

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**BRUNA LAMPE ZIELINSKI**

**DOIS PROTOCOLOS HORMONAIIS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM  
TEMPO FIXO EM ÉGUAS**

(Two hormonal protocols for timed artificial insemination in mares)

**CURITIBA**

**2020**

**BRUNA LAMPE ZIELINSKI**

**DOIS PROTOCOLOS HORMONAIS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM  
TEMPO FIXO EM ÉGUAS**

(Two hormonal protocols for timed artificial insemination in mares)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Biotecnologia, Produção e Reprodução Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Luiz Ernandes Kozicki  
Coorientador: Carlos Eduardo Camargo

**CURITIBA**

**2020**



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Escola de Ciências da Vida  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

ATA Nº 145 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA BRUNA LAMPE ZIELINSKI

Aos vinte dias do mês de março do ano de dois mil e vinte, às 13:30 horas, realizou-se na sala de pós 8, bloco amarelo, Escola de Ciências da Vida, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa da dissertação da mestrande Bruna Lampe Zielinski, intitulada: “**DOIS PROTOCOLOS HORMONAIS PARA A SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO VISANDO À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL PRÉ-FIXADA EM ÉGUAS ASSOCIANDO-SE PROGESTERONA INTRAVAGINAL E HISTRELINA**”. A mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pela Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Luiz Ernandes Kozicki (PUCPR), auxiliada pelos Professores Doutores Leandro Batista Costa (PUCPR) e Julio Cesar Ferraz Jacob (UFRRJ). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada APROVADA.

Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki (Presidente)

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Leandro Batista Costa (PUCPR)

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Julio Cesar Ferraz Jacob (UFRRJ)

Assinatura \_\_\_\_\_

Escola de Ciências da Vida – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal  
Rua Imaculada Conceição, 1155 – Bairro Prado Velho – CEP: 80215-901 - Curitiba, PR - Brasil  
Tel (41) 3271-2615

Email: [ppgca@pucpr.br](mailto:ppgca@pucpr.br) [www.pucpr.br/ppgca](http://www.pucpr.br/ppgca)



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Escola de Ciências da Vida  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Proclamado o resultado, a Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Aline Francielle Bueno Rétzlaff, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 20 de março de 2020.

---

**Aline Francielle Bueno Rétzlaff**  
Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

---

**Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>vii</b>
AGRADECIMENTOS .....	viii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	ix
RESUMO GERAL .....	x
ABSTRACT .....	xii
CAPÍTULO 1 .....	1
1. Introdução e contextualização .....	1
2. Objetivos.....	5
2.1 Objetivos específicos.....	5
3. Hipóteses.....	6
CAPÍTULO 2 .....	7
DOIS PROTOCOLOS HORMONAIS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM ÉGUAS .....	7
Resumo .....	7
1. Introdução.....	8
2. Material e Métodos .....	10
2.1. Local e Animais.....	10
2.2. Delineamento experimental .....	11
2.3. Coleta e manipulação do sêmen .....	14
2.4. Coleta de embrião .....	14
2.5. Análise estatística .....	15
3. Resultados e Discussão .....	15
4. Conclusões .....	22
5. Agradecimentos.....	22
6. Referências.....	22
CAPÍTULO 3 .....	29
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	29
REFERÊNCIAS.....	30
ANEXOS .....	33

1. Normas para submissão do artigo científico no periódico Theriogenology (Guide for Authors).....	33
2. Parecer de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - PUCPR) .....	39

Dedico este trabalho aos cavalos, únicos seres capazes de provocar tal paixão que será absolutamente indomável. “Deus impeça que eu vá para algum céu onde não haja cavalos”.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me guiar ao longo deste caminho, me abençoando com coragem, força e resiliência para alcançar este propósito.

À minha família que sempre me apoiou neste sonho, a Medicina Veterinária, pela motivação, amor, carinho, dedicação e por acreditarem em mim. Vocês são essenciais em minha vida, sem vocês eu não seria quem sou hoje.

Ao meu marido Adão, que me inspira a conquistar meus sonhos, por me apoiar e aconselhar em todas as horas, no Brasil ou na Colômbia. Agradeço a Deus por ter te colocado em minha vida, minha luz que me traz paz.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela excelente estrutura e orientação. Agradecimento especial aos professores Dr. Luiz Ernandes Kozicki e Dr. Carlos Eduardo Camargo (Kadu) por me transmitirem tanto conhecimento e experiência de vida.

Aos cavalos da Fazenda Experimental Gralha Azul (FEGA) por me permitirem estudar e aprimorar minhas habilidades na reprodução equina, aos patrocinadores que cederam gentilmente os materiais para realização do projeto, aos alunos do Grupo de Estudos em Reprodução Equina (GERE) e ao residente Gilson, por me acolherem no time e compartilharem as tardes e finais de semana na fazenda.

A todos os amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!



## **FORMATO DA DISSERTAÇÃO**

A presente dissertação é composta por três capítulos. O capítulo um apresenta uma introdução geral, a contextualização do tema e os objetivos de estudo. O capítulo dois trata-se de artigo científico completo, contendo referências, e formatado nas normas da revista para o qual será submetido (Theriogenology). O capítulo três finaliza esta dissertação com conclusões gerais e considerações finais deste trabalho e sugestões para estudos futuros. As referências do capítulo um encontram-se ao final da dissertação.

## RESUMO GERAL

O uso da inseminação artificial (IA) como biotécnica reprodutiva possibilita diversas vantagens em programas de reprodução animal. A administração de protocolos hormonais e o uso de dispositivos intravaginais de progesterona (DIP<sub>4</sub>) com vistas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é difundida para ruminantes, porém pouco estudada em equinos. Este estudo objetivou testar dois protocolos de IATF em equinos, verificando sua eficácia com base na taxa de recuperação embrionária (TRE) comparada ao método convencional de IA nesta espécie. Para isto, 11 éguas sem raça definida foram avaliadas durante duas estações reprodutivas (2018/2019 e 2019/2020). O estudo foi executado em três grupos, sendo que cada grupo foi composto por 17 repetições utilizando três ciclos estrais diferentes de cada animal, em um delineamento do tipo crossover, sendo 11 animais no primeiro ano, e repetição de 6 animais no segundo ano. O dia zero (D0) foi definido como o dia da inseminação para todos os grupos. No grupo controle (GC) (n=17) foi feito o acompanhamento folicular convencional por palpação retal e ultrassonografia dos ovários + indução da ovulação sob a presença de folículos  $\geq 35$ mm, com edema uterino grau 3 e abertura de cérvix; IA com sêmen fresco após 24h da indução da ovulação e coleta do embrião após oito dias da ovulação. O grupo progesterona removida com 9 dias (GP<sub>4</sub>9) (n=17) recebeu no início do protocolo (D-14) um dispositivo intravaginal de progesterona (DIP<sub>4</sub>) + exame de ultrassonografia (US); após nove dias (D-5) houve a remoção do DIP<sub>4</sub> + 75 µg de prostaglandina (PGF<sub>2</sub>α) (IM) + US; no 13º dia (D-1) foi administrada a histrelina para indução da ovulação + US; após 24h (D0) a IATF foi realizada com sêmen fresco + US; nove dias após a IATF (D9) houve a coleta de embrião. O grupo progesterona removida com 11 dias (GP<sub>4</sub>11) (n=17) recebeu o mesmo protocolo, exceto pela manutenção do DIP<sub>4</sub> por 11 dias. A responsividade (presença de folículo pré-ovulatório no dia da indução da ovulação) ao protocolo GP<sub>4</sub>9 foi de 58,8%; e ao GP<sub>4</sub>11 foi de 41,1%. As TREs resultaram em 52,94%, 29,41% e 17,64% para os GC, GP<sub>4</sub>9 e GP<sub>4</sub>11 respectivamente. Verificou-se diferença entre o GC versus GP<sub>4</sub>11 (P<0,05), porém não entre GC vs. GP<sub>4</sub>9 e GP<sub>4</sub>9 vs. GP<sub>4</sub>11. Concluiu-se que o protocolo hormonal GP<sub>4</sub>9 proposto para IATF em equinos foi eficaz quanto à TRE; os

protocolos para a IATF deram indicações positivas aos seus empregos, sinalizando a não-necessidade do controle folicular assistido, bem como à redução dos manejos reprodutivos diários, necessitando de estudos futuros para comprovação de sua eficácia.

**Palavras-chave:** Dispositivo intravaginal de progesterona, equinos, IATF, sincronização, transferência de embrião.

## ABSTRACT

Artificial insemination (AI), as a reproductive biotechnology, provides several advantages in animal breeding programs. Timed artificial insemination (TAI) hormonal protocols and intravaginal progesterone devices (IP<sub>4</sub>D) are widespread for ruminants, but little is known in horses. This study aimed to test two TAI protocols in horses, checking its availability based on embryo recovery rate (ERR), versus conventional AI method. Eleven mixed-breed mares were evaluated during two breeding seasons (2018/2019 and 2019/2020). The study was carried out in three groups, each group consisting of 17 repetitions using three different estrous cycles of each animal, in a crossover design, with 11 animals in the first year, and repetition of 6 animals in the second year. Day zero (D0) was defined as the day of insemination for all groups. In the control group (CG) (n=17) follicular development was conventionally checked by rectal palpation and ovary ultrasonography + ovulation induction when follicle  $\geq$  35mm, grade 3 uterine edema and cervical opening; AI with fresh semen after 24h of induction; and embryo collection eight days after ovulation. The progesterone group removed with 9 days (GP<sub>4</sub>9) (n=17) received an intravaginal progesterone device (IP<sub>4</sub>D) on the first day of protocol (D-14) + ultrasonography examination (US); after nine days (D-5) IP<sub>4</sub>D was removed + 75 $\mu$ g prostaglandin (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) (IM) + US; on the 13<sup>th</sup> day (D-1), histrelin was administered to induce ovulation + US; TAI with fresh semen was performed in 24h (D0) + US; and nine days after TAI (D9), embryo collection was done. The same protocol was administered to progesterone group removed with 11 days (GP<sub>4</sub>11) (n=17), except for device removal at the 11<sup>th</sup> day. Responsiveness for GP<sub>4</sub>9 protocol was 58.8% (presence of a pre-ovulatory follicle on the day of ovulation induction; and for GP<sub>4</sub>11 protocol was 41.1%. The ERR resulted in 52.94%, 29.41% and 17.64% for CG, GP<sub>4</sub>9 and GP<sub>4</sub>11, respectively. There was statistical significance between CG and GP<sub>4</sub>11 (P<0.05), but not between CG vs. GP<sub>4</sub>9 and GP<sub>4</sub>9 vs. GP<sub>4</sub>11. In conclusion, GP<sub>4</sub>9 protocol proposed for TAI in horses showed availability in terms of ERR; TAI protocols gave positive indication for their use, denoting non-need of follicular control, as well as handling reduction, requiring future studies of efficiency evaluation.

**Keywords:** Intravaginal progesterone device, equine, TAI, synchronization, embryo transfer.

# CAPÍTULO 1

## 1. Introdução e contextualização

No contexto da produção animal, a equideocultura tem se destacado em todo o mundo. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017), demonstraram um total efetivo de mais de 5 milhões de equinos no Brasil (4º maior rebanho mundial), com a predominância das raças Mangalarga Marchador, Nordestino, Quarto de Milha e Crioulo. Atualmente, o complexo do agronegócio do cavalo movimentava mais de 16 bilhões de reais por ano, e emprega cerca de três milhões de pessoas direta e indiretamente. A dinâmica da produção de equinos vem se alterando ao longo dos anos, sendo a criação voltada principalmente para o público urbano (esporte e lazer), que, ao contrário dos animais de trabalho, requerem maiores cuidados e gastos. Com isso, crescem também as indústrias de medicamentos veterinários, rações e acessórios, assim como o número e o tamanho dos eventos equestres e os haras de cria e recria (Lima e Cintra, 2016).

As biotecnologias reprodutivas são uma importante ferramenta a serviço da equideocultura mundial, sendo grande responsável por acelerar o processo de melhoramento genético. Atualmente, as biotécnicas mais empregadas na espécie equina são a inseminação artificial (IA) e a transferência de embrião (TE), por demonstrarem maior viabilidade econômica e facilidade de implantação entre as espécies domésticas, devido ao alto valor agregado ao produto (Bortot e Zappa, 2013).

A IA é a biotécnica reprodutiva mais utilizada para o melhoramento genético animal. Teve início em meados dos anos 1900, sendo o sêmen coletado em preservativos feitos de bexiga suína e depositado no útero da égua, com taxa de prenhez de 50% (Sand, 1903). Suas aplicações vão além de otimizar o sêmen do garanhão distribuindo-o em várias doses, permitindo a IA de diversas éguas com um mesmo ejaculado. A técnica também possibilita a redução da transmissão de doenças e o transporte do sêmen para qualquer lugar, melhorando a utilização de animais geneticamente superiores (Pickett e Amann, 1993).

A IA é amplamente praticada em equinos em todo o mundo, e pode ser realizada de maneiras diferentes de acordo com o processamento do sêmen: in natura (fresco), refrigerado ou congelado. Os fatores a serem considerados para a escolha do método a ser empregado dependem da localização da propriedade (égua versus garanhão), o momento da inseminação (pré ou pós ovulação), características e qualidade do ejaculado (volume, concentração, motilidade), raça e valor do sêmen (Canisso et al., 2008).

Quanto às técnicas de coleta de sêmen, a utilização de vagina artificial é a mais comum, pois simula as condições anatômicas da égua e permite a expressão do comportamento fisiológico do macho. A técnica mais utilizada é a monta em um manequim artificial, ou em égua no cio contida, sendo que o manequim é a forma mais segura. Após a monta, o pênis é desviado para a vagina artificial e assim é realizada a coleta (Bortot e Zappa, 2013).

Após a coleta, o sêmen deve ser mensurado quanto ao volume (entre 25 e 80 mL) e avaliada a sua coloração (branca acinzentada). Em seguida, passa por uma avaliação microscópica onde são mensuradas as características de motilidade total e progressiva (0 - 100%) e vigor espermático (1 a 5). Os parâmetros fisiológicos para estas características são 40 a 80% para motilidade total, 35 a 75% para motilidade progressiva e vigor 3. A concentração espermática seminal deve ser avaliada a partir de uma amostra do sêmen diluída e contada em Câmara de Neubauer, e varia de 50 a 400 milhões de espermatozoides por mL de ejaculado para a maioria dos garanhões (Canisso et al., 2008).

A IA, apesar de ser uma técnica comum aos profissionais, possui fatores que limitam o seu emprego, como a observação de animais em estro duas vezes ao dia (bovinos), ou do controle folicular com ultrassom via transretal a cada 24-48 horas (equinos), aumentando em muito os trabalhos técnicos dos profissionais. Nesse contexto, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) vem celeremente ganhando espaço e importância. O resultado do emprego da IATF em bovinos não difere dos percentuais obtidos pela técnica de IA, sendo vantajosa como ferramenta viável de redução de manejo, eliminando a observação de estro em grandes rebanhos, aumentando o número de animais inseminados e

apresentando taxa de prenhez satisfatória, vindo a substituir a inseminação artificial convencional (Ferreira et al., 2012).

Em relação à espécie equina, não existem dados na literatura abordando a utilização de protocolos hormonais para IATF. Por isto, os protocolos em desenvolvimento baseiam-se nos atualmente aplicados para ruminantes. Em função das particularidades que a reprodução equina exige, a IATF se apresenta como uma biotecnologia desafiadora e inovadora, uma vez que irá interferir na prática reprodutiva atual, onde a IA é processada estando o animal com folículos pré-ovulatórios > 35 mm de diâmetro. Para isso, há necessidade de o profissional executar um controle folicular assistido por exames ultrassonográficos (Davies Morel et al., 2010). Por outro lado, mediante a IATF, o controle folicular pode até ser dispensado em função da aplicação de protocolo hormonal, uma vez estabelecido o dia e hora para execução da inseminação pré-fixada.

As vantagens da aplicação da IATF em equinos baseiam-se na otimização da mão de obra e deslocamento do médico veterinário aos haras que possuem um vasto rebanho, em raças de menor valor agregado, e que praticam a IA com sêmen fresco ou refrigerado, diminuindo custos com a aplicação do protocolo devido ao menor número de visitas à propriedade. A maior parcela de equinos no Brasil compreende raças como Mangalarga Marchador, Nordestino, Quarto de Milha e Crioulo, sendo um nicho de mercado para a aplicação da IATF em grandes haras.

O conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva e a dinâmica endócrina do ciclo estral permitiu a elaboração de protocolos hormonais para manejo reprodutivo em ruminantes, viabilizando o controle e encurtamento do estro, com o objetivo de concentrar as inseminações, partições e desmames na mesma época, reduzindo o manejo da propriedade (Souza, 2013). O protocolo em si deve ser baseado em um tratamento hormonal que sincronize a emergência de ondas foliculares, proporcionando um folículo dominante e a sincronização da ovulação, visando a realização da IATF com elevados índices reprodutivos (Almeida et al., 2001).

O uso de dispositivos intravaginais com progesterona (DIP<sub>4</sub>), associados à administração de benzoato de estradiol (BE), inclui-se na composição da



maioria dos protocolos para a IATF e transferência de embriões (TE) utilizados para fêmeas bovinas e ovinas. Esta associação promove a supressão temporária e atresia do crescimento folicular independentemente da fase do ciclo estral, através do feedback negativo sobre o hormônio folículo estimulante (FSH). Uma vez que o estrógeno é metabolizado, cerca de 3,5 a 4 dias após sua aplicação, há o surgimento de uma nova onda folicular. Após a retirada da P<sub>4</sub> é administrada uma dose de prostaglandina (PGF<sub>2</sub>α) visando assegurar a luteólise de qualquer corpo lúteo remanescente. Uma segunda dose de estrógeno ou Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) é administrada 24h após para sincronizar a ovulação, executando-se a IATF após mais 24h (Bó et al., 2002; Souza, 2013).

Os estudos que abordam a utilização de dispositivos intravaginais de P<sub>4</sub> em equinos tem como objetivo a sincronização da primeira ovulação do ano na fase transicional do início da estação de monta, porém não antecipando o início da estação. Não devem ser escolhidas éguas em anestro com ovários inativos, mas sim éguas com múltiplos folículos pequenos, pois quanto mais avançado o período transicional, maior a probabilidade de ovulação após o tratamento (McKinnon, 2009). Suspeita-se que na fase transicional, a progesterona seja foliculogênica. O DIP<sub>4</sub> permite que um novo folículo se desenvolva após 10 dias de tratamento, atingindo 35 mm (Samper et al., 2007).

Alguns estudos vêm testando a sincronização do estro em equinos através do uso de implantes de liberação prolongada de P<sub>4</sub>, porém sem enfoque à IATF. Handler et al. (2006) utilizaram implantes de progesterona (PRID®) durante 11 dias para sincronização do estro em 8 éguas, em diferentes estações do ano. Os resultados de sincronização foram satisfatórios, porém no período de anestro o dispositivo não foi capaz de promover atividade ovariana e ovulação.

Carmo et al. (2009) utilizaram implantes intravaginais de P<sub>4</sub> durante 10 dias em éguas no período de transição de primavera, com ovulação após em média 6 dias da retirada do implante. Hanlon et al. (2010) testaram o uso do dispositivo intravaginal também por 10 dias em éguas em transição, e obtiveram 100% das éguas ovulando cerca de 3 dias após a retirada do implante. Oliveira Filho et al. (2012) obtiveram 80% de eficácia na ciclicidade das éguas com o uso do implante por 10 dias, sendo que a maioria das éguas apresentou folículos de 35mm após 3,8 dias e a ovulação ocorreu após 7,8 dias da retirada do implante.

Nota-se nestes estudos que não há perspectiva de sincronização do estro com vistas à IATF, assim como a variação no tempo de permanência do DIP<sub>4</sub> (10 ou 11 dias) e na estacionalidade, sendo que os protocolos de sincronização mais eficientes foram realizados com éguas em transição no início da estação reprodutiva, devido a menor concentração de hormônios endógenos nesta fase (McCue et al., 2001).

Em relação à sincronização da ovulação como parte importante do processo da IATF, alguns hormônios podem ser utilizados a fim de induzir e estimar o tempo até a ovulação em éguas. A gonadotrofina coriônica humana (hCG), por possuir ação semelhante ao LH, é eficaz em induzir a ovulação em éguas dentro de 48h (Silva et al., 2016). Contudo, agonistas do fator liberador de gonadotrofinas (GnRH) - como a Deslorelina ou a Histrelina - são eficazes em aumentar a secreção de LH e induzir a ovulação no período de 36 a 48h, sendo que a Histrelina é o análogo sintético atual mais potente (Hemberg et al., 2006; Voge et al., 2012).

## **2. Objetivos**

Desenvolver e avaliar a eficiência de protocolos para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em equinos, com destaque ao uso de dispositivo intravaginal de progesterona, sem a necessidade de executar controle folicular assistido.

### **2.1 Objetivos específicos**

Estabelecer um protocolo hormonal eficaz para sincronização do estro e da ovulação com implante vaginal de progesterona sem controle folicular em éguas;

Testar a permanência do dispositivo intravaginal de progesterona por um período menor do que o relatado na literatura para sincronização do estro;

Avaliar a taxa de recuperação embrionária e comparar a eficiência da inseminação artificial em tempo fixo com sêmen fresco em dois protocolos;

Comparar os resultados entre os grupos testados e o grupo controle convencional.

## **3. Hipóteses**

O protocolo de inovação de inseminação artificial em tempo fixo na espécie equina mantém a eficiência reprodutiva comparada às técnicas de inseminação convencionais.

O protocolo de inovação de inseminação artificial em tempo fixo na espécie equina apresenta boa eficiência reprodutiva, reduzindo custos com deslocamento e mão de obra, resultando em menos visitas à propriedade e com resultado similar quanto à TRE.

O protocolo de IATF em éguas com a utilização de implante de progesterona durante nove dias é mais eficaz comparado ao seu uso por onze dias.

Com a aplicação do protocolo não há necessidade de se executar um controle folicular assistido, uma vez que já pode ser determinado o dia e hora da IATF.

## **CAPÍTULO 2**

(Artigo científico a ser submetido para publicação no periódico  
“Theriogenology” - Anexo 1)

### **DOIS PROTOCOLOS HORMONAIS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM ÉGUAS**

(Two hormonal protocols for timed artificial insemination in mares)

Bruna Lampe Zielinski – Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, Curitiba, Brasil.

**Resumo** - O estudo objetivou testar dois protocolos para a sincronização do estro e da ovulação com vistas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e taxa de recuperação embrionária (TRE) em equinos. Onze éguas mestiças foram avaliadas em três grupos, em três ciclos estrais diferentes, durante duas estações reprodutivas, totalizando 17 ciclos acompanhados. O dia zero (D0) foi definido como o dia da inseminação para todos os grupos. No grupo controle (GC) (n=17) foi feito o acompanhamento folicular convencional diário por palpação retal e exames de ultrassonografia dos ovários + indução da ovulação (histrelina 500 µg, IM) quando folículos  $\geq 35$ mm estivessem presentes + edema uterino grau 3 e abertura de cérvix. A IA foi feita 24h após a administração do indutor da ovulação e a coleta do embrião foi executada oito dias após a ovulação. O grupo progesterona intravaginal por 9 dias (GP<sub>49</sub>; n=17) recebeu no início do protocolo (dia menos 14 = D-14) um dispositivo intravaginal com P4 (DIP<sub>4</sub>) + exame de ultrassonografia dos ovários (US); no D-5 houve a remoção do DIP<sub>4</sub> + administração de 75 µg de prostaglandina (PGF<sub>2</sub>α; IM) + US; no D-1 foi aplicado 500 µg (IM) de histrelina (indutor da ovulação); após 24h (D0) foi executada a IATF com sêmen fresco ( $250 \times 10^6$  espermatozoides) + US; nove dias após a IATF (D9) procedeu-se a coleta de embrião via transcervical; o grupo progesterona 11 dias (GP<sub>411</sub>) (n=17) recebeu o mesmo protocolo, exceto a manutenção do dispositivo intravaginal por 11 dias. A responsividade (presença de folículo pré-ovulatório no dia da indução da ovulação) ao protocolo GP<sub>49</sub> foi de 58,8%; e ao GP<sub>411</sub> foi de 41,1%, não havendo diferença estatística. As TREs resultaram em 52,94%, 29,41% e 17,64% para os GC, GP<sub>49</sub> e GP<sub>411</sub> respectivamente. Verificou-se diferença entre o GC vs. GP<sub>411</sub> (P<0,05), porém não entre GC vs. GP<sub>49</sub> e GP<sub>49</sub> vs. GP<sub>411</sub>. Concluiu-se que o protocolo de progesterona intravaginal por nove dias e administração de histrelina quatro dias após, mostrou-se eficaz quanto à taxa de recuperação embrionária pós IATF; o dispositivo intravaginal com progesterona por nove dias mais histrelina pode ser empregado, dispensando o controle folicular diário convencional; o protocolo

reduziu a quantidade de manejos dos animais bem como a quantidade de deslocamentos dos profissionais às propriedades.

**Palavras-chave:** Progesterona. Histrelina. Equinos. IATF. Sincronização da ovulação. Transferência de embrião.

## 1. Introdução

A inseminação artificial (IA) convencional nos equinos detém fatores limitantes ao seu emprego, destacando-se o controle folicular a cada 24-48 horas. Nesse contexto, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) gradativamente assume espaço e importância, como já verificado em bovinos, substituindo a IA convencional (Ferreira et al., 2012; Avanzi et al., 2015). O uso da IATF reduz o número de manejos dos animais, elimina a observação de estro, aumenta o número de animais inseminados, e concentra os partos (Ferreira et al., 2012).

A IA pode ser executada quando a égua detiver folículos pré-ovulatórios maiores que 35mm de diâmetro, abertura cervical e edema uterino (Davies Morel et al., 2010). Por outro lado, o controle folicular pode ser reduzido em função da administração de protocolos hormonais, uma vez estabelecido o dia e a hora da IATF.

O tema “inseminação artificial em tempo fixo” em equinos é escassamente abordado na literatura, e até mesmo é evitado pelos profissionais da área. Estudos tratam da sincronização da ovulação e IATF com sêmen congelado, porém pouco é reportado sobre os protocolos hormonais (Almeida et al., 2001; Avanzi et al., 2015).

A adoção de protocolos hormonais para esta finalidade ainda é pouco disseminada, pois o monitoramento convencional diário da dinâmica folicular, manteve-se eficiente, apesar da necessidade de muitos exames transretais (McKinnon et al., 2011; Bortot e Zappa, 2013), associados ao número de deslocamentos dos profissionais, acarretando custos adicionais consideráveis.

O protocolo à IATF deve ser baseado na sincronização da onda folicular, proporcionando um folículo dominante, e na sincronização da ovulação (Bó et al., 2016). O uso de dispositivos intravaginais com progesterona (DIP<sub>4</sub>),

associados à administração de benzoato de estradiol (BE), compõe a maioria dos protocolos de IATF em vacas e ovelhas. Esta associação promove a supressão temporária e atresia do crescimento folicular, independentemente da fase do ciclo estral, através do feedback negativo sobre o hormônio folículo estimulante (FSH). Cerca de 3,5 a 5 dias após a aplicação do BE há o surgimento de uma nova onda folicular (Moreno et al., 2001; Bó et al., 2002).

Os DIP<sub>4</sub>s em equinos foram utilizados na fase de anestro (Polo et al., 2016) ou na fase transicional do início da estação de monta, visando sincronizar a primeira ovulação, antecipando o início da estação (Wilde et al., 2002; Handler et al., 2007; Hanlon e Firth, 2012).

Oliveira Filho et al. (2012) obtiveram 80% de ciclicidade das éguas com o uso do DIP<sub>4</sub> por 10 dias, apresentando as éguas folículos de 35mm após 3,8 dias e a ovulação após 7,8 dias da retirada.

Em relação à sincronização da ovulação, vários fármacos são utilizados, avaliando-se o tempo (horas) entre a administração do indutor e a ovulação, fundamental para o sucesso dos programas de IATF. A hCG é eficaz em induzir a ovulação em éguas até 48h (Silva et al., 2016). Contudo, agonistas do GnRH (deslorelina e histrelina), tem indicação de eficácia pelo aumento da liberação de LH com indução da ovulação no período de 36 a 48h, destacando-se a histrelina como o análogo sintético atual mais potente (Lindholm et al., 2011; Voge et al., 2012). O uso de 0,5 ou 0,25 mg de histrelina é capaz de induzir a ovulação dentro de 48 horas pós administração na temporada reprodutiva em éguas, atingindo 96% de eficácia (Kiser et al., 2013).

Assim, o emprego de DIP<sub>4</sub> por 10 dias apresenta variados resultados. A hipótese do presente estudo é avaliar a permanência do DIP<sub>4</sub> por nove e onze dias e checar os resultados advindos deste procedimento, na premissa de que por nove dias haverá aumento na eficiência reprodutiva em relação a onze.

O objetivo deste estudo foi testar a eficiência de dois diferentes protocolos hormonais para a sincronização do estro e da ovulação com vistas à IATF em éguas, utilizando-se o dispositivo intravaginal de progesterona por nove ou onze dias associado à indução da ovulação com histrelina, e comparar as taxas de recuperação embrionária (TRE) entre os grupos.

## **2. Material e Métodos**

O projeto de pesquisa foi aprovado junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob o número 01263 (Anexo 2).

### **2.1. Local e animais**

O estudo foi realizado na Fazenda Experimental Galha Azul da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), tendo as coordenadas geográficas 25° 25' 40" S, 49° 16' 23" W, durante as estações reprodutivas 2018-2019 e 2019-2020 no hemisfério sul (Setembro a Fevereiro). Foram utilizadas 11 éguas mestiças (raças Crioula, Árabe, Quarto de Milha e Mangalarga) sem propósitos comerciais, e um garanhão mestiço (Lusitano e Bretão), idades entre 6 e 14 anos, peso médio  $425 \pm 75$  kg, escore de condição corporal (ECC) entre 3 e 4 [1-magra a 5-obesa (Speirs, 1997)], manejadas e alimentadas em piquetes com *Avena sativa*, *Lolium multiflorum*, *Medicago sativa* e 2kg de concentrado/animal/dia (PróEquinos Agraria®; Proteína bruta 12%, fibra bruta 12%, matéria mineral 14%, extrato etéreo 2,5%; Guarapuava, Paraná, Brasil), com água e sal mineral *ad libitum*.

Crítérios de inclusão dos animais: presença de corpo lúteo por avaliação com exames de ultrassonografia transretal (Ginther e Pierson, 1989) no início de cada estação reprodutiva e no início do estudo, para a comprovação da ciclicidade (Ginther et al., 2005). O critério de exclusão foi a incompatibilidade reprodutiva da anatomia da cérvix ou éguas em período transicional de primavera no mês de setembro, com ausência de corpo lúteo, folículo dominante ou edema uterino (Cerqueira et al., 2019).

### **2.2. Delineamento experimental**

O experimento foi executado com três grupos, sendo um grupo controle (GC), um com a permanência de progesterona intravaginal durante 9 dias (GP<sub>49</sub>), e um com progesterona intravaginal durante 11 dias (GP<sub>411</sub>). Cada grupo foi composto por 17 repetições (ciclos estrais), utilizando três ciclos estrais diferentes de cada animal, em um delineamento do tipo crossover, sendo 11 ciclos no primeiro ano, e 6 ciclos no segundo ano. O dia zero (D0) foi definido como o dia da inseminação para todos os grupos.

No grupo controle (GC) (n=17) foi feito o acompanhamento folicular convencional por palpação retal e exames ultrassonográficos dos ovários (US), cuja duração foi variável dependendo do animal (Pimentel et al., 2014). À observação de corpo lúteo, foi administrada uma dose de prostaglandina (D-Cloprostenol 75µg IM, Croniben, Biogénesis Bagó) para indução de luteólise e início de um novo ciclo. Na presença de folículos maiores que 35mm + edema uterino 3 + abertura de cérvix, detectados por palpação e US retal, foi induzida a ovulação com histrelina (500 µg IM, Strelin, Botupharma, Botucatu, São Paulo); este dia foi considerado como D-1. Uma IA com sêmen fresco foi realizada após 24h (D0) da indução da ovulação. A confirmação da ovulação foi feita após 24h da IA (D1). A coleta do embrião (CE) foi realizada após oito dias da ovulação (D9) (Figura 1A).

O grupo progesterona 9 dias (GP<sub>4</sub>9) (n=17) recebeu no D-14 um dispositivo intravaginal com progesterona de liberação controlada (1g P<sub>4</sub>, Biogénesis Bagó), além de US; após nove dias (D-5) o DIP<sub>4</sub> foi retirado e administrada PGF<sub>2</sub>α (D-Cloprostenol 75µg IM, Croniben, Biogénesis Bagó) + US; após quatro dias (D-1) foi administrada a histrelina (500 µg IM, Strelin, Botupharma, Botucatu, São Paulo) para indução da ovulação + US; a IATF foi realizada após 24h com sêmen fresco (D0) + US, sendo a coleta de embrião realizada nove dias após (D9) (Figura 1B).

O grupo progesterona 11 dias (GP<sub>4</sub>11) (n=17) recebeu no D-16 um dispositivo intravaginal com progesterona de liberação controlada (1g P<sub>4</sub>, Biogénesis Bagó), além de US; após 11 dias (D-5) o DIP<sub>4</sub> foi retirado e administrada PGF<sub>2</sub>α (D-Cloprostenol 75µg IM, Croniben, Biogénesis Bagó) + US; após quatro dias (D-1) foi administrada a histrelina (500 µg IM, Strelin, Botupharma, Botucatu, São Paulo) para indução da ovulação + US; a IATF foi realizada após 24h com sêmen fresco (D0) + US, sendo a coleta de embrião realizada nove dias após (D9) (Figura 1C).



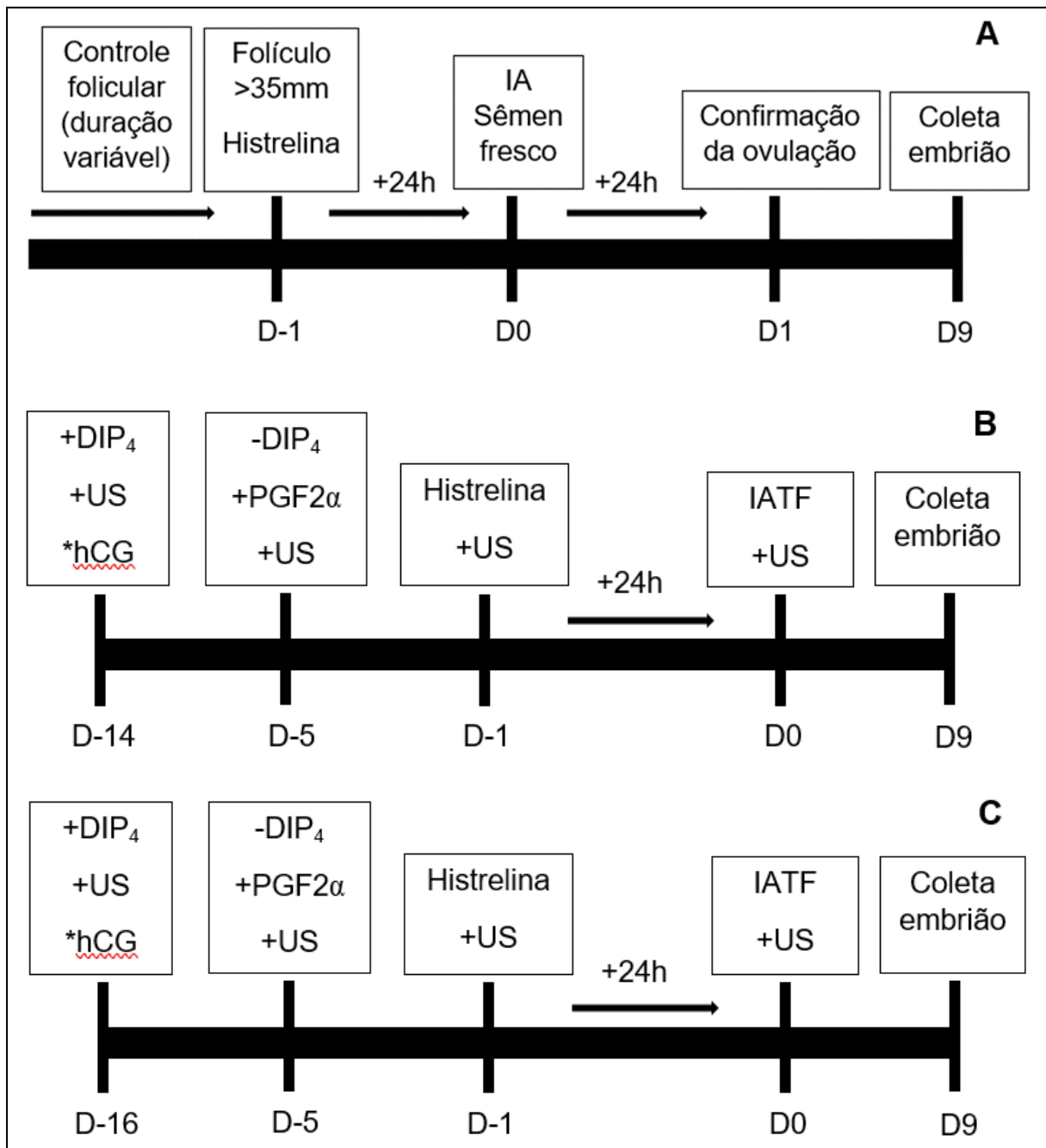


Figura 1 A, B, C – Diagramas dos protocolos para os grupos controle e experimentais de éguas GP49 e GP411, respectivamente.

Legenda: IA: inseminação artificial; US: Ultrassonografia; DIP<sub>4</sub>: Dispositivo intravaginal com progesterona de liberação controlada (1g P<sub>4</sub>, Biogénesis Bagó); PGF2α: D-Cloprostenol (75µg IM, Croniben, Biogénesis Bagó); Histrelina: acetato de histrelina (500µg IM, Strelin, Botupharma, Botucatu, São Paulo); \*hCG: Gonadotrofina Coriônica Humana (1250 UI IM, Vetecor, Hertape Calier) somente nas éguas que apresentavam folículo >33mm, edema uterino 3 e abertura cervical; IATF: Inseminação artificial em tempo fixo.

Nos dois grupos experimentais foi administrada uma dose de gonadotrofina coriônica humana (hCG, 1250 UI IM, Vetecor, Hertape Calier, São Paulo, Brasil) nas éguas que apresentavam folículo maior que 33mm, edema uterino grau 3 e abertura cervical no dia do início do protocolo, de modo a induzir a ovulação para gerar um novo ciclo na presença do dispositivo de P<sub>4</sub>.

Previamente à inserção do DIP<sub>4</sub>, era executado o borrifamento do mesmo com oxitetraciclina mais hidrocortisona (Terracam Spray®, Agener União, São Paulo, Brasil) e remoção do cordão extrator, de forma a evitar contato com o meio externo, evitando ou minimizando as vaginites. Os implantes eram introduzidos na vagina com a utilização de luvas descartáveis de palpação pelo manipulador.

Foram realizados exames de ultrassonografia transretais a cada 48h (SonoScapeA5v, transdutor retilíneo L561v 3 a 8 MHz, China), com o objetivo de avaliar o crescimento folicular no decurso dos protocolos, além dos dias de manejo. Os folículos foram dimensionados com base na média obtida entre os diâmetros da altura e largura foliculares (Ginther e Pierson, 1989).

Após o término de cada grupo (coletas de embrião) foi aplicada uma dose de prostaglandina F<sub>2α</sub> aguardando-se um intervalo de 7 dias antes do início do próximo grupo, visando dessincronizar as éguas entre os ciclos, de forma a não interferir nos resultados de sincronização de um grupo para outro. Desta forma, foram avaliadas as taxas de recuperação embrionária (TRE, %) em cada grupo para observar a eficiência de cada um dos protocolos, e a taxa de responsividade aos tratamentos (presença de folículo pré-ovulatório; Davies Morel et al., 2010) no momento da indução da ovulação (D-1). Foram consideradas ovulações antecipadas aquelas que ocorreram antes da indução da ovulação. Os animais foram pesados e avaliados quanto ao ECC em dois momentos dentro de cada grupo (no dia do início do protocolo e no dia da IATF), para avaliação da variação destes fatores sobre o resultado.

A ordem de submissão das éguas aos protocolos foi definida de forma aleatória. Os grupos foram trabalhados simultaneamente, sendo GP<sub>411</sub>, GP<sub>49</sub> e GC no primeiro ano e GP<sub>411</sub>, GC e GP<sub>49</sub> no segundo, durante três meses dentro da estação reprodutiva.

### **2.3. Coleta e manipulação do sêmen**

Para as coletas de sêmen foi utilizada uma égua no estro para estimulação do garanhão. Após a exposição e limpeza do pênis com água e compressas, o garanhão era conduzido até um manequim, onde, após o salto, o pênis era desviado lateralmente para a vagina artificial modelo Botucatu® (Botupharma, Botucatu, São Paulo), e o sêmen era obtido. O ejaculado era filtrado em filtro de nylon para separação da fração gel e, em seguida, analisado quanto à motilidade e vigor através de observação em microscópio ótico. A concentração espermática era feita em câmara de Neubauer e, em seguida, o sêmen era diluído na proporção de uma parte de sêmen para uma parte de diluente à base de leite desnatado (BotuSêmen®, Botupharma, Botucatu, São Paulo). A seguir o sêmen era centrifugado a 2200 rpm por 10 minutos e ressuspendido com 2mL de BotuSêmen® na concentração de 250 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva (Xavier et al., 2009), sendo depositados no corno uterino *ipsilateral* ao folículo pré-ovulatório mediante pipeta flexível de IA profunda equina Minitube® (Minitube do Brasil, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil).

### **2.4. Coleta de embrião**

Para a realização da coleta de embrião, o períneo da égua era previamente higienizado e a base da cauda recoberta com bandagem (faixa de algodão). Uma sonda estéril de silicone era manualmente introduzida através da cérvix para realização da lavagem uterina empregando quatro litros de solução ringer lactato (JP Indústria Farmacêutica, São Paulo, Brasil), aquecidos em banho-maria a 37°C. A recuperação do lavado era feita em copo coletor com filtro e analisado em microscópio estereoscópico modelo Leica Zoom 2000 (aumento 45x, Alemanha) para a procura do embrião. Os embriões recuperados foram submetidos ao processo de congelamento por vitrificação.

### **2.5. Análise estatística**

Os dados foram analisados mediante o software Statgraphics Centurion XVI, Virginia (USA). As diferenças entre os grupos para a taxa de recuperação embrionária foram calculadas mediante o teste exato de Fisher, assim como as diferenças entre as taxas de responsividade ao tratamento e ovulações antecipadas. Esse teste foi aplicado como alternativa ao teste de Qui<sup>2</sup>, pois foram

analisadas tabelas 2x2 e valores esperados inferiores a 5. O teste Exato de Fisher baseia-se no cálculo da distribuição de probabilidade das frequências da tabela, na situação com margens fixas (ou seja, uma distribuição de probabilidade hipergeométrica para a única frequência de valor livre - independente), pois a probabilidade de uma determinada distribuição das frequências é função de parâmetros de valor desconhecido (Fisher, 1934).

As diferenças entre os diâmetros foliculares médios entre os grupos experimentais no D-5 e D-1 foram testadas pelo teste t de Student, presumindo-se as variâncias não homogêneas (Meyer, 1983).

Para testar as influências de fatores como idade, grupo, escore corporal e peso versus taxa de recuperação embrionária foi empregada a regressão logística binária. Modelos lineares generalizados (MLG) são definidos por uma distribuição de probabilidade para a variável resposta Y pertencente à família exponencial, um conjunto de variáveis explicativas que podem ser numéricas ou categóricas e uma função de ligação. Na regressão logística binária, que é um dos casos dos MLG, a variável resposta do modelo tem distribuição de Bernoulli (ou Binomial) e a função de ligação é a função logística (McCullagh e Nelder, 1989).

Todas as variáveis consideraram-se significativas caso o valor de  $p < 0,05$ .

### **3. Resultados e Discussão**

Em função das particularidades do ciclo estral das éguas, tendo fisiologicamente um estro longo (praticamente um terço da duração do ciclo estral), a prática de IATF nesta espécie tem sido pouco difundida. O presente estudo configura-se como um dos primeiros estudos com o intuito de desenvolver e testar protocolos hormonais eficientes para IATF em éguas, visando reduzir o número de visitas às propriedades (redução de custos, redução de exames transretais) e promoção do bem-estar animal (diminuição de manejos).

Fatores como idade, peso e escore corporal das éguas podem influenciar o sucesso da recuperação embrionária (McCue, 2011; Zúccari et al., 2013; Araújo e Oliveira, 2018). Para avaliar a influência das variáveis grupo, idade, ECC e peso dos animais sobre a TRE, foram executados testes de regressão logística

binária. Os valores de P variaram de 0,106 e 0,469, indicando homogeneidade da amostra e que essas variáveis não exerceram influência sobre os resultados da TRE ( $P > 0,05$ ). As médias de peso (kg) para os grupos controle, GP<sub>49</sub> e GP<sub>411</sub> foram, respectivamente, 417,29, 433,73 e 434,55 e as médias de ECC (1-5) foram 3,29, 3,30 e 3,29, respectivamente. Ambos os parâmetros não apresentaram diferença entre os grupos. A média de idade das éguas foi de 10,35 anos.

A tabela 1 representa a dinâmica folicular dos grupos nos dias de manejo, a porcentagem de responsividade das éguas a cada tratamento e a taxa de recuperação embrionária (TRE).

Grupo	Diâmetro do > foliculo durante o protocolo (x±s) mm			Ø FPO (x±s) mm	Taxa de Responsividade ao Protocolo n (%)	Taxa de Recuperação Embrionária n (%)
	D-16	D-14	D-5			
				D-1		

GC (n=17)	-	-	-	36,5±3,3 <sup>a</sup>	17/17 (100,0) <sup>a</sup>	9/17 (52,94) <sup>a</sup>
GP <sub>49</sub> (n=17)	-	22,9±11,4	25,3±10,6 <sup>a</sup>	30,7±8,9 <sup>b</sup>	10/17 (58,8) <sup>b</sup>	5/17 (29,41) <sup>ab</sup>
GP <sub>411</sub> (n=17)	23,1±6,6	-	22,9±10,9 <sup>a</sup>	26,7±9,6 <sup>b</sup>	7/17 (41,1) <sup>b</sup>	3/17 (17,64) <sup>b</sup>
Valor de p	-	-	0,54	GC x GP <sub>49</sub> : 0,02 GC x GP <sub>411</sub> : 0,001 GP <sub>49</sub> x GP <sub>411</sub> : 0,29	GC x GP <sub>49</sub> : 0,003 GC x GP <sub>411</sub> : 0,0001 GP <sub>49</sub> x GP <sub>411</sub> : 0,24	GC x GP <sub>49</sub> : 0,14 GC x GP <sub>411</sub> : 0,03 GP <sub>49</sub> x GP <sub>411</sub> : 0,34

Tabela 1: Diâmetros dos maiores folículos nos dias de manejo das éguas com vistas à inseminação artificial em tempo fixo, diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO), taxa de responsividade aos tratamentos e taxa de recuperação embrionária.

Legenda:  $x \pm s$  = média e desvio padrão; n = número absoluto; (%) = porcentagem entre parêntesis. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Observa-se que no grupo GP<sub>49</sub>, dos 17 ciclos avaliados, dez foram responsivos ao tratamento, apresentando folículos pré-ovulatórios no dia anterior à IATF, sendo que sete ovulações ocorreram até 48h após indução com Histrelina (70%), e foram recuperados cinco embriões. Em dois ciclos (11,7%) foi observado CL no dia da IA (ovulação antecipada). Uma ovulação foi constatada após quatro dias pós indução, e procedeu-se à coleta de embrião deste ciclo após oito dias da ovulação, com resultado positivo. Este resultado foi descartado devido a coleta ter sido realizada fora do dia D9 do protocolo, não sendo computada como TRE relativa à IATF.

Com relação à administração de hCG no D-14 no GP<sub>49</sub>, das seis éguas induzidas, quatro ovularam dentro de 48 horas (66,66%); uma égua apresentou regressão e posterior crescimento do folículo induzido, recuperando-se um embrião; e uma égua não foi responsiva à indução, sendo que o folículo continuou em crescimento até sua ovulação prévia à IATF, sem recuperação embrionária.

Em relação ao GP<sub>411</sub>, sete dos 17 ciclos foram responsivos ao tratamento, porém somente quatro ovularam em até 48h após indução com Histrelina (57,14%), e três embriões foram recuperados. No dia anterior à inseminação, foi

observado neste grupo, a predominância de folículos pequenos e quatro ciclos (23,5%) com presença de corpo lúteo (ovulação antecipada). Das duas éguas induzidas com hCG no D-16, uma apresentou ovulação em 48 horas e outra após 6 dias, porém nenhuma resultou em recuperação embrionária.

O GC teve controle folicular assistido por US transretal uma vez ao dia, resultando em uma média de 6,4 palpções por égua (variação de 2 a 18 controles), até o aparecimento de um folículo pré-ovulatório, cuja média foi 36,5mm de diâmetro no momento da indução da ovulação (D-1), apresentando diferença em comparação a ambos os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ). Neste grupo, 100% das ovulações ocorreram em até 48h após a administração da Histrelina, sendo recuperados nove embriões.

Os grupos GC e GP<sub>49</sub> não apresentaram diferenças relativas às TRES obtidas ( $P > 0,05$ ). Idêntico resultado se aplica na comparação entre os grupos GP<sub>49</sub> e GP<sub>411</sub>, concluindo-se que o resultado do grupo GP<sub>49</sub> apresentou semelhança estatística tanto em relação ao GC quanto ao GP<sub>411</sub>. Contudo, ambos os grupos experimentais apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) quanto à responsividade ao protocolo em comparação ao grupo controle, proporcionando um alento do emprego desta técnica.

O protocolo GP<sub>49</sub> destacou-se, portanto, pela melhor aplicabilidade à IATF, uma vez que a TRE deste grupo se manteve próxima à do grupo controle a ponto de não haver diferença ( $P > 0,05$ ). Esse resultado deve ser considerado promissor, pois, hipoteticamente, o grupo controle deveria resultar em melhor eficiência reprodutiva, uma vez que este é o método convencional para inseminação e transferência de embriões em equinos. Assim, o protocolo de IATF utilizando o DIP<sub>4</sub> por nove dias evidenciou qualidades promissoras neste âmbito.

O grupo GP<sub>411</sub> resultou na menor eficácia em TRE, com recuperação de três embriões de 17 ciclos pesquisados. Foi observado neste grupo a menor média de diâmetro folicular no momento da indução da ovulação (D-1) (Tabela 1). Algumas éguas deste grupo apresentaram regressão e atresia folicular, enquanto outras não apresentaram inibição pela P<sub>4</sub>, quando na presença de diâmetro folicular por volta de 25mm no início do protocolo, persistindo o

crescimento folicular com ovulação antecipada. Isto pode estar relacionado à redução do número total de folículos/animal com a duração do tratamento, independentemente do número de folículos no dia do início do protocolo. O aumento do diâmetro do maior folículo indicou que a P<sub>4</sub> por 11 dias induziu à ciclicidade gradual ovariana e reduziu o número de folículos. Isto foi relatado por Handler et al. (2006) e Polasek et al. (2017), ao utilizarem DIP<sub>4</sub> durante 11 dias com bons resultados para a sincronização do estro em éguas em anestro. Neste último estudo, a média dos diâmetros dos maiores folículos no dia da indução da ovulação foram similares ao do presente estudo, sendo os resultados satisfatórios para éguas acíclicas, destacando a importância da baixa concentração de hormônios endógenos no sucesso deste protocolo. Handler et al. (2006) também relatam que 23,3% das éguas apresentaram ovulação antecipada durante a permanência do dispositivo de P<sub>4</sub>, corroborando com achados do presente estudo (23,5%).

Diferentemente, no GP<sub>49</sub>, verificou-se a média de 30,7mm de diâmetro folicular no momento da indução da ovulação. Se houvesse um intervalo maior entre a retirada do dispositivo e a indução, possivelmente esta média estaria mais elevada, como constatado por Polasek et al. (2017), cuja indução da ovulação foi realizada seis dias após a remoção do dispositivo, com incremento de 3mm no diâmetro folicular. O tempo de permanência e concentração da P<sub>4</sub> foi suficiente para gerar uma nova onda folicular sem que muitas ovulações antecipadas fossem detectadas (11,7%).

Ainda em relação ao grupo GP<sub>49</sub>, observou-se uma ovulação ocorrendo após quatro dias da indução, com recuperação embrionária positiva, porém não coincidindo com o dia de coleta de embrião do protocolo de IATF, concedendo indicativo de que a IATF, pode apresentar melhor taxa de prenhez do que a TRE, uma vez que o sucesso da coleta de embrião depende diretamente do dia da ovulação.

Em relação às ovulações antecipadas, 100% delas ocorreram logo após a remoção do DIP<sub>4</sub> e antes do dia da indução da ovulação (D-1), não havendo significância entre os grupos experimentais ( $p=0,65$ ). Desta forma, recomenda-se o acompanhamento ultrassonográfico no intervalo entre a remoção do DIP<sub>4</sub> e a indução da ovulação com vistas a um melhor resultado.



A porcentagem de recuperação embrionária verificada no GC (52,94%) é condordante com dados da literatura, ao demonstrarem que a TRE pode variar de 40 a 80% (Fleury et al., 2001; Squires et al., 2003; Vazquez et al., 2010; Gomes et al., 2014). Fatores como a experiência do profissional e variações na temperatura ambiental exercem influência sobre a TRE em éguas (Oliveira et al., 2015; Cuervo-Arango et al., 2018). No presente estudo, as temperaturas médias verificadas para o primeiro e segundo ano foram respectivamente, 20,66°C e 19,04°C. Segundo Oliveira et al. (2015), em temperaturas ambientais médias menores ou iguais a 24°C, espera-se TRE de aproximadamente 60%.

Alguns estudos testaram a sincronização do estro em equinos através do uso de implantes de liberação prolongada de P<sub>4</sub>. Newcombe (2002), ao utilizarem o DIP<sub>4</sub> durante 10,9 dias em éguas no período de transição, observaram 89% das ovulações após 6,6 dias da remoção do dispositivo, e 4,6% de ovulações ocorrendo antes da sua remoção. Handler et al. (2006) utilizaram implantes de progesterona (PRID®) durante 11 dias em oito éguas, em diferentes estações do ano, com resultados satisfatórios para sincronização do estro (73,4%). Hanlon et al. (2010) testaram o uso do DIP<sub>4</sub> por 10 dias em éguas no período de transição, e obtiveram 100% das éguas ovulando cerca de três dias após a retirada do implante. Observa-se, portanto, que há discrepâncias relativas ao percentual de ovulações entre os autores, com variações que podem ser fundamentadas seja pelas concentrações de hormônios endógenos (anestro/transição/estação reprodutiva), seja pela região geográfica, variações de raça, idade ou mesmo pelo clima.

Estudos com o intuito de antecipar o início da ciclicidade ovariana de éguas Quarto de Milha em anestro foram desenvolvidos por Oliveira Filho et al. (2012), mantendo o DIP<sub>4</sub> por 10 dias. Setenta por cento das éguas apresentaram folículos de 35mm após 3,8 dias da remoção do DIP<sub>4</sub>, havendo ovulações 48h após a indução com hCG e deslorelina. Estes dados corroboram com os do presente estudo, apesar das diferentes metodologias, uma vez que nos protocolos de IATF administrados, a indução da ovulação foi pré-fixada depois de quatro dias pós remoção do DIP<sub>4</sub>, com mais de 50% das ovulações ocorrendo até 48h pós administração da histrelina. A eficácia do DIP<sub>4</sub> sobre a TRE resultou em 75% (Oliveira Filho et al., 2012), contra 29,41% do presente estudo (GP<sub>4</sub>9).

A TRE (Oliveira Filho et al.,2012) provavelmente, mostrou-se mais promissora em função de que o diâmetro do folículo pré-ovulatório era maior, além da raça dos animais (Quarto de Milha, destinada à reprodução especificamente), de outra localização geográfica, de diferente tempo de permanência do dispositivo (10 dias) e do indutor da ovulação e estacionalidade, possam ter exercido influencias. Tais fatos poderiam ser elencados como influentes entre os animais pesquisados.

Almeida et al. (2001), demonstraram a eficácia da sincronização do estro em éguas através da utilização de implante subcutâneo de norgestomet ou administração oral de altrenogest durante nove dias. Ambos os progestágenos não apresentaram diferença significativa em relação aos índices reprodutivos das éguas, sinalizando a possibilidade do uso destes progestágenos por nove dias na IATF em éguas.

Recentemente pesquisadores do nosso grupo avaliaram 15 éguas com permanência de DIP<sub>4</sub> por dez dias, seguido de IA com sêmen fresco, obtiveram uma TRE no grupo tratado muito próxima a do grupo controle (80% e 82,35% respectivamente – dados não publicados, 2019). Para justificar estes percentuais mais elevados das TREs, que os do presente estudo, podem ser elencados a utilização de um DIP<sub>4</sub> com maior concentração de progesterona (1,9g), à IA com 500 milhões de espermatozoides viáveis, e ao uso de dinoprost trometamina ao invés de D-cloprostenol. No estudo, os autores abordaram também a redução de 65% dos custos de deslocamento com a aplicação do protocolo em relação ao grupo controle (comunicação oral).

De acordo com Polasek et al. (2017) a utilização do DIP<sub>4</sub> em éguas pode desencadear vaginite transitória, mas que espontaneamente é debelada após a remoção do dispositivo, não interferindo sobre as taxas de prenhez. A utilização de oxitetraciclina com hidrocortisona (spray) sobre o dispositivo no momento da inserção reduz a severidade das vaginites, sem interferência da reação inflamatória sobre o diâmetro folicular, período de ovulação, edema uterino ou taxa de prenhez das éguas. O DIP<sub>4</sub> pode ser utilizado na IATF equina (Martinez et al., 2016).

A hipótese do presente estudo pode ser confirmada, pois o GP<sub>49</sub> foi o que mais se aproximou da similaridade de resultados com o grupo controle, considerado o padrão na reprodução assistida de equinos.

#### **4. Conclusões**

O protocolo proposto para a inseminação artificial em tempo fixo em equinos combinando a administração intravaginal de progesterona por nove dias e histrelina quatro dias após a remoção da progesterona, mostrou-se promissor, quanto à taxa de recuperação embrionária, dispensando a necessidade de controle folicular convencional e reduzindo o número de intervenções ginecológicas, manejo dos animais e deslocamento até as propriedades. Outros estudos são recomendados para esta área.

#### **5. Agradecimentos**

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil [grant number 001]; Fazenda Experimental Galha Azul (FEGA) of the Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Brasil; Dr. José Antonio Dell'Aqua Junior, Botupharma®, São Paulo, Brasil; Biogénesis Bagó®, Curitiba, Brasil; and Minitube do Brasil®, Porto Alegre, Brasil.

#### **6. Referências**

Almeida HB, Viana WG, Arruda RP, Oliveira CA. Sincronização de estro e dinâmica folicular de éguas Crioulas submetidas a tratamentos com norgestomet, acetato de melengestrol e altrenogest. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2001;38(6):267-72.

Araújo JM, Oliveira RA. A influência da nutrição e a atuação da leptina e kisspeptina no ciclo reprodutivo da égua. *Rev Bras Reprod Anim* 2018;42(1):9-14.

Avanzi BR, Ramos RS, Araujo GHM, Fioratti EG, Trinca LA, Dell'Aqua Jr JA, et al. Fixed-time insemination with frozen semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions? *Theriogenology* 2015;83:1389-93.

Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002;57:53-72.

Bó GA, De La Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 2016;86(1):388-96.

Bortot DC, Zappa V. Aspectos da reprodução equina: Inseminação artificial e transferência de embrião: Revisão de literatura. *Rev Cient Elet Med Vet* 2013;21(2):1-23.

Cerqueira LM, Soffa AF, Candido FS, Raimundo GFL, Silva JP, Rodrigues LO, et al. Atividade reprodutiva em éguas quarto de milha durante o período de transição de primavera na região da zona da mata, Rondônia. *Ars Vet* 2019;35(1):38-42.

Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout TA. Effect of embryo transfer technique on the likelihood of pregnancy in the mare: a comparison of conventional and Wilsher's forceps-assisted transfer. *Vet Rec* 2018;183(10):323.

Davies Morel MCG, Newcombe JR, Hayward K. Factors affecting pre-ovulatory follicle diameter in the mare: the effect of mare age, season and presence of other ovulatory follicles (multiple ovulation). *Theriogenology* 2010;74:1241–7.

Ferreira MCN, Miranda R, Abidu-Figueiredo M, Palhano HB. Avaliação da taxa de gestação em vacas nelore multíparas submetidas à inseminação artificial e inseminação artificial em tempo fixo. *Rev Bras Med Vet* 2012;34:152-6.

Fisher RA. Statistical Methods for Research Workers. 5.ed. Edinburgh: Oliver and Boyd; 1934.

Fleury JJ, Pinto AB, Marques A, Lima CG, Arruda RP. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga. Braz J Vet Res Anim Sci 2001;38(1):29-33.

Ginther OJ, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO, Baerwald AR, Pierson RA. Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. Reproduction 2005;130:379-88.

Ginther OJ, Pierson RA. Regular and irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares. J Equine Vet Sci 1989;9:4-12.

Gomes RG, Silva CB, Barreiros TRR, Seneda MM. Taxa de recuperação embrionária em éguas submetidas à caminhada com útero repleto de Ringer Lactato. Rev Acad Ciênc Agrár Ambient 2014;12(2):121-6.

Handler J, Schönlieb S, Hoppen HO, Aurich C. Seasonal effects on attempts to synchronize estrus and ovulation by intravaginal application of progesterone-releasing device (PRID™) in mares. Theriogenology 2006;65:1145-58.

Handler J, Schönlieb S, Hoppen HO, Aurich C. Influence of reproductive stage at PRID™ insertion on synchronization of estrus and ovulation in mares. Anim Reprod Sci 2007;97:382-93.

Hanlon DW, Evans MJ, Firth EC. Effect of intravaginal progesterone on follicular dynamic and FSH, LH and progesterone concentrations in transitional mares. Anim Reprod Sci 2010;121S:32-4.

Hanlon DW, Firth EC. The reproductive performance of Thoroughbred mares treated with intravaginal progesterone at the start of the breeding season. *Theriogenology* 2012;77(5):952-8.

Inseminação artificial em tempo fixo na espécie equina. Personal communication.

Kiser AM, Sudderth AK, Brinsko SP, Burns PJ, Douglas RH, Blanchard TL. Comparison of efficacy of two dose rates of Histrelin for inducing ovulation in broodmares. *J Equine Vet Sci* 2013;33:820-2.

Lindholm ARG, Ferris RA, Scofield DB, McCue PM. Comparison of deslorelin and histrelin for induction of ovulation in mares. *J Equine Vet Sci* 2011;31(5-6):312-3.

Martinez AC, Colli MHA, Carvalho RS, Moleirinho JO, Ruivo MA, Pinto Neto A, et al. Comportamento de éguas após a inserção de dispositivo intravaginal impregnado com progesterona. *Arq Ciênc Vet Zool UNIPAR* 2016;19(3):143-6.

McCue PM. Transferência de embriões em equinos: recuperação do embrião. *Rev mv&z CRMV-SP* 2011;9(3):94-8.

McCullagh P, Nelder JA. *Generalized Linear Models*. 2.ed. Chapman and Hall, London; 1989.

McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. *Equine Reproduction*. 2.ed. Wiley-Blackwell; 2011.

Meyer PL. Probabilidade: Aplicações à Estatística. 2.ed. Livros técnicos e Científicos Editora; 1983.

Moreno D, Cutaia L, Villata ML, Ortisi F, Bo GA. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology* 2001;55:408 abstr.

Newcombe JR. Field observations on the use of progesterone-releasing intravaginal device to induce estrus and ovulation in seasonally anestrous mares. *J Equine Vet Sci* 2002;22:378-82.

Oliveira JP, Jacob JCF, Jesus VLT, Silva PCA. Influência da temperatura e umidade ambiente em um programa de transferência de embriões equinos, na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro. *Rev Bras Med Vet* 2015;37(2):158-62.

Oliveira Filho LR, Daneze ER, D'Auria E, Schutzer CGC. Efeito do implante intravaginal de progesterona sobre a ciclicidade de éguas em anestro da raça Quarto de Milha. *Nucleus Animalium* 2012;4(2):113-9.

Pimentel MML, Santos FA, Dias RVC, Macêdo LB, Fonseca ZAAS, André WPP, Ribeiro WLC. Monitoramento do ciclo estral de fêmeas equinas por meio de citologia vaginal, ultrassonografia e dosagem hormonal. *Arq Ciênc Vet Zool UNIPAR* 2014;17(1):69-75.

Polasek TCM, Kozicki LE, Pedrosa VB, Weiss RR, Bertol MAF, Camargo CE, et al. Impact of a progesterone-releasing intravaginal device and inflammatory reaction on ovarian activity in embryo-recipient anestrous mares. *Theriogenology* 2017;90:175-84.

Polo G, Lima LGF, Kozicki LE, Dell'aqua Jr JA, Camargo CE, Segui MS, et al. Two administrations of an intravaginal progesterone device on the induction of ovarian cyclicity in anestrus mares. *Pferdeheilkunde* 2016;32(3):217-22.

Silva PCA, Oliveira JP, Sá MAF, Paiva SO, Caram DF, Junqueira RGC, Jacob JCF. Comparação entre dois agentes indutores da ovulação em éguas. *Rev Bras Med Vet* 2016;38(2):45-8.

Speirs CV. *Clinical examination of horses*. 1.ed. Pennsylvania: Saunders; 1997.

Squires E, Carnevale E, McCue P, Bruemmer J. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* 2003;59(1):151–70.

Vazquez JJ, Garcia A, Kass PH, Liu IKM, Ball BA. Influence of environmental temperature, exercise, semen type and ovulation characteristics on reproductive performance in a commercial embryo transfer program. *Anim Reprod Sci* 2010;121(1-2):301-2.

Voge JL, Sudderth AK, Brinsko SP, Burns PJ, Blanchard TL. Comparison of Efficacy of Two Dose Rates of Histrelin to Human Chorionic Gonadotropin for Inducing Ovulation in Broodmares. *J Equine Vet Sci* 2012;32:208-10.

Wilde OR, De La Vega AC, Cruz ML. Uso de un dispositivo intravaginal para el control del estro en yeguas. *Zootec Trop* 2002;20:483-92.

Xavier ILGS, Silva Filho JM, Palhares MS, Carvalho GR, Borges AM, Rossi R. Fertilidade de éguas inseminadas no corpo ou no ápice do corno uterino com diferentes concentrações espermáticas. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2009;61(1):50-6.



Zúccari CESN, Bender ESC, Silva EVC, Saturnino HM. Eficiência reprodutiva e dinâmica folicular de éguas campolina de acordo com a condição corporal. Cienc anim bras 2013;14(4):406-12.

## **CAPÍTULO 3**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Ao observar a importância da IATF, tanto no contexto da biotécnica reprodutiva, quanto como ferramenta de redução de custos e manejo animal, promovemos a otimização dos resultados e a valorização do médico veterinário sob o ponto de vista inovador, buscando alternativas à reprodução equina que mantenham a taxa de recuperação embrionária ou prenhez.

O desenvolvimento de protocolos hormonais com vistas à IATF equina deve ser continuamente pesquisado para obtenção das melhores combinações de fármacos e protocolos em busca do melhor resultado, alterando os intervalos hormonais, a concentração dos fármacos e selecionando éguas com folículos menores de 25mm no dia de início do protocolo. Associando-se os protocolos hormonais com qualificação da mão-de-obra, manejo sanitário e nutricional animal, certamente haverá incremento nos índices positivos da IATF em equinos.

Concluiu-se com este trabalho que o protocolo hormonal GP<sub>49</sub> proposto para IATF em equinos foi eficaz quanto à TRE, ainda que o GP<sub>411</sub> não tenha atingido resultado satisfatório.

Os protocolos para a IATF deram indicações positivas aos seus empregos, destacando a não-necessidade do controle folicular assistido, bem como à redução dos manejos reprodutivos diários, recomendando-se estudos futuros para comprovação de sua eficácia.

## **REFERÊNCIAS**

Almeida HB, Viana WG, Arruda RP, Oliveira CA. Sincronização de estro e dinâmica folicular de éguas Crioulas submetidas a tratamentos com

norgestomet, acetato de melengestrol e altrenogest. *Braz J vet Res anim Sci* 2001;38(6):267-72.

Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002;57:53-72.

Bortot DC, Zappa V. Aspectos da reprodução equina: Inseminação artificial e transferência de embrião: Revisão de literatura. *Rev Cient Elet Med Vet* 2013;21(2):1-23.

Canisso IF, Souza FA, Silva EC, Carvalho GR, Guimarães JD, Lima AL. Inseminação Artificial Em Equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. *Rev Acad Ciênc Agrár Ambient* 2008;6(3):389-98.

Carmo MT, Trinque CLN, Lima MM, Araújo GHM, Araújo CFM, Meira C, Filho NP, Alvarenga MA. Use of intravaginal progesterone implant to hasten the first ovulation of the season in transitional mares. In: 11th Congress of the World Equine Veterinary Association – WEVA, Guarujá, 2009.

Davies Morel MCG, Newcombe JR, Hayward K. Factors affecting pre-ovulatory follicle diameter in the mare: the effect of mare age, season and presence of other ovulatory follicles (multiple ovulation). *Theriogenology* 2010;74:1241–7.

Ferreira MCN, Miranda R, Abidu-Figueiredo M, Palhano HB. Avaliação da taxa de gestação em vacas nelore multíparas submetidas à inseminação artificial e inseminação artificial em tempo fixo. *Rev Bras Med Vet* 2012;34:152-6.

Handler J, Schönlieb S, Hoppen HO, Aurich C. Seasonal effects on attempts to synchronize estrus and ovulation by intravaginal application of progesterone-releasing device (PRID™) in mares. *Theriogenology* 2006;65:1145-58.

Hanlon DW, Evans MJ, Firth EC. Effect of intravaginal progesterone on follicular dynamic and FSH, LH and progesterone concentrations in transitional mares. Anim Reprod Sci 2010;121S:32-4.

Hemberg E, Lundeheim N, Einarsson S. Successful timing of ovulation using deslorelin (Ovuplant®) is labour-saving in mares aimed for single AI with frozen semen. Reprod Domest Anim 2006;41:535-7.

IBGE – Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. Censo agropecuário 2017. Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3096/agro\\_2017\\_resultados\\_definitivos.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3096/agro_2017_resultados_definitivos.pdf)>. Acesso em fevereiro 2020.

Lima RAS, Cintra AG. Revisão do estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-antiores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>>. Acesso em fevereiro 2020.

McCue PM, Nickerson KC, Squires EL, Farquhar VJ, Nett TM. Effect of altrenogest on luteinizing hormone concentration in mares during the transition period. In: Proceedings of the 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 2001, pp.249-51.

McKinnon AO. Hormonal control of equine reproduction. Proceedings of the 11th Annual Resort Symposium of the American Association of Equine Practitioners, Gold Coast, Austrália, 2009.

Oliveira Filho LR, Daneze ER, D'Auria E, Schutzer CGC. Efeito do implante intravaginal de progesterona sobre a ciclicidade de éguas em anestro da raça Quarto de Milha. *Nucleus Animalium* 2012;4(2):113-9.

Pickett BW, Amann RP. Cryopreservation of semen. In: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993, p.769-89.

Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO. The follicle: practical aspects of follicle control. *Current therapy in equine reproduction*. Missouri: Saunders Elsevier, 19p, 2007.

Sand G. Künstliche Befruchtung von Stuten (Artificial fertilization of mares). *Berl Tierärztl Wochenschr* 1903;19:182-4.

Silva PCA, Oliveira JP, Sá MAF, Paiva SO, Caram DF, Junqueira RGC, Jacob JCF. Comparação entre dois agentes indutores da ovulação em éguas. *Rev Bras Med Vet* 2016;38(2):45-8.

Souza MIL. Indução e sincronização de estro em ovelhas: desafios e potencial. *Rev Bras Reprod Anim* 2013;37(2):220-5.

Voge JL, Sudderth AK, Brinsko SP, Burns PJ, Blanchard TL. Comparison of Efficacy of Two Dose Rates of Histrelin to Human Chorionic Gonadotropin for Inducing Ovulation in Broodmares. *J Equ Vet Sci* 2012;32:208-10.

## **ANEXOS**

### **1. Normas para submissão do artigo científico no periódico *Theriogenology* (Guide for Authors):**

## PREPARATION

Use of word processing software. It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. Pages and lines should be numbered.

## ARTICLE STRUCTURE

### Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method,

use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

## Results

Results should be clear and concise.

## Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

## Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

## Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or

'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

#### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These Keywords will be used for indexing purposes.

#### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof Reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

#### Tables



Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

## REFERENCES

### Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and viceversa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

## Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also Samples of Formatted References).

### Journal Abbreviation Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

## 2. Parecer de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - PUCPR)



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 02 de outubro de 2018.

### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01263 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: *INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM EQUINOS: EFICIÊNCIA DE PROTOCOLOS HORMONAIS*

#### PESQUISADOR RESPONSÁVEL

LUIS ERNANDES KOZICKI

#### EQUIPE DE PESQUISA

CARLOS EDUARDO CAMARGO, BRUNA LAMPE ZIELINSKI, LIÉDGE CAMILA SIMIONI FELICIO

#### INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

#### CURSO

Escola de Ciências da Vida

VIGÊNCIA DO PROJETO	Julho/18 a Dezembro/19	QUANTIDADE DE ANIMAIS	22
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Equus caballus</i>	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	M/F	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	4 a 15 anos / 400 +- 50kg	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Fazenda Experimental Gralha Azul / Fazenda Experimental Pé a Serra (UTP). Região Metropolitana de Curitiba	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA sendo **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado.

Se houver mudança de protocolo o pesquisador deve enviar um relatório à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização.



**Pontifícia Universidade Católica do Paraná**  
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha**

**Coordenador**

**Comissão de Ética no Uso de Animais**

