antro folicular (GURGEL et al., 2008; Figura 2).

Em equinos, a divergência folicular se dá quando o folículo dominante está em torno de 22mm, nesse momento o folículo dominante começa a secretar inibina e gradativamente diminui sua dependência de FSH. A partir daí o desenvolvimento desse folículo dominante passa a ser mais dependente de LH, quando atinge a fase de folículo pré-ovulatório em torno de 33 a 35mm (SOUZA et al., 2011).

Figura 2 - Folículos ovarianos (pré-antrais e antrais) durante o processo de foliculogênese.



Fonte: Adaptada de Lima et al. (2015)

2.2 Fisiologia da reprodução em éguas

As éguas são consideradas poliéstricas estacionais, pois sua atividade reprodutiva é estimulada principalmente pela luminosidade. Dessa forma, é na primavera em que ocorre o aumento da duração do dia (ou seja, aumento do fotoperíodo) e quando as éguas ciclam. Por outro lado, a diminuição do fotoperíodo ocorre no final do verão e início do outono, estimulando o término da estação reprodutiva das éguas (SÁ, 2017). Assim, a atividade reprodutiva das éguas é sazonal, se estendendo do início da primavera até o final do verão, ou seja, de outubro a março no hemisfério sul (FLORES e MOYA, 2020).

A atividade folicular na égua durante o inverno é mínima e a ovulação é ausente. A primavera e o outono (agosto a outubro) são marcados por períodos de transição, caracterizados pela irregularidade dos ciclos estrais tanto em relação à duração quanto ao momento em que ocorre a ovulação (KAMADA et al., 2013).

Durante a estação reprodutiva, as éguas apresentam uma ovulação, em média, a cada 21 dias. Neste intervalo médio de uma ovulação e outra, são observados duas fases predominantes nas éguas, o estro (cio) e diestro. O estro dura em torno de 7 dias e a ovulação ocorre nas últimas 24-48 horas. Durante a primavera e o outono, ele é mais longo (7 a 10 dias) do que no meio do verão (4 a 5 dias) (SÁ, 2017).

O período de estro é caracterizado por uma atividade folicular intensa com alta produção de estrógeno pelas células da granulosa. Essa elevada concentração estrogênica é responsável pelos sinais de cio característicos da espécie: passividade à presença do macho, elevação da cauda, contração (ou inversão) do clitóris, micção e aceitação da monta. A partir do momento que a fêmea apresenta os sinais característicos do estro, deve-se fazer o acompanhamento dessa fêmea por meio da palpação retal e/ou ultrassonografia a cada 48h para o monitoramento do crescimento folicular. A partir deste momento, o trato reprodutivo deve ser avaliado diariamente visando detectar o dia da ovulação (SÁ, 2017; FLORES e MOYA, 2020).

A elevada concentração circulante do estrógeno também é capaz de causar alterações em todo trato reprodutivo, as quais são visíveis somente com auxílio da ultrassonografia transretal. Neste contexto, o endométrio se apresenta em camadas bem evidentes devido à hiperplasia e hipertrofia das células endometriais. Essas dobras são conhecidas como “edema uterino” e são características do período de estro (LAGE, 2007; PORTO, 2007).

A partir da ocorrência da ovulação, a égua se encontra no diestro, fase caracterizada pela presença do CL. Essa glândula é produtora do hormônio progesterona, que dentre outras ações, atuará diretamente no endométrio, preparando-o para uma possível gestação. Além disso, os sinais de estro já não estão mais presentes. Este CL permanecerá por todo período gestacional, perdendo sua função momentos antes do parto. Caso não ocorra fecundação do oócito, o

endométrio liberará o hormônio prostaglandina F2 α (PGF2 α), o qual será responsável pela lise do CL em torno do 15º do ciclo (PIMENTEL et al., 2014).

2.3 Inseminação artificial e transferência de embriões em equinos

As biotecnologias da reprodução em equinos vem crescendo de forma rápida, principalmente em equinos destinados ao esporte (SQUIRES, 2019). A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica que contribui para o melhoramento genético e a eficiência reprodutiva em um sistema voltado para criação da espécie equina (WEISS, VIANA e MURADÁ, 2013). Todavia, alguns fatores devem ser levados em consideração para que se obtenha sucesso com a técnica, como uma boa avaliação da égua que será inseminada, um bom manuseio da técnica pelo médico veterinário e análise e armazenamento do sêmem que será utilizado (WATSON, 1995).

O controle do ciclo estral das éguas é feito com uso de fármacos como a gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou então, a deslorelina, que são hormônios indutores da ovulação. A indução da ovulação nos permite ter um maior controle do tempo estimado para que a ovulação aconteça e para que possa ser programado o melhor momento para a inseminação. A aplicação hormonal é feita quando o folículo dominante atinge em média 35mm e a ovulação ocorre de 36 a 48 horas após a administração dos hormônios (FARIA e GRADELA, 2010; CONBOY, 2011; MELO et al., 2012). Vale ressaltar que o equino é um animal que apresenta muitas particularidades e deve-se avaliar cada égua individualmente para que se possa estabelecer a conduta que seja mais adequada.

Na indústria equestre, outra técnica que ganhou destaque é a transferência de embriões (TE), que sem dúvida provou ser um grande sucesso comercial e uma ferramenta útil para reprodução de éguas que desempenham atividades atléticas (SQUIRES et al. 1982; VANDERWALL e WOODS, 2007; CUERVO-ARANGO et al., 2020).

Algumas das vantagens da TE é o maior número de potros produzidos por doadora de embrião em um ano, reprodução de éguas mais velhas ou que apresentem desafios e baixa fertilidade, ou mesmo a obtenção de produtos de éguas que participam de competições e são incapazes de se tornarem gestantes (HARTMAN, 2011; GOMES et al., 2016). Após a colheita do embrião por sucessivas lavagens uterinas, o mesmo é transferido para égua receptora cerca de 7 a 9 dias após a IA (FLEURY et al, 2001).

Para o maior sucesso da TE é necessário total domínio sobre a técnica bem como do momento que ela pode ser aplicada. Muitos fatores podem influenciar o procedimento como

aqueles relacionado à própria égua como os relacionados ao ambiente e manuseio do embrião.

2.4 Influência da Contagem de Folículos Antrais (CFA) sobre aspectos reprodutivos

A CFA vem ganhando bastante notoriedade no campo da reprodução animal. Alguns fatores como a espécie, raça, genética, níveis hormonais, *status* reprodutivo e a idade da fêmea possuem influência sobre a população de folículos antrais ovarianos (BURNS et al., 2005; GHANEM et al., 2016). Contudo, pouco ainda se sabe sobre os efeitos da CFA em parâmetros reprodutivos da espécie equina.

Em bovinos a CFA já vem sendo amplamente estudada e alguns aspectos que incluem a CFA e a fertilidade de vacas já são bem estabelecidos. Entre eles, sabe-se que a CFA é altamente repetível em um mesmo indivíduo e possui uma alta variabilidade individual (; IRELAND et al., 2007, 2008; JIMENEZ- KRASSEL et al., 2009; SILVA-SANTOS et al., 2014). Estudos mostraram que fêmeas taurinas com baixa CFA demonstraram características negativas para fertilidade, tais como ovários menores (IRELAND et al., 2008), taxa de prenhez reduzida (MOSSA et al., 2012), menor número de embriões viáveis na técnica de superovulação (IRELAND et al., 2007), menores concentrações de progesterona e AMH (EVANS et al., 2012), assim como endométrio com espessura reduzida (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009).

Por outro lado, alguns estudos conduzidos no Brasil revelaram que não necessariamente vacas de baixa CFA apresentam fertilidade mais baixa (SANTOS et al., 2016; MORETTI et al., 2016). Principalmente animais zebuínos e cruzados, revelaram maiores taxas de crescimento e maior diâmetro do folículo dominante (SANTOS et al., 2012). A grande variabilidade na CFA, a grande heterogeneidade de rebanhos e categorias de fêmeas, os diferentes manejos bem como a falta de padronização nos critérios de classificação dos grupos de alta e baixa CFA, tornam o total conhecimento da CFA sobre a fertilidade muito desafiador.

Ademais, segundo Batista et al. (2016), já foi estabelecido que as concentrações do AMH, que é liberado pelas células da granulosa de folículos ovarianos em crescimento, estão positivamente relacionadas com a entrada em puberdade das fêmeas bovinas, ou seja, quanto maior a concentração sérica desse hormônio maior vai ser a CFA e suas variações em uma onda folicular (IRELAND et al., 2008). Na espécie equina já foi estudado que os níveis plasmáticos de AMH tiveram uma correlação direta com a CFA e também com a idade dos animais (CLAES et al., 2016).

Burns et al. (2005) e Ireland et al. (2007) classificaram a CFA em três categorias, sendo elas baixa, média e alta. Os trabalhos com equinos são escassos, um desses estudos, o de Claes

et al. (2015) realizado com éguas, demonstrou que é possível estimar a CFA nas fêmeas equinas a partir da visualização de folículos com ≥ 2 mm de diâmetro em ambos os ovários. Outro estudo do mesmo grupo feito com fêmeas equinas revelou a repetibilidade da CFA entre os ciclos estrais de éguas, e a correlação entre a CFA e concentração plasmática do AMH.

Dessa forma, não é possível estabelecer respostas concretas sobre a influência da CFA sobre parâmetros reprodutivos de fêmeas equinas. Assim sendo, para que se possa ter um melhor entendimento da relação da CFA e da fertilidade em éguas, mais estudos precisam ser conduzidos.

2.5 Influência da idade na taxa de prenhez

Na espécie equina, as fêmeas com idade avançada apresentam maiores desafios no campo da reprodução. Com relação a prenhez, perda embrionária e taxas de potros vivos, o avanço da idade da égua pode afetar adversamente a eficiência reprodutiva. As causas para a associação entre o aumento da idade da égua e o declínio da fertilidade são numerosas e multifatoriais. Os exemplos incluem redução da viabilidade oocitária e embrionária, alterações degenerativas do trato reprodutivo externo e interno e alterações no desenvolvimento das membranas fetais (SCOGGIN, 2015).

Sabe-se que a condição uterina passa pelo processo de senilidade conforme a égua se torna mais velha, observando-se uma maior taxa de perdas embrionárias em fêmeas mais velhas, além da maior qualidade dos oócitos (BALL et al., 1986; CARNEVALE e GINTHER, 1992; CARNEVALE et al., 1999). Além disso, Ginther et al. (2009) relatou uma atividade hormonal e folicular diminuída, bem como folículos pré-ovulatórios menores em éguas com maior idade.

2.6 Corpo Lúteo e taxa de prenhez

Sabe-se que o CL é uma estrutura de grande importância nas fêmeas equinas inseridas em programas reprodutivos. O CL é o órgão responsável pela produção do hormônio P4 que exerce papel fundamental na gestação, uma vez que prepara o útero para receber o embrião e mantém a gestação. Segundo Sales et al. (2021), a vascularização do CL nas éguas medida por ultrassonografia Doppler se correlaciona com os níveis de P4 e com o dia da TE.

Já foi demonstrado que a atividade funcional do CL não depende do seu tamanho, considerando que não foi encontrada relação entre a área do CL e as concentrações de P4

(LÜTTGENAU et al. 2011; SALES et al., 2021). Outro estudo concluiu que não há razão para sugerir que selecionar uma potencial égua receptora de embriões com base em um CL maior ou mais vascularizado, irá melhorar os resultados da TE em éguas (BROGAN et al., 2016).

Contudo, o diâmetro do CL pode ser levado em consideração, em conjunto com a vascularização medida por ultrassonografia Doppler, para avaliar a sua funcionalidade. Então, esses dois parâmetros podem ser usados como indicadores de um CL funcional (BROGAN et al., 2016).

2.7 Grau de edema uterino e taxa de confirmação da prenhez

O edema uterino é caracterizado pela presença de fluido e formação de pregas endometriais. Essas mudanças ocorrem gradualmente ao longo do estro (HAYES et al., 1985) devido ao aumento de fluido produzido pelas glândulas endometriais (MOURA e MERKT, 1996) o que caracteriza o edema estral. Este é resultado da ação do estrógeno secretado pelo folículo dominante que promove alterações tanto na consistência como na textura uterina (GINTHER et al., 2008).

O útero, durante a fase folicular, desenvolve dobras endometriais ingurgitadas que resultam em uma imagem ultrassônica típica, a chamada 'roda de carrinho' efeito que representa a alternância e o entrelaçamento de áreas ecogênicas e hipoecogênicas. O edema uterino geralmente se torna menos proeminente à medida que a ovulação se aproxima (PELEHACH et al., 2002).

O maior grau de edemaciação do útero, observado por meio da ultrassonografia transretal em fêmeas equinas pela visualização das pregas endometriais, representa que a égua está em seu período de ciclicidade (CUERVO-ARANGO e NEWCOMBE, 2008). O edema uterino observado na ultrassonografia transretal pode ser classificado em uma escala de 0-5 (SAMPER, 1997), onde 0 representa éguas em diestro que não possuem edema uterino e 5 éguas com edema uterino máximo.

2.8 Dia da transferência de embrião e taxa de confirmação do embrião na receptora

As taxas de prenhez após a TE nos equinos, são afetadas pelo dia pós-ovulação (dia do diestro) de éguas receptoras em que a transferência de embrião é realizada. Considerando o dia da ovulação o D0, as taxas de prenhez tendem a diferir ao transferir embriões do dia 7 ou 8 para receptoras entre 5 e 9 dias após a ovulação. A idade e o tamanho do embrião também

influenciam no sucesso das taxas de prenhez nas receptoras em programas de transferência de embrião (CARNAVALE et al., 2000).

O estudo de Carnavale et al. (2000), demonstrou que a transferência de embriões pequenos (D7 e 8) mostraram menores taxas de prenhez quando comparados a embriões maiores. Mesmo quando a técnica de transferência de embriões estava ainda sendo desenvolvida, Vogelsang et al. (1985) avaliou que as maiores taxas de prenhez seriam correspondentes a embriões transferidos em D6 (61%), D7 (55%) e D8 (25%).

Dessa forma, poucos estudos existem comparando o dia da TE e as taxas de prenhez. Essa variável se torna bastante relevante uma vez que é de suma importância para a indústria equestre, pois quanto melhor for manipulado o embrião equino em procedimentos de transferência, mais eficiente será todo o processo (JACOB et al., 2012).

2.9 Época do ano e taxa de confirmação do embrião

Como já relatado no tópico 2.2, a reprodução na espécie equina é dependente da sazonalidade, ou seja, épocas do ano como primavera e verão onde há maior luminosidade e os dias têm maior duração, são os períodos do ano em que as éguas apresentam atividade hormonal intensa e estão ciclando. Isso porque é nesse período em que o eixo hipotálamo-hipófise é ativado pelo estímulo luminoso e os hormônios envolvidos na reprodução são liberados (TRUNDELL, 2020).

Alguns fatores podem influenciar a ciclicidade nessa espécie e até nos resultados de prenhez, como o fotoperíodo, temperatura e chuvas (MCCUE et al., 2011). Já foi observado diferenças na atividade folicular de éguas entre os meses do ano e esse fato se deve a variação sazonal da concentração de gonadotrofinas pituitárias (FSH) (GINTHER, 1992).

Apesar de já ser estabelecido que durante o período reprodutivo a primavera e verão são as estações climáticas que proporcionam maiores chance de sucesso nas atividades reprodutivas de éguas, maiores informações são necessárias para avaliar taxas de concepção. Pouco se sabe sobre a influência dos efeitos da sazonalidade na taxa de confirmação de embriões nas receptoras equinas, dessa forma mais estudos devem ser conduzidos a fim de verificar a correlação entre essas variáveis.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M. A. e TONGU, E. A. O. Estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva em programas de transferência de embrião de equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 19-24, 2017.
- BALL, B.A.; LITTLE, T.V.; HILLMAN, R.B.; WOODS, G.L. Pregnancy rates at days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertilemares. **Theriogenology**, v. 26, n. 5, p. 611-9, 1986.
- BATISTA, E.O.S.; MACEDO, G.G.; SALA, R.V.; ORTOLAN, M.D.D.V.; SA FILHO, M.F.; DEL VALLE, T.A.; JESUS, E.F.; LOPES, R.N.V.R.; RENNO, F.R.; BARUSELLI, P.S. Plasma Antimüllerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, n.43, p.448-452, 2014.
- BRISTOL-GOULD, S. K.; KREEGER, P. K.; SELKIRK, C. G.; KILEN, S. M.; COOK, R. W.; KIPP, J. L.; WOODRUFF, T. K. Postnatal regulation of germ cells by activin: The establishment of the initial follicle pool. **Developmental Biology**, v.298, n.01, p.132-148, mar, 2006.
- BROGAN, P. T.; HENNING, H.; STOUT. T. A. E.; DE RUIJTER-VILLANI, M. Relationship between colour flow Doppler sonographic assessment of corpus luteum activity and progesterone concentrations in mares after embryo transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 166, p. 22-27, 2016.
- BURNS, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.; KNIGHT, P.; IRELAND, J. Numbers of Antral Follicles During Follicular Waves in Cattle: Evidence for High Variation Among Animals, Very High Repeatability in Individuals, and an Inverse Association with Serum Follicle-Stimulating Hormone Concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, n.01, p.64-72, jul, 2005.
- CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, v. 37, n. 5, p. 1101-15, 1992.
- CARNEVALE, E.M.; USON, M.; BOZZOLA, J.J.; KING, S.S.; SCHMITT, S.J.; GATES, H.D. Comparison of oocytes from young and old mares with light and electron microscopy. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 299, 1999.
- CARNEVALE, E. M.; RAMIREZ, R. J.; SQUIRES, E. L.; ALVARENGA, M. A.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 965-79, 2000.
- CLAES, A.; BALL, B.A.; SCOGGIN, K.E.; ESTELLER-VICO, A.; KALMAR, J.J.; CONLEY, A.J.; SQUIRES, E.L.; TROEDSSON, M.H.T. The interrelationship between anti-Müllerian hormone, ovarian follicular populations and age in mares. **Equine veterinary journal**, v. 47, n. 5, p. 537-541, 2015.
- CLAES, A.; BALL, B.A.; TROEDSSON, M.H.T; CURRY, T.E.; SQUIRES, E.L.;

SCOGGIN, K.E. Molecular changes in the equine follicle in relation to variations in antral follicle count and anti-Müllerian hormone concentrations. **Equine veterinary journal**, v. 48, n. 6, p. 741-748, 2016.

CONBOY, H.S. Management of stallions in artificial insemination. In: McKinnon, A.O.; Squires, E.L.; Vaala, W.E.; Varner, D.D. **Equine Reproduction**. 2nd ed. Wiley- Blackwell: Hoboken, 2011. p. 1198-1207.

CUERVO-ARANGO, J.; NEWCOMBE, J.R. Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. **Theriogenology**, v. 69, p. 681-687, 2008.

CUERVO-ARANGO, J.; MARTÍN-PELÁEZ, M. S. e CLAES, A. N. A practical guide to estimate the age of the early CL by ultrasonography in mares examined for the first time to be used as recipients in a commercial embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 153, p. 48-53, 2020.

DE MORAES, F. L. Z.; MOROTTI, F.; COSTA, C. B.; LUNARDELLI, P. A.; SENEDA, M. M. Relationships between antral follicle count, body condition, and pregnancy rates after timed-AI in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 136, p. 10–14, 2019.

EPPIG J.J.; SCHROEDER A.C.; O'BRIEN M.J. Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, n. 1, p.119-127, 1992.

EVANS, A.C.O.; MOSSA, F.; WALSH, S.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J. Effects of Maternal Environment During Gestation on Ovarian Folliculogenesis and Consequences for Fertility in Bovine Offspring. **Reproduction in Domestic Animal**, v.47, n. 4, p.31–37, 2012.

FARIA, D. R. e GRADELA, A. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 114-122, 2010.

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C. J.; THIRY, M.; VAN DER HURK, R.; BEVERS, M. M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J. F. Extracellular matrix proteins and basement membrane: identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. **Theriogenology**. v.43, n.5, p.845-58, 1995.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P. B.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, p. 227-327, 2008.

FLEURY, J.J., PINTO, A.J., MARQUES, A., LIMA, C.G., ARRUDA, R.P. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 38, n.1, p. 29-33, 2001.

RIBEIRO, J. C. Avanços Científicos e Tecnológicos nas Ciências Agrárias 3. In: Flores, G. V. B. e Moya, C. F. **Fisiologia Reprodutiva Básica da Fêmea Equina**. 1 ed. Atena: Ponta

Grossa, 2020. p. 134-145.

GARCIA, S. e FERNÁNDEZ, C. **Embriologia**, 3 ed, Artmed: Porto Alegre, 2012. p.55-78.

GINTHER, O. J. Maternal aspects of pregnancy. In: **Reproductive biology of the mare. Basic and applied aspects**. 2 ed. Equiservices: Cross Plains, 1992. p. 324–8.

GINTHER, O.J.; RODRIGUES, B.L.; FERREIRA, J.C.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Characterisation of pulses of 13, 14-dihydro-15-keto PGF₂alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 6, p. 684-93, 2008.

GINTHER, O. J.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; JACOB, J. C.; BEG, M. A. Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 780–8, 2009.

GHANEM, N. et al. The Anti-Müllerian Hormone Profile is Linked with the In Vitro Embryo Production Capacity and Embryo Viability after Transfer but Cannot Predict Pregnancy Outcome. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 2, p. 301-310, 2016.

GOMES, R.G.; DA SILVA, B.C.; GONZÁLEZ, S.M.; LINDQUIST, A.G.; BLASCHI, W.; BARREIROS, T.R.R.; SENEDA, M.M. Equine Reproduction: Physiology and Advances in Technology. In: Seneda, M.M.; Silva-santos, K.C.; Marinho, L.R. **Biotechnology of Animal Reproduction**. Hauppauge: Nova Science Publisher's, 2016, p. 47 – 78.

GURGEL, J. R. C.; VIANA, C. H. C.; PEREZ, E. G. A.; NICHI, M. Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 122-132, 2008.

HAYES, K. E. N. e GINTHER, O. J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology**, v. 25, n. 4, p. 581-90, 1986.

HARTMAN, D. L. Embryo transfer. In: McKinnon, A. O.; Squires, E. L.; Vaala, W. E.; Varner, D. D. **Equine Reproduction**. 2ed. Hoboken: Wiley- Blackwell, 2011. p. 2871-2879.

IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G.W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v.22, n.6, p.1687–1695, 2007.

IRELAND, J.L.H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A.P.N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; PEREZ, G.I.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1219-1225, 2008.

ISHAK, G. M.; BASHIR, S. T.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. Pre-ovulatory follicle affects corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 187, p. 1-12, 2017.

JACOB, J. C. F.; HAAG, K. T.; SANTOS, G. O.; OLIVEIRA, J. P.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1159-66, 2012.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; SCHEETZ, D. M.; NEUDER, L.; IRELAND, J. L. H.; PURSLEY, J. R.; SMITH, G. W.; TEMPELMAN, R. J.; FERRIS, T.; ROUDEBUSH, W. E.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Concentration of anti-müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n.5, p 3036–3045, 2015.

KAMADA, A. M.; GAGLIOTTI, I. P.; DOMINGOS, C.; JUNIOR, W. R. P. F.; COLLA, S.; JARDINI, F. H. M.; BOCCIA, J. P.; CAVALCANTI, P. V.; Tratamento de foliculo anovulatório persistente em égua: relato de caso. **Journal of the Health Science Institute**, v. 31, n. 1, p. 09-12, 2013.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. Crescimento e Desenvolvimento do Concepto. **Obstetrícia Veterinária**, 1 ed, Campo Grande, 2017, p.52-69.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Piracicaba: CEPEA/ESALQ/USP, 2006. 251p.

LIMA, R. A. S. e CINTRA, A. G. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**, 2016.

LÜTTGENAU, J.; ULBRICH, S. E.; BEINDORFF, N.; HONNENS, A.; HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 125, n. 1-4, p. 20-29, 2011.

MCCUE, P.; SCOGGIN, C.; LINDHOLM, A. Estrus. In: McKinnon, A. O.; Squires, E. L.; Vaala, W. E.; Varner, D. D. **Equine reproduction**, 2ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2011, p. 1716–27.

MCCUE, P. M. e SQUIRES, E. L. **Equine Embryo Transfer**. 1ed. Jackson: Teton NewMedia, 2015. 184p.

MELO, C. M. ; PAPA, F. O.; PUOLI FILHO, J. N. P.; ARAUJO, G. H.; DELL'AQUA JR, J. A.; ALVARENGA, M. A. Efficiency of the deslorelin acetate and equine pituitary extract on induction of ovulation in mares. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n. 03, p. 392-39, 2012.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. Início do desenvolvimento humano. In: MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.13-38, 1994.

MORLEY, S. A. e MURRAY, J. The Effects of Body Condition Score on the Reproductive Physiology of the Broodmare: A Review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 7, p. 842-853, 2014.

MOROTTI, Fábio. **Influência da contagem de folículos antrais na dinâmica folicular ovariana e nos parâmetros de mérito genético de fêmeas bovinas**. 2016. 102 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

MOROTTI, Fábio.; FONSECA ZANGIROLAMO, Amanda.; COVRE DA SILVA, Nathalia.; BIZARRO DA SILVA, Camila.; OLIVEIRA ROSA, Camila.; MARCONDES SENEDA, Marcelo. Antral follicle count in cattle: advantages, challenges, and controversy, **Animal Reproduction Science**, v.14, n.3, p.514-520, jan, 2017.

MOROTTI, F.; MORETTI, R.; DOS SANTOS, C.M.G.; CRISTINA SILVA-SANTOS, K.; RAMOS CERQUEIRA, P.H.; SENEDA, M. M.; Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. **Theriogenology**, v.188, p.170-177, jan, 2018.

MORETTI, Rogério. **Influência da contagem de folículos antrais sobre as taxas de concepção e prenhez em vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas a sincronização da ovulação**. 2016. 28 f. Dissertação (Mestrado em saúde e produção de ruminantes: Produção Animal) – Universidade do Norte do Paraná e Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

MOURA, J. C. A. e MERKT, H. **A ultra-sonografia na reprodução equina**. 2.ed. Salvador: Universitaria Americana, 1996. 162 p.

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.

PELEHACH, L. M.; GREAVES, H. E.; PORTER, M. B.; DESVOUGES, A. SHARP, D. The role of estrogen and progesterone in the induction and dissipation of uterine edema in mares. **Theriogenology**, v. 58, n. 2, p. 441-444, 2002.

PIMENTEL, M. M. L.; DOS SANTOS, F. A.; DIAS, R. V. C.; MÂCEDO, L. B.; FONSECA, Z. A. A. S.; ANDRÉ, W. P. P.; RIBEIRO, W. L. C. Monitoramento do ciclo estral de fêmeas equinas por meio de citologia vaginal, ultrassonografia e dosagem hormonal. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, n. 1, p. 69-75, 2014.

PORTO, R. R. M.; CAVALCANTE, T. E.; DIAS, F. E. F.; ROCHA, J. M. N.; SOUZA, J. A. T. Perfil citológico vaginal de ovelhas da raça Santa Inés no acompanhamento do ciclo estral. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 521-528, 2007.

RAJKOVIC, A.; PANGAS, S.A.; MATZUK, M.M. Follicular development: mouse, sheep, and human models. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**, v. 1, p. 383-423, 2006.

SALES, F. A. B. M.; AZEVEDO, M. V.; SOUZA, N. M.; FERREIRA-SILVA, J. C.; CHAVES, M. S.; RIBERIO JUNIOR, V.; ROCHA, J. M.; SANTOS FILHO, J. P.; FREITAS, V. J. F. E OLIVEIRA, M. A. L. Correlations of corpus luteum blood flow with fertility and progesterone in embryo recipient mares. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, p. 280, 2021.

SÁ, M. Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução em Éguas. 2017. Disponível em: <(14) (PDF) Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução em Éguas (researchgate.net)>. Acesso em: 16 dez, 2021.

SAMPER, J. C. Ultrasonographic Appearance and the Pattern of Uterine Edema to Time Ovulation in Mares. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v, 43, p. 189-191, 1997.

SANTOS, B. E. S.; BRANDI, R. A. e GAMEIRO, A. H. Estudo do mercado e produção do cavalo Brasileiro de hipismo no estado de São Paulo. **PubVet**, v. 12, n. 2, p.150, 2018.

SANTOS, G.M.G.; SILVA-SANTOS, K.C.; BARREIROS, T.R.R.;MOROTTI,F.; SANCHES, B.V.; MORAES, F.L.Z.; BLASCHIB, W.; SENEDA, M.M. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal Reproduction Science**, v.165, p.17-21, 2016.

SANTOS, G.M.G.; SILVA-SANTOS, K. C.; SILOTO, L.S.; MOROTTI, F.; MARCANTONIO, T.N.; MARINHO, L.S.R.; THASMO, R.L.O.; KOETZ, J.R.C.; CINTRA, D.M.L.; SENEDA, M.M. Dinâmica folicular em fêmeas bovinas de alta, média e baixacontagem de folículos antrais: resultados preliminares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, p.422, 2012. (abstract).

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogênese. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.157, p.29-38, 1981.

SCOGGIN, C. F. Not just a number: effect of age on fertility, pregnancy and offspring vigour in thoroughbred brood-mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, p. 872-879, 2015.

SENEDA, M. M. e SILVA, K.C.F. Epigenética e neo-oogênese: novos conceitos em foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.03, p.11-117, set, 2009

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; KOETZ JÚNIOR, C.; MOROTTI, F.; SILOTO, L.S.; MARCANTONIO, T.N.; URBANO, M.R.; OLIVEIRA, R.L.; LIMA, D.C.M.; SENEDA, M.M. Antral follicle populations and embryo production - *in vitro* and *in vivo* - of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.228-32, 2014.

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.; LUNARDELLI, P.A.; COSTA, C.M. Female Reproductive Physiology: Current Concepts and Advanced Perspectives. In: SENEDA, M.M; SILVA-SANTOS, K.C.; MARINHO, L.S. **Biotechnology of Animal Reproduction**, 1 ed, Nova Iorque: Nova Science Publishers, 2016, p.1-25.

SOUZA, F. A.; OSÓRIO, J. P.; D'OLIVEIRA-SOUSA, A.; VALE FILHO, V; R.; MARC, H.; CHÁCON, L.; ARIAS, S. A. Foliculogênese y ovulación en la especie equina. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 22, p. 43-50, 2011.

SQUIRES, E. L. Perspectives on the development and incorporation of assisted reproduction in the equine industry. **Reproduction, fertility, and development**, v. 31, n. 12, p. 1753-1757, 2019.

SQUIRES, E. L.; IULIANO, M. F. e SHIDELER, R. K. Factors affecting the success of surgical and nonsurgical equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 17, n. 1, p. 35-41, 1982.

TEZZA, L.; DITTRICH, J. **Reprodução em Equinos**. 2006. 1–13p.

VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E. E.; BEVERS, M. M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction Update**, v.6, n.5, p.457-474, 2000.

VAN DEN HURK, R. E ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, Amsterdam, v.63, n.6, p.1717-1751, abr, 2005.

VANDERWALL, D. K. e WOODS, G. L. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses. In: YOUNGQUIST, R. S.; THRELFALL, R. W. E SAUNDERS, W. B. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**, 2ed, St Louis: Saunders, 2007, p. 211-218.

VIEIRA, E. R. **Aspectos econômicos e sociais do complexo agronegócio cavalo no Estado de Minas Gerais**. 2011.140p. Dissertação (Mestrado em: Zootecnia). Escola de Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VOGELSANG, S. G.; BONDIOLI, K. R.; MASSEY, J. M. Commercial application of equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 3, s. 3, p. 89 –91, 1985.

WATSON, E. Artificial Insemination in Horses. **In practice**. v. 17, p. 54-58, 1995.

WEISS, R.R.; VIANNA, B.C.; e MURADÁS, P.R. Inseminação Artificial em Éguas com Sêmen “*In natura*” e Diluído. **Archives of Veterinary Science**. v. 8, n. 1, 2003.

3. HIPÓTESE

Fêmeas equinas jovens receptoras de embrião, e aquelas que apresentam menor contagem de folículos antrais ovarianos (CFA), possuem taxas mais altas de concepção após a transferência de embrião.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi verificar a relação da contagem de folículos antrais com características reprodutivas de éguas receptoras de embrião.

4.2 Objetivos específicos

Determinar a correlação das características abaixo com a CFA e taxas de concepção em fêmeas equinas receptoras de embrião

- escore de condição corporal (ECC)
- peso
- idade
- diâmetro do corpo lúteo (CL)
- grau de edema uterino
- estação do ano da transferência de embrião
- sazonalidade

5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

“Relação da contagem de folículos antrais com características reprodutivas de éguas receptoras de embrião”

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar a estimativa da contagem de folículos antrais (CFA) em éguas receptoras de embrião através da ultrassonografia transretal e relacionar a CFA com a fertilidade. Um grupo de fêmeas equinas (n=77) de diferentes idades (entre 5 e 16 anos) e raças (sem raça definida) foi avaliado para CFA. O grupo de baixa foi definido com CFA ≤ 11 folículos (n=43 éguas) e alta > 11 folículos (N = 34 éguas). O protocolo hormonal das receptoras dependeu da fase do ciclo estral em que elas se encontravam. Receptoras cíclicas foram sincronizadas juntamente com as doadoras e receberam o embrião entre os dias 4 e 6 (D4 – D6). As receptoras acíclicas receberam 5 mg de benzoato de estradiol (BE) via intramuscular (IM) no dia da ovulação da doadora (D0), 4 mg de BE via IM no dia seguinte (D-3 receptora; D1 doadora) e 3 mg de BE via IM (D-2 receptora; D2 doadora). Ademais, mais 1500 ml de progesterona (P4) via IM foram aplicados no D0 da receptora (D4 da doadora) e mais 1500 ml de P4 via IM aplicados no dia da TE (D4-6). No dia da transferência de embrião (TE) foram aferidos, além da CFA, o peso do animal, escore de condição corporal (ECC), diâmetro do corpo lúteo (CL), idade e grau de edema uterino, para estabelecer a relação desses parâmetros com a CFA. Ademais, foram considerados a ciclicidade da receptora e estação do ano da TE. No D12 foi feito o diagnóstico de gestação da receptora por meio da ultrassonografia transretal em modo B. Os dados foram analisados quanto à normalidade de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade de variâncias pelo teste F. Diferenças entre os grupos estudados foram analisadas por ANOVA empregando modelo de efeito misto, em que o grupo CFA, a estacionalidade reprodutiva e a estação do ano foram consideradas efeitos fixos. Foi adotado um nível de significância quando $P \leq 0,05$. A taxa de concepção foi maior em receptoras com baixa CFA em relação àquelas com alta CFA ($P = 0,016$). Não houve influência da estação do ano ($P = 0,798$), mas foi observado efeito de sazonalidade reprodutiva ($P = 0,005$; cíclica 81,40% vs. anestro estacional 58,82%), além de uma tendência ($P = 0,06$) a interação entre CFA e sazonalidade reprodutiva. A taxa de concepção foi maior em receptoras de baixa CFA e nas que eram cíclicas, demonstrando um efeito da sazonalidade reprodutiva. Contudo, não foi identificada interação entre a CFA e a ciclicidade. Ainda, o edema uterino também foi influenciado pela sazonalidade reprodutiva, éguas em anestro demonstraram um maior grau de edema uterino quando comparadas com as cíclicas.

Palavras-chave: Contagem de folículos antrais; transferência de embrião; receptora de embrião; equinos; corpo lúteo.

INTRODUÇÃO

O uso de biotécnicas da reprodução em equinos tem ganhado um grande destaque devido ao interesse pela criação de cavalos de alto mérito genético e, conseqüentemente, alto valor agregado. Neste propósito, a transferência de embriões (TE) é uma técnica possibilita uma melhor seleção genética, permitindo a produção de mais de um produto por ano de uma mesma égua. Ademais, a TE torna possível a geração de descendentes de éguas atletas que participam de competições, além de representar uma alternativa para muitas éguas que apresentam certos desafios reprodutivos (OLIVEIRA NETO et al., 2018).

Um parâmetro reprodutivo que vem sendo amplamente estudado é a população de folículos antrais, esse é um parâmetro que pode influenciar a fertilidade dos animais pois tem relação com diferentes variáveis envolvidas na atividade reprodutiva. Em equinos a contagem de folículos antrais (CFA) já vem sendo estudada, principalmente em trabalhos com doadoras de embriões (GONÇALVES et al., 2020). Sendo assim, estudos que envolvem éguas receptoras de embriões são raros e, portanto, estudar essa categoria de fêmeas é essencial visto o grande avanço de programas de TE.

Na espécie bovina, sabe-se que a CFA é variável entre os animais e altamente repetível em um mesmo indivíduo (SILVA-SANTOS et al., 2014; MORAES et al., 2019). Também nessa espécie já foi demonstrado que alguns fatores podem influenciar a CFA, como a idade (CUSHMAN et al., 2009), níveis plasmáticos de alguns hormônios e a dinâmica folicular, o que pode afetar diretamente a qualidade oocitária e a produção de embriões (IRELAND et al., 2007; MOSSA et al., 2012). Em fêmeas bovinas *Bos taurus* a CFA está relacionada com alguns parâmetros reprodutivos como taxas de prenhez no final da estação reprodutiva, responsividade ao tratamento superovulatório, potencial para produção de embriões e embriões viáveis concentrações circulantes de progesterona e AMH e espessura endometrial (MOROTTI et al., 2018).

No que diz respeito a influência da CFA sobre a fertilidade de fêmeas equinas pouco se sabe devido ao escasso número de trabalhos que estudaram esse conceito nessa espécie. Apesar de não ser possível afirmar que a idade e edema uterino influenciam o diâmetro do folículo pré-ovulatório e as taxas de recuperação embrionária Gonçalves et al. (2020) demonstraram que a idade em éguas possui influência sobre a CFA, uma vez que éguas mais novas demonstraram uma CFA maior do que éguas mais velhas. Além disso, éguas de baixa CFA apresentaram um maior edema uterino durante o estro, comparado àquelas fêmeas de alta CFA.

Outro parâmetro que vem sendo estudado a fim de tornar mais eficiente a aplicação das

biotécnicas da reprodução em éguas é a avaliação da funcionalidade do corpo lúteo (CL), que pode influenciar as taxas de confirmação de prenhez em éguas receptoras de embrião. Salles et al. (2021) concluíram que a vascularização do CL se correlaciona com as concentrações de progesterona e com o dia da TE. Contudo, a área e o diâmetro do CL não foram diferentes entre os grupos experimentais e não se correlacionaram. Esses resultados sugerem que os parâmetros morfométricos não são precisos para estimar a produção de progesterona (SALLES et al., 2021).

Com base no que foi apresentado, observa-se que a CFA pode ser utilizada como uma ferramenta para seleção de éguas receptoras que podem vir a ter um melhor desempenho em programas reprodutivos. Visto que estudos envolvendo a CFA na espécie equina são escassos, percebe-se a necessidade de realizar trabalhos que tenham como foco a CFA e sua relação com a fertilidade nessa espécie.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a relação da CFA com as características reprodutivas e dados de fertilidade em éguas receptoras de embrião. Dessa forma, a hipótese é que receptoras jovens que apresentam menor contagem de folículos antrais ovarianos e apresentem um melhor desempenho reprodutivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para este estudo, foi utilizado um grupo de fêmeas equinas receptoras de embrião (n=77) de diferentes idades (entre 5 e 16 anos) e raças, provenientes de uma propriedade localizada no município de Londrina (PR). As éguas foram avaliadas quanto contagem de folículos antrais, bem como foram obtidas informações referentes à idade, raça, peso, escore de condição corporal, diâmetro do corpo lúteo e grau de edema uterino. Também foram avaliados a sazonalidade e ciclicidade das receptoras bem como a estação do ano na qual foi realizada a TE. A idade quando não informada precisamente pelo proprietário, foi estimada através do exame da arcada dentária (SILVA et al., 2003). Os animais tiveram o peso aferido utilizando uma fita de peso própria para equinos. O escore de condição corporal foi determinado em uma escala, de 0 a 9, seguindo a técnica descrita por Henneke et al. (1983).

A utilização dos animais nesse estudo foi autorizada pelo comitê de ética para o uso de animais (CEUA - UEL) sob o processo de nº 091.2021. Todas as fêmeas permaneceram saudáveis e em ótimo estado nutricional durante todo o período do experimento.

Realização da contagem de folículos antrais por meio da ultrassonografia transretal

A quantificação da contagem de folículos antrais foi realizada por meio do exame de ultrassonografia transretal, no qual todos os folículos ≥ 2 mm foram contados, considerando o par de ovários para a estimativa. Cada ovário foi avaliado minuciosamente, de forma seriada, de um bordo ao outro, com o intuito de possibilitar a avaliação de todo o órgão, bem como não haver a repetição da contagem de um mesmo folículo, semelhante ao descrito por Claes et al. (2016). Para tanto, as fêmeas eram contidas em tronco de contenção adaptado para a espécie e o exame era realizado apenas por um avaliador experiente para possibilitar a padronização das avaliações.

No dia da TE para a receptora, cada ovário (direito e esquerdo) foi escaneado pelo ultrassom e todos os folículos visíveis no exame foram identificados e contados a cada avaliação. Os dados coletados foram descritos em fichas individuais de controle, contendo o número dos folículos, bem como informações adicionais. Previamente a análise estatística, os grupos de CFA foram estabelecidos a partir da média total de folículos antrais extraídos das 77 receptoras avaliadas. A CFA média foi de aproximadamente 11 folículos, portanto seguindo a metodologia propostas por Gonçalves et al. (2020) o grupo de baixa foi definido com CFA ≤ 11 folículos (N = 43 éguas) e alta >11 folículos (N = 34 éguas).

Avaliação ultrassonográfica do útero e CL

Através de exame ultrassonográfico em modo B com transdutor linear transretal de 5 MHz, foi realizada a avaliação ultrassonográfica do útero, as imagens foram pausadas na região de transição entre o corpo e cornos uterinos, e o grau de edema uterino classificado numa escala de 0 a 4 (MCCUE, SCOGGIN e LINDHOLM, 2011). Com o mesmo aparelho de ultrassom, o diâmetro do CL foi obtido pela média da distância entre as margens superior e inferior e a distância entre os bordos laterais do mesmo.

Inseminação artificial e colheita de embriões

Durante todo o acompanhamento de crescimento folicular, as éguas foram submetidas ao procedimento de inseminação artificial (IA) ao final de cada ciclo estral. Assim que foi identificado um folículo de diâmetro ≥ 35 mm, foi administrado pela via intramuscular (IM)

250 µg do indutor de ovulação acetato de histrelina (Strelin, Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil) associado a 1000 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG; Vetecor, Ceva®, Paulínia, São Paulo, Brasil), e então, após 48 horas da indução, estas fêmeas foram submetidas ao procedimento de IA com o uso de sêmen fresco, refrigerado ou congelado. A colheita de embriões foi realizada entre os dias 8 e 9 pós IA, por meio da lavagem uterina pelo método transcervical. Foi administrado 1 litro de ringer com lactato (JP Indústria Farmacêutica S.A., Ribeirão Preto, SP., Brasil) por vez, através da sonda para colheita de embrião equino (CH 32, Minitube®), totalizando no máximo 3 lavagens. Quando não foi visualizado o embrião durante os 3 ciclos completos de lavagens, foi retirado o conteúdo e a sonda, e então, o processo foi finalizado. As anotações a respeito do sucesso ou não na obtenção de embriões coletados das éguas em cada ciclo foram feitas em planilhas de controle.

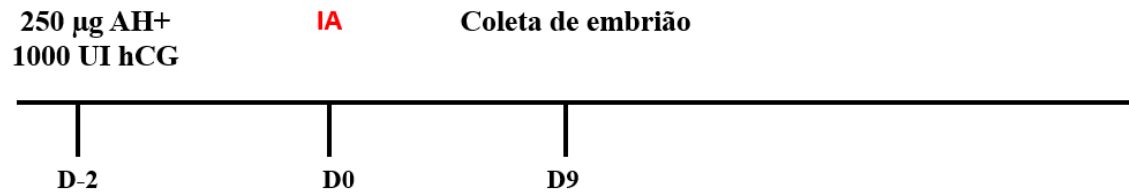
Protocolo de transferência de embrião para as receptoras

Após coletado o embrião das éguas doadoras, o mesmo foi transferido a uma receptora sincronizada farmacologicamente e apta a receber esse embrião. Foram utilizadas receptoras cíclicas e acíclicas, sendo que o protocolo hormonal de sincronização com a doadora variou entre elas e conforme a fase do ciclo estral. Receptoras cíclicas foram sincronizadas juntamente com as doadoras durante o controle folicular, conforme já descrito previamente. Elas receberam o embrião entre os dias 4 e 6 (D4 – D6). As receptoras acíclicas receberam 5 mg de benzoato de estradiol (BE; 5 ml) via IM (Gonadiol; Zoetis®, Nova Jersey, Estados Unidos) no dia da ovulação da doadora (D0; D-4 receptora), 4 mg de BE (4 ml) via IM no dia seguinte (D-3 receptora; D1 doadora) e 3 mg de BE (3 ml) via IM (D-2 receptora; D2 doadora). Ademais, mais 1500 mg de progesterona (P4; 5 ml) via IM (P4-300; Botupharma®, Botucatu, Brasil) foram aplicados no D0 da receptora (D4 da doadora) e mais 1500 mg de P4 (5 ml) via IM aplicados no dia da TE (D4-6 receptora) (Figura 1).

No dia da TE foram aferidos, além da CFA, o peso do animal, ECC, diâmetro do CL e idade, para que posteriormente, fosse possível estabelecer a relação desses parâmetros com a CFA. Ademais, foram considerados a ciclicidade da receptora além da estação do ano da TE. Após 8 a 10 dias (D8-10 receptora; D12 do embrião) foi feito o diagnóstico de gestação (DG) da receptora por meio da ultrassonografia transretal em modo B e os dados foram anotados. Nas receptoras que tiverem o DG positivo, foi iniciado um ciclo de P4 semanal através da aplicação IM de 1500 mg de P4 (5 ml) até os 120 dias de gestação (Figura 2).

Figura 1 – Protocolo de sincronização hormonal das doadoras de embrião

Doadoras (sêmen congelado)



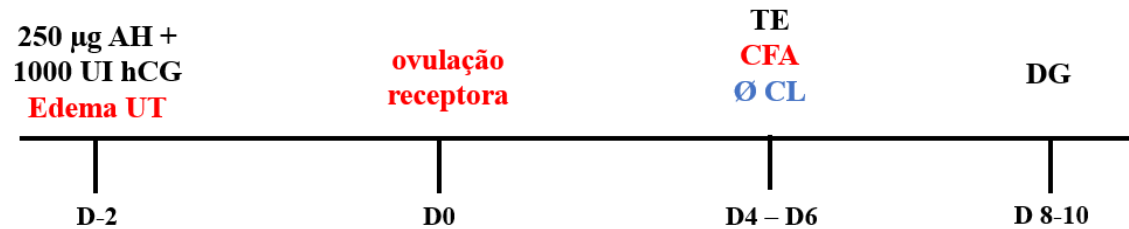
Doadoras (sêmen fresco e refrigerado)



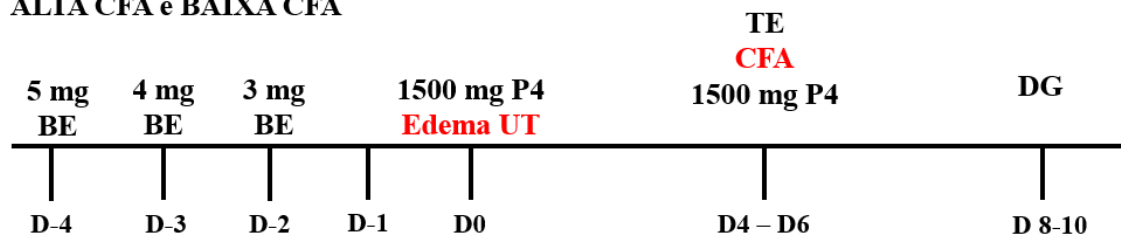
HA – acetato de histrelina; hCG – gonadotrofina coriônica humana; IA – inseminação artificial

Figura 2 – Protocolo de sincronização hormonal das receptoras de embrião cíclicas e acíclicas

Receptoras cíclicas (n=43)
ALTA CFA e BAIXA CFA



Receptoras acíclicas (n=34)
ALTA CFA e BAIXA CFA



BE – benzoato de estradiol; CFA – contagem de folículos antrais; CL – corpo lúteo; DG – diagnóstico de gestação; P4 – progesterona; TE – transferência de embrião; UT – uterino

Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade de variâncias pelo teste F. Diferenças entre os grupos estudados foram analisadas por ANOVA empregando modelo de efeito misto, em que o grupo CFA, a estacionalidade reprodutiva e a estação do ano foram consideradas efeitos fixos. Os animais foram considerados como efeito aleatório, e a idade, o peso e o ECC foram consideradas covariáveis. Efeitos principais e possíveis interações entre os efeitos principais também foram considerados no modelo. A taxa de concepção foi avaliada pelo modelo de regressão logística binária, sendo considerado os mesmos efeitos fixos, além do dia da TE e covariáveis descritos previamente. Na presença de efeito significativo, o ranking entre as taxas de concepção foi analisado por teste de proporção 2x2. Para análise descritiva, os dados estão apresentados como média \pm erro padrão ($M \pm SE$) ou como proporção. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software estatístico Minitab® 18, adotando um nível de significância quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $P < 0.1$.

RESULTADOS

O edema uterino foi semelhante ($P = 0,674$; Tabela 1) entre receptoras com baixa e alta CFA e não sofreu influência da estação do ano ($P = 0,934$), mas foi influenciado pela sazonalidade reprodutiva ($P = 0,05$). Embora éguas consideradas em anestro ($2,7 \pm 0,1$) desenvolveram maior grau de edema endometrial em relação às cíclicas ($2,4 \pm 0,1$), não houve interação entre CFA e ciclicidade ($P = 0,435$).

A idade, o peso e o ECC foram semelhantes entre as receptoras com baixa e alta CFA ($P = 0,109$; $P = 0,486$; $P = 0,193$, respectivamente; Tabela 1), não sendo fonte de variação para taxa de concepção do presente estudo. Da mesma forma, o diâmetro do CL não demonstrou ter relação com as taxas de concepção das receptoras e, também, não demonstrou ter interação com a CFA das éguas estudadas ($P = 0,233$; Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros reprodutivos de receptoras de embrião equina classificadas em alta (> 11 folículos) e baixa (≤ 11 folículos) contagem de folículos antrais (CFA) durante o programa de transferência de embrião.

Variáveis	Alta CFA ($M \pm EP$)	Baixa CFA ($M \pm EP$)	Valor de P

Animais (n)	34	43	-
Idade (anos)	9,35 ± 0,52	10,65 ± 0,47	0,109
Peso (kg)	402,06 ± 4,58	403,72 ± 3,12	0,486
ECC (1-5)	3,24 ± 0,10	3,43 ± 0,09	0,193
Número de folículos antrais (n)	15,41 ± 0,59	8,90 ± 0,37	< 0,0001
Edema uterino (0 a 4)	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	0,674
Diâmetro do CL (mm)	26,80 ± 0,89	28,67 ± 0,67	0,233
Taxa de concepção % (n)	61,76 (21)	79,07 (34)	0,016

A taxa de concepção foi maior em receptoras com baixa CFA em relação às aquelas com alta CFA ($P = 0,016$). Não houve influência do dia da TE ($P = 0,940$) e da estação do ano ($P = 0,798$), mas foi observado efeito de sazonalidade reprodutiva ($P = 0,005$; cíclica 81,40% vs. anestro estacional 58,82%), além de uma tendência ($P = 0,06$) a interação entre CFA e sazonalidade reprodutiva (Figura 3). Nesse contexto, receptoras de alta CFA utilizadas durante o anestro estacional apresentaram a menor taxa de concepção em relação aos demais grupos.

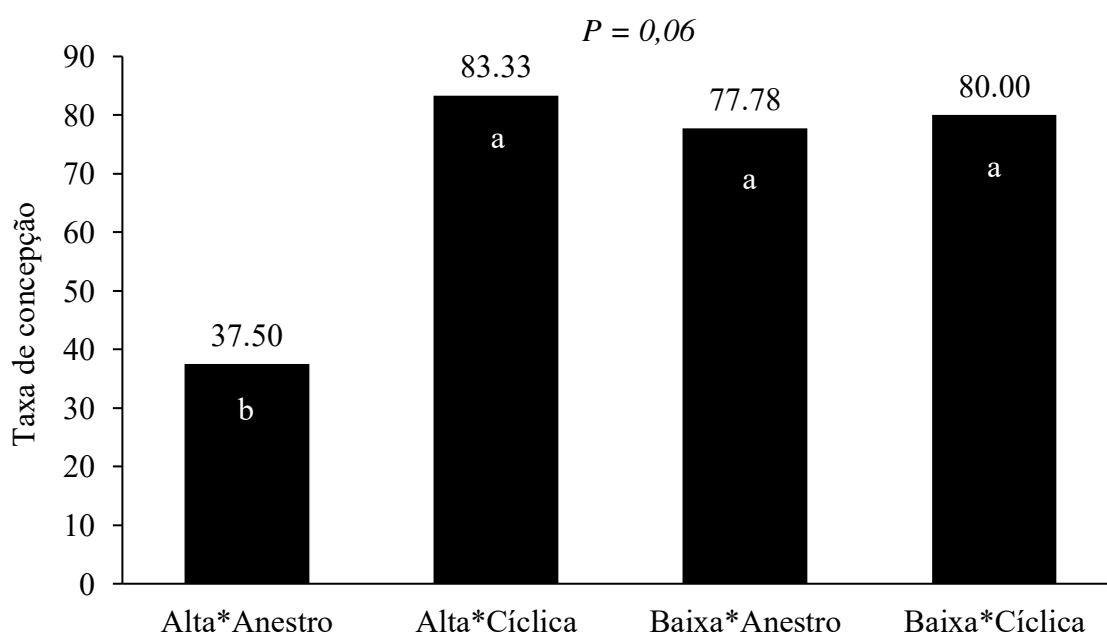


Figura 3 – Efeito da interação entre contagem de folículos antrais (CFA; baixa e alta) e a estacionalidade reprodutiva (cíclicas e anestro) sobre a taxa de concepção de receptoras de embrião equinas.

a-b indica diferença estatística entre os grupos de interação.

DISCUSSÃO

Esse é o primeiro trabalho a estudar a CFA e sua influência na fertilidade em éguas receptoras de embrião. Em relação a variável taxa de concepção, tivemos efeitos isolados tanto da CFA quanto da ciclicidade. A CFA foi um parâmetro avaliado que influenciou as taxas de concepção das receptoras equinas, uma vez que éguas de baixa CFA apresentaram uma maior taxa de concepção e também, a CFA teve tendência a uma interação com a sazonalidade reprodutiva. Esse resultado confirma a hipótese inicial do nosso trabalho, de que éguas de baixa CFA apresentariam melhor desempenho reprodutivo. Contudo, nossos resultados se contrapõem com o que foi demonstrado no estudo de Gonçalves et al. (2020), onde éguas jovens e de alta CFA apresentaram maior taxa de crescimento folicular.

Sugere-se que, uma justificativa plausível para esse acontecimento seria a de que, assim como nos bovinos (MOROTTI et al., 2018), o diâmetro folicular das éguas cíclicas de baixa CFA pode ter sido maior pelo ambiente uterino ser mais adequado e dessa forma, ter sido possível a formação de um CL mais ativo em termos de produção de P4. Contudo não se pode afirmar que há uma relação da quantidade de folículos antrais com o diâmetro do folículo pré-ovulatório uma vez que não foi realizada a mensuração do mesmo nas receptoras em nosso estudo.

Em vacas da raça Nelore já foi demonstrado por Morotti et al. (2018), que o número de folículos antrais pode influenciar no desempenho reprodutivo desses animais uma vez que, o diâmetro folicular das vacas *Bos indicus* inseridas em programas de inseminação artificial em tempo fixo, foi maior naquelas de baixa CFA. Em contrapartida, estudos avaliando a CFA e fertilidade em éguas são escassos, o que dificulta o total entendimento sobre a dinâmica folicular e o desempenho reprodutivo dessa espécie.

Outro ponto interessante do nosso estudo foi a sazonalidade reprodutiva, que foi um fator influente na fertilidade das receptoras equinas estudadas. O fato de a égua não estar na fase de anestro teve a uma interação positiva com as taxas de concepção, ou seja, éguas cíclicas

tiveram melhor desempenho reprodutivo. O melhor desempenho das éguas cíclicas deve-se ao fato de que o controle endócrino do ciclo estral pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, que é controlado principalmente pelo fotoperíodo, está em pleno funcionamento o que favorece a ocorrência da ovulação (PIMENTEL et al., 2014).

Sabe-se que a duração do anestro pode ser influenciada pela idade, nutrição, raça e temperatura (OBERHAUS e PACCAMONTI, 2013), dessa forma durante a transição de primavera (de agosto a outubro) o ciclo estral se inicia, contudo, estes são anovulatórios e prolongados. Nesse período alguns animais podem desenvolver algumas patologias como distrofia ovariana, ovulação retardada, atresia folicular, cistos luteínicos e cistos foliculares (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O edema uterino foi avaliado em todas as receptoras e foi semelhante tanto nas éguas de baixa como nas éguas de alta CFA. Contudo, o edema uterino foi influenciado pela sazonalidade reprodutiva, éguas em anestro apresentaram maior grau de edema endometrial do que éguas cíclicas. Esse fato provavelmente é devido a aplicação exógena de benzoato de estradiol nas éguas em anestro que receberam o protocolo hormonal de sincronização da ovulação. O estradiol é um hormônio esteroide que, conhecidamente, apresenta efeito vasodilatador, estando relacionado à formação do edema uterino em éguas e à proliferação e diferenciação celular do endométrio e miométrio (GINTHER, 1992; FORD, 1982;).

No que diz respeito a relação do grau de edema uterino e CFA, não foram encontradas diferenças entre as éguas de alta e baixa CFA, contudo, já foi demonstrado que há uma variação desse parâmetro de acordo com a baixa ou alta CFA (GONÇALVES et al., 2020). Ainda, Carnavale et al. (1992) também já havia relatado que existiria uma tendência ao aumento no grau de edema uterino com o passar da idade das éguas estudadas.

No presente estudo não foi encontrada relação do diâmetro do CL com as taxas de prenhez as receptoras de embrião, bem como com a CFA. Embora o CL seja o órgão responsável pela produção de P4, hormônio extremamente importante para a gestação, o tamanho do CL não influenciou no resultado final da TE. Maia (2015) e Gomes (2008) estudaram a relação do CL com a indução da ovulação em éguas e não encontraram nenhuma correlação significativa entre essas variáveis. Ademais, Medeiros et al. (2017) estudou a vascularização do CL, área luteal e níveis séricos de P4 em éguas e também não encontrou nenhuma relação entre esses parâmetros.

No que se refere a idade dos animais estudados, não foi demonstrado influência dessa variável com a CFA e os parâmetros reprodutivos. Contudo, já foi estudado em éguas, que há um maior intervalo entre ovulações de éguas com idade avançada e de baixa CFA (CLAES et

al., 2016; 2017). Além disso, Gonçalves et al (2020), que estudou éguas da raça Quarto de Milha e doadoras de embrião, considerou grupos de baixa (≤ 8 foliculos) ou alta (≥ 9 foliculos) CFA e grupos de éguas consideradas jovens (≤ 9 anos) ou velhas (≥ 10 anos), demonstraram que éguas mais jovens tendem a ter uma maior população de foliculos antrais bem como um maior crescimento folicular quando comparadas com éguas mais velhas. Dessa forma, pressupõe-se que a idade e a CFA sejam fatores relevantes a serem considerados em programas reprodutivos de equinos.

Por fim, vale ressaltar a importância do peso e do ECC das éguas receptoras de embrião em um programa reprodutivo. A condição corporal está diretamente relacionada com a eficiência reprodutiva, exercendo efeito sobre a duração do anestro estacional, período de transição para a ciclicidade, período interovulatório, entre outros (BENDER et al., 2014). No presente trabalho não foi constatada correlação entre a CFA, peso e ECC das éguas, provavelmente porque os animais possuíam esses parâmetros dentro dos valores desejados.

CONCLUSÃO

O presente estudo traz resultados promissores no que diz respeito a CFA e sazonalidade, sendo que a taxa de concepção foi maior em receptoras de baixa CFA e nas que eram cíclicas, demonstrando uma relação da fertilidade com CFA e sazonalidade reprodutiva. No entanto, não foi observada relação da CFA com idade, peso, ECC, edema uterino e diâmetro do CL das receptoras equinas avaliadas.

REFERÊNCIAS

BENDER, E. S. C.; SAMPAIO, B. F. B.; NOGUEIRA, B. G.; COSTA-E-SILVA, E. V. e ZÚCCARI, C.E.S.N. Condição corporal e atividade reprodutiva de éguas. **Archivos de Zootecnia**, v. 63, p. 55-67, 2014.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, v. 37, n. 5, p. 1101-1115, 1992.

CLAES, A.; BALL, B.A.; TROEDSSON, M.H.T; CURRY, T.E.; SQUIRES, E.L.; SCOGGIN, K.E. Molecular changes in the equine follicle in relation to variations in antral follicle count and anti-Müllerian hormone concentrations. **Equine veterinary journal**, v. 48, n. 6, p. 741-748, 2016.

CLAES, A.; BALL, B. A.; SCOGGIN, K. E.; ROSER, G. F.; WOODWARD, E. M.; DAVOLLI, G, M.; SQUIRES, E. L.; TROEDSSON, M. H. T. The influence of age, antral

follicle count and diestrous ovulations on estrous cycle characteristics of mares.

Theriogenology, v. 97, p. 34-40, 2017.

CUSHMAN, R.A.; ALLAN, M.F.; KUEHN, L.A.; SNELLING, W.M.; CUPP, A.S.; FREETLY, H.C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **Journal Animal Science**, v.87, n.6, p.1971–1980, 2009.

DE MORAES, F. L. Z.; MOROTTI, F.; COSTA, C. B.; LUNARDELLI, P. A.; SENEDA, M. M. Relationships between antral follicle count, body condition, and pregnancy rates after timed-AI in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 136, p. 10–14, 2019.

FORD, S. P. Control of uterine and ovarian blood flow throughout the estrous cycle and pregnancy of the ewe, sow and cow. **Journal of Animal Science**, v. 55(SII), p. 32-42, 1982.

GINTHER, O. J. Maternal aspects of pregnancy. In: **Reproductive biology of the mare. Basic and applied aspects**. 2 ed. Equiservices: Cross Plains, 1992. p. 324–8.

GONÇALVES, G. R.; MOROTTI, F.; COLOMBO, A. H. B.; BONATO, D. V.; BIZARRO-SILVA, C.; ROSA, C. O.; CAVALIERI, F. L. B.; SENEDA, M. M. Influence of age and ovarian antral follicle count on the reproductive characteristics of embryo donor mares. **Veterinary Record**, v. 186, n. 17, p. 564, 2020.

GOMES, T.J.S. **Equine corpus luteum vascular evaluation by power Doppler ultrasound**. 2008. 66f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. Barueri: Manole, 2004. 509 p.

HENNEKE, D. R.; POTTER, G. D.; KREIDER, J. L.; e YEATES, B. F. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, n. 4, p. 371- 372, 1983.

IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v.22, p.1687-1695, 2007.

JACOB, J. C. F.; HAAG, K. T.; SANTOS, G. O.; OLIVEIRA, J. P.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1159-66, 2012.

MAIA, V.N. **Avaliação da vascularização e da angiogênese de corpos lúteos de éguas com ovulação natural e induzida por acetato de deslorelina**. 2015. 67f. Tese (Doutorado em Ciência Animal Tropical) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE

MCCUE, P.; SCOGGIN, C.; LINDHOLM, A. Estrus. In: McKinnon, A. O.; Squires, E. L.; Vaala, W. E.; Varner, D. D. **Equine reproduction**, 2ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2011, p. 1716–27.

MEDEIROS, M. C. R.; FARINASSO, A.; NERY, I. H. A. V.; SOUZA, H. M.; VASCONCELOS, J. L. A.; TRINDADE, K. L. G.; BATISTA, A. M.; MANSO FILHO, H. C.; CARNEIRO, G. F.; WISCHRAL, A. Estudo da vascularização folicular e do corpo lúteo de éguas cíclicas tratadas com extrato de pituitária equina utilizando ultrassom Doppler colorido. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, p. 1089-1096, 2017.

MOROTTI, F.; MORETTI, R.; DOS SANTOS, C.M.G.; CRISTINA SILVA-SANTOS, K.; RAMOS CERQUEIRA, P.H.; SENEDA, M. M.; Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. **Theriogenology**, v.188, p.170-177, 2018.

MOSSA, F.; WALSH, S.W.; BUTLER, S.T.; BERRY, D.P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J.; EVANS, A.C.O. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.2355-2361, 2012.

OBERHAUS, E. L. e PACCAMONTI, D. Review of Management of Anestrus and Transitional Mares. **Reproductive Endocrinology**, v. 59, p. 325-330, 2013.

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.

PIMENTEL, M. M. L.; SANTOS, F. A. dos; DIAS, R. V. C.; MACÊDO, L. B. de; FONSECA, Z. A. A. de S.; ANDRÉ, W. P. P.; RIBEIRO, W. L. C. Monitoramento do ciclo estral de fêmeas equinas por meio de citologia vaginal, ultrassonografia e dosagem hormonal. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, n. 1, p. 69-75, 2014.

SALES, F. A. B. M.; AZEVEDO, M. V.; SOUZA, N. M.; FERREIRA-SILVA, J. C.; CHAVES, M. S.; RIBERIO JUNIOR, V.; ROCHA, J. M.; SANTOS FILHO, J. P.; FREITAS, V. J. F. E OLIVEIRA, M. A. L. Correlations of corpus luteum blood flow with fertility and progesterone in embryo recipient mares. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, p. 280, 2021.

SILVA, M. F. et al. Estimativa da idade dos equinos através do exame dentário. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, n. 547, p. 103-110, 2003.

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; KOETZ JÚNIOR, C.; MOROTTI, F.; SILOTO, L.S.; MARCANTONIO, T.N.; URBANO, M.R.; OLIVEIRA, R.L.; LIMA, D.C.M.; SENEDA, M.M. Antral follicle populations and embryo production - *in vitro* and *in vivo* - of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.228-32, 2014.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Receptoras de alta CFA utilizadas durante o anestro estacional apresentaram a menor taxa de concepção em relação aos demais grupos
- Éguas consideradas em anestro desenvolveram maior grau de edema endometrial em relação às cíclicas
- Não houve interação entre CFA e ciclicidade
- Não houve influência da estação do ano sobre a CFA, taxa de concepção e edema uterino