



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

Defesa de Dissertação

EFEITO DOS AINES NA FERTILIDADE, PERDA GESTACIONAL
PRECOCE E MOBILIDADE EMBRIONÁRIA DE ÉGUAS
RECEPTORAS DE EMBRIÃO

CAROLINA TIEMI CARDOSO OKADA

Botucatu - SP

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

Defesa de Dissertação

EFEITO DOS AINES NA FERTILIDADE, PERDA GESTACIONAL
PRECOCE E MOBILIDADE EMBRIONÁRIA DE ÉGUAS
RECEPTORAS DE EMBRIÃO

CAROLINA TIEMI CARDOSO OKADA

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da Universidade
Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, Campus Botucatu,
para obtenção do título de mestre
em Biotecnologia Animal, área de
Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Botucatu - SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Okada, Carolina Tiemi Cardoso.

Efeito dos AINEs na fertilidade, perda gestacional precoce e mobilidade embrionária de éguas receptoras de embrião / Carolina Tiemi Cardoso Okada. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Capes: 50504002

1. Égua - Reprodução. 2. Agentes anti-inflamatórios.
3. Transferência de embriões. 4. Fecundidade.

Palavras-chave: Antiinflamatório não esteroide;
Ciclooxigenase; Mobilidade embrionária; Transferência de embrião.

Nome da autora: Carolina Tiemi Cardoso Okada

Título: Efeito dos aines na fertilidade, perda gestacional precoce e mobilidade
embrionária de éguas receptoras de embrião

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu.

Prof. Dr. Fernanda da Cruz Landim

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Claudia Barbosa Fernandes

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ – USP – São Paulo

Data da defesa: 11 de Julho de 2017

Dedicado a: Cleuza Maria Cardoso e Toshiro Okada

Dedico esse trabalho aos meus pais Cleuza e Toshiro, que me ensinaram o verdadeiro valor da vida, a ser honrada e a me dedicar ao máximo para conquistar meus objetivos.

Sempre apoiaram meu sonho de ser médica veterinária, mesmo que para isso ainda continuem investindo tempo e amor para que eu vença todas as etapas. Minha gratidão e amor serão eternos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que tornou tudo possível e me proporcionou momentos únicos de aprendizado.

Agradeço aos meus pais Cleuza e Toshiro, por me apoiar todo o tempo e acreditar no meu sonho junto comigo. Estão presentes na minha vida em todos os momentos mesmo longe. Vocês são meus modelos de vida e meu porto seguro, deixá-los orgulhosos é a minha maior alegria.

Ao meu namorado César Araújo, por todo amor, companheirismo e por estar ao meu lado nos dias bons e nos difíceis, sempre me fazendo ver o lado bom e de aprendizado que cada situação pode trazer.

Ao Rafael Goretti, por ceder gentilmente os dados para a realização de parte desse experimento e por toda a ajuda durante as análises.

Ao meu orientador Marco Antonio Alvarenga, pela oportunidade e ensinamentos.

À Veridiana Andrade, por toda a ajuda no decorrer do experimento, pelo companheirismo e amizade.

Aos professores Nereu, Papa, Eunice, Fernanda, Fabiana, José Dell'Aqua, Meira e João por compartilhar comigo ensinamentos e experiências profissionais.

A todos os amigos pós-graduandos da FMVZ que tornaram os dias mais alegres, obrigada por dividir comigo o que aprenderam.

A todos os alunos, estagiários e funcionários que me ajudaram a realizar esse experimento e a cuidar das éguas.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Artigo II

- Figura 1 - Modelo representativo de útero de uma égua dividido em 9 partes segundo Ginther [13]. (A) Mobilidade do embrião equino por uma hora, pré-tratamento. (B) Mobilidade embrionária por 1 hora pós-tratamento com FM..... 48

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Artigo II

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | Tabela 1: Resultados e análise descritiva dos parâmetros da mobilidade embrionária (movimentação por hora). ((a,b) Letras minúsculas significam diferença entre as colunas, $p < 0,05$. (C x T x 24T). (A,B) letras maiúsculas significam diferenças entre as linhas, $p < 0,05$. (FM x FIRO x ML))..... | 49 |
|------------|--|----|

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

| | |
|--------------|--|
| AA | Ácido araquidônico |
| AINE | Antiinflamatório não esteroide |
| AM | Ácido meclofenâmico |
| CL | Corpo lúteo |
| COX | Enzima ciclooxigenase |
| CRYAB | <i>Crystallin alpha B</i> |
| EPF | <i>Early pregnancy fator</i> |
| EPSI | Inibidor da síntese de prostaglandina endometrial |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| FIRO | Firocoxib |
| FM | Flunixin meglumine |
| FSH | Hormônio folículo estimulante |
| GTP | Guanosina trifosfato |
| HSPB7 | <i>Heat shock protein family B (small) member 7</i> |
| HSPB8 | <i>Heat shock protein family B (small) member 8</i> |
| IBGE | Instituto brasileiro de geografia e estatística |
| IETS | <i>International Embryo Technology Society</i> |
| IFN δ | Interferon-delta |
| IGF-1 | <i>Insulin-like growth factors</i> |
| kDa | Quilodalton |
| LH | Hormônio luteinizante |

| | |
|--------|--|
| ML | Meloxicam |
| PEP | Perda embrionária precoce |
| PGP | Perda gestacional precoce |
| PGE | Prostaglandina E |
| PGF | Prostaglandina F |
| PGFM | Metabólito de prostaglandina F |
| PGI | Prostaglandina I |
| PKC | Enzima proteína quinase C |
| PTGER2 | Receptor de prostaglandina E, tipo 2 |
| PTGER3 | Receptor de prostaglandina E, tipo 3 |
| PTGER4 | Receptor de prostaglandina E, tipo 4 |
| PTGES | Enzimas prostaglandina E sintase |
| PTGES | Enzima prostaglandina E sintase |
| PTGFR | Receptor de prostaglandina F |
| PTGFS | Prostaglandina F sintase |
| PTGS | Enzima prostaglandina endoperoxido sintase |
| PTGS1 | Enzima prostaglandina sintase 1 |
| PTGS2 | Enzima prostaglandina sintase 2 |
| RNAm | Ácido ribonucleico mensageiro |
| TE | Transferência de embrião |

Sumário

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| 1. INTRODUÇÃO | 2 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 PROSTAGLANDINAS NO SISTEMA REPRODUTOR DA ÉGUA..... | 3 |
| 2.2 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM ÉGUAS..... | 6 |
| 2.3 USO DE ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDES EM RECEPTORAS DE EMBRIÃO . | 14 |
| 3. REFERÊNCIAS..... | 18 |
| HIPÓTESE | 31 |
| OBJETIVOS | 31 |
| CAPÍTULO 2 | 32 |
| Artigo I..... | 33 |
| 1. INTRODUÇÃO | 34 |
| 2 MATERIAL E MÉTODO | 35 |
| 2.1 Local e Animais..... | 35 |
| 2.2 Critério de seleção | 35 |
| 2.3 Transferência de Embrião | 36 |
| 2.4 Tratamento | 36 |
| 2.5 Análise Estatística..... | 37 |
| 3. RESULTADOS | 37 |
| 4. DISCUSSÃO | 37 |
| 5. REFERÊNCIAS..... | 39 |
| Artigo II..... | 44 |
| 1 INTRODUÇÃO | 46 |
| 2 MATERIAL E MÉTODO | 47 |
| 2.1 Local e Animais..... | 47 |
| 2.2 Avaliações ultrassonográficas de mobilidade embrionária | 47 |
| 2.3 Tratamentos..... | 48 |
| 2.4 Análise Estatística..... | 49 |
| 3 RESULTADOS | 49 |
| 4. DISCUSSÃO | 50 |
| 5 REFERÊNCIAS..... | 51 |

OKADA, C. T. C. Efeito dos aines na fertilidade, perda gestacional precoce e mobilidade embrionária de éguas receptoras de embrião. Botucatu 2017, 70p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

RESUMO

A administração de antiinflamatórios não esteroides (AINEs) no momento da transferência de embrião em éguas é empregada usualmente para conter a inflamação uterina e produção de prostaglandina F2 α (PGF2 α), na tentativa de evitar a luteólise. No entanto, estes fármacos podem prejudicar a produção de prostaglandinas pelo concepto e alterar o mecanismo de mobilidade embrionária e reconhecimento materno fetal. Nesse estudo foi avaliada a ação do flunixin meglumine (FM) em um grande número de receptoras de embrião (n=409) em um centro comercial de reprodução equina, verificando estatisticamente a ação deste medicamento na taxa de prenhez e perda gestacional precoce. Os animais foram divididos em dois grupos (FM e controle), recebendo uma única aplicação de FM na dose de 1,1mg/kg imediatamente após a transferência de embrião em éguas alternadas para correta randomização. A taxa de prenhez aos 15 dias do grupo controle foi de 70,95% e a do grupo tratado 75,22%, sem diferença entre os grupos (p=0,3337). Aos 60 dias o grupo controle apresentou taxa de prenhez de 65,22% e o grupo tratado de 65,92%, sem diferença estatística (p>0,05). No entanto, foi observado que a perda embrionária até 60 dias do grupo controle foi 5,03% e no grupo tratado 10,0%, havendo tendência (p=0,0578) para perda gestacional precoce. Em um segundo experimento, AINEs de outras categorias como COX-2 seletivo: firocoxibe e COX-2 preferencial: Meloxicam foram determinados a fim de tentar estabelecer um tratamento antiinflamatório menos prejudicial à fase de mobilidade embrionária. A comparação dos AINEs foi mensurada de acordo com a quantidade de movimentos realizados pela vesícula embrionária após o pico de concentração plasmática de cada fármaco a partir de ultrassonografias seriadas. Os animais foram separados em 3 grupos de 10 éguas cada (flunixin meglumine, firocoxib e meloxicam) e, a partir da confirmação da gestação aos 12 dias, foram iniciadas ultrassonografias por meio de palpação retal a cada 5 minutos durante 1 hora com o propósito de mapear a localização do embrião e o número de seus movimentos. A

segunda série de ultrassonografias foi realizada após o pico plasmático de cada AINE estabelecido por grupo e a terceira série após 24 horas da aplicação do fármaco. A dose para o FM foi de 1,1 mg/kg, para o firocoxib 0,2 mg/kg e para o meloxicam 0,6 mg/kg. O grupo FM apresentou média de movimentos embrionários por hora de 5.8 ± 0.3 durante o momento controle e depois do tratamento 2.3 ± 0.5 , correspondendo uma queda de 60%. No grupo que recebeu meloxicam o número de movimentos do embrião no momento controle foi de 5.9 ± 0.3 , diminuindo para 1.9 ± 0.3 durante o pico sérico do medicamento, representando queda de 67%. Contudo, o firocoxib não modificou os padrões de movimentação embrionária da hora controle (5.7 ± 0.4) para a hora após tratamento (5.8 ± 0.3), sugerindo que o fármaco não interferiu com a mobilidade do concepto. Após 24 horas do tratamento todos os parâmetros de mobilidade estavam dentro da normalidade, indicando que não há efeito colateral permanente do FM e meloxicam. Em conclusão, o firocoxib foi o único AINE relatado nesse estudo que não alterou a mobilidade embrionária, sendo considerado mais seguro para ser administrado em éguas no início da gestação.

Palavras-chave: Antiinflamatório não esteroide, ciclooxigenase, transferência de embrião, reconhecimento materno da gestação.

OKADA, C. T. C. Effect of NSAIDs on fertility, early pregnancy loss and embryo mobility in recipients mares. Botucatu 2017, 70p. Thesis (Master degree) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu city, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

ABSTRACT

The administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) at the time of embryo transfer is usually used to inhibit uterine inflammation and prostaglandin F2 α (PGF2 α) production in an attempt to prevent luteolysis. However, these drugs may impair the production of prostaglandins by the conceptus and alter the mechanism of embryo mobility and maternal fetal recognition. In this study, the action of flunixin meglumine (FM) was evaluated in a large number of embryo recipients mares (n = 409) at a commercial center of equine reproduction, stating the action of this drug on the pregnancy rate and early pregnancy loss. The animals were divided into two groups (FM and control), receiving a single FM application at the dose of 1.1mg / kg immediately after the embryo transfer in alternate mares for correct randomization. The pregnancy rate at 15 days in the control group was 70.95% and 75.22% on the treated group, with no difference between groups (p = 0.3337). At 60 days the control group presented a pregnancy rate of 65.22% and the treated group of 65.92%, with no statistical difference (p > 0.05). Nevertheless, it was observed that the pregnancy loss up to 60 days in the control group was 5.03% and in the treated group 10.0%, with a trend (p = 0.0578) to early pregnancy loss. In a second experiment NSAIDs of other categories as selective COX-2: firocoxib and preferential COX-2: meloxicam were determined in order to try to establish an anti-inflammatory treatment less damaging to the stage of embryonic mobility. The comparison of NSAIDs was measured according to the number of movements performed by the embryonic vesicle after the peak plasma concentration of each drug beginning at serial ultrasonography. The animals were separated into 3 groups of 10 mares each (flunixin meglumine, firocoxib and meloxicam) and from the confirmation of pregnancy at 12 days, ultrasonography was started by rectal palpation every 5 minutes during 1 hour for mapping the location of the embryos and the number of its movements. The second series of ultrasound was performed after each NSAID peak plasma established per group and the third series was performed after 24 hours after application of the drug. For FM, a therapeutic dose of 1.1 mg/kg was used, for firocoxib the dose was 0.2 mg/kg and for meloxicam the dose was

0.6 mg/kg. The FM group showed average of embryonic movements per hour of 5.8 ± 0.3 for the time control and after treatment 2.3 ± 0.5 , representing a decrease of 60%. In the group receiving meloxicam the number of movements of the embryo at the time of the control was 5.9 ± 0.3 , decreasing to 1.9 ± 0.3 during the serum peak of the drug, representing a reduction of 67%. However, firocoxib did not modify the patterns of embryonic movement of the control hour (5.7 ± 0.4) for the hour after treatment (5.8 ± 0.3), suggesting that the drug did not interfere with the conceptus mobility. After 24 hours of treatment all mobility parameters were within normal range, indicating that there is no permanent side effect of FM and meloxicam. In conclusion, firocoxib was the only NSAID reported in this study that did not alter embryonic mobility, being considered safer to be administered in mares at the beginning of gestation.

Keywords: Non-steroidal anti-inflammatory, cyclooxygenase, embryo transfer, embryo mobility.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A transferência de embrião (TE) na espécie equina foi descrita pela primeira vez em 1972, sendo difundida para uso comercial a partir dos anos 80. A princípio a técnica foi utilizada em éguas idosas, com histórico de subfertilidade, problemas músculo-esqueléticos e abortamentos subsequentes. Atualmente a TE também é indicada para animais de alto desempenho atlético e valor zootécnico, em combinação com outras biotecnologias para ampliar os tratamentos e o número de descendentes por animal (HARTMAN, 2011; SAMPER; PYCOCK; MCKINNON, 2007).

A eficiência do método é prejudicada pela possibilidade de contaminação uterina durante o procedimento, a excessiva manipulação da cérvix pelo técnico e o próprio contato do embrião no útero da receptora podem promover uma resposta inflamatória momentânea que, apesar de subclínica, pode liberar quantidades suficientes de prostaglandina F₂ α (PGF₂ α), consequente luteólise e perda embrionária precoce (KASK; ODENSVIK; KINDAHL, 1997; NEELY; STABENFELDT; SAUTER, 1979).

Seguindo essa compreensão, Koblischke et al. (2008) menciona que a administração de antiinflamatórios não esteroides (AINE) no momento da TE é frequentemente empregado para conter a inflamação local e produção de PGF₂ α no endométrio. No entanto, o fármaco pode alterar o ambiente uterino, prejudicando o mecanismo de mobilidade embrionária e reconhecimento materno-fetal.

O embrião equino produz as prostaglandinas PGE-2, PGF e PGI-2, responsáveis pela sinalização ao útero (WATSON; SERTICH, 1989). As prostaglandinas liberadas pelo embrião possuem ação local e não atingem níveis séricos na égua suficientes para induzir luteólise (STOUT; ALLEN, 2002). A partir dessa sinalização, a vesícula embrionária ativa mecanismos desencadeadores da mobilidade no período que varia de 6 a 16 dias após a ovulação, que promove o deslocamento do embrião pelo lúmen uterino. Esse fenômeno é essencial para que ocorra o reconhecimento materno da gestação (LEITH; GINTHER, 1984). A migração do embrião por toda a superfície uterina garante a distribuição do fator anti-luteolítico adequadamente que inibe a produção de prostaglandina F₂ α que proporciona a manutenção da produção de progesterona e gestação (MCDOWELL et al., 1985).

O uso de AINEs na TE é justificado pela diminuição da inflamação e menor liberação de prostaglandina uterina após o procedimento, embora os efeitos que estes medicamentos causam no embrião, na mobilidade embrionária e no reconhecimento materno ainda não estejam totalmente esclarecidos. O propósito desse estudo foi elucidar o efeito dos AINEs na fertilidade, na perda gestacional precoce e na mobilidade embrionária de éguas receptoras de embrião.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROSTAGLANDINAS NO SISTEMA REPRODUTOR DA ÉGUA

Dentre as funções reprodutivas na égua, as prostaglandinas atuam na luteólise (ALLEN; ROWSON, 1973; STABENFELDT et al., 1981), ovulação (BOERBOOM; SIROIS, 1998; SIROIS; DORÉ, 1997), passagem do embrião pela tuba uterina (VAN NIEKERK; GERNEKE, 1966), mobilidade embrionária durante o reconhecimento materno da gestação (MCDOWELL et al., 1985; STOUT; ALLEN, 2001), e parto (BARNES et al., 1978).

As prostaglandinas são lipídeos mensageiros derivados do ácido araquidônico com potente atividade metabólica. No início da cascata de reações para a produção de prostaglandina, a fosfolipase C é ativada pela proteína acopladora da guanosina trifosfato (GTP), convertendo o fosfatidil inositol bifosfato em diacilglicerol e trifosfato inositol. O trifosfato inositol atua no retículo endoplasmático celular a fim de liberar cálcio para o citoplasma, estimulando a enzima proteína quinase C (PKC) que ativa a fosfolipase A2 (AXELROD; BURCH; JELSEMA, 1988; BERRIDGE; IRVINE, 1984)

Os ácidos graxos essenciais são precursores na síntese de prostaglandinas (VAN DORP et al., 1964). Em decorrência de estímulo químico ou elétrico, os fosfolipídios da membrana celular sofrem esterificação por ação da fosfolipase A2, liberando ácido araquidônico (AA), classificado como ácido graxo poli-insaturado (5,8,11,14-cis-ácido eicosanóico) (SHIMIZU; WOLFE, 1990).

O AA é transformado em prostaglandinas a partir da enzima prostaglandina endoperoxido sintase (PTGS), também denominada como prostaglandina G/H sintase ou ciclooxigenase (COX). A COX incorpora duas moléculas de oxigênio à molécula de AA, gerando a prostaglandina G2 (15-hidroperoxi-9,11 – endoperoxido) que é reduzida

a partir da reação peroxidase formando a prostaglandina H₂ (15 – hidroxí análogo) (HAMBERG et al., 1974; NEEDLEMAN et al., 1986; SAMUELSSON et al., 1978).

As duas isoformas da COX são diferenciadas estruturalmente pela isoleucina 523 na COX-1 substituído por valina na COX-2, que abre sítio de ligação hidrofóbico onde se aderem os AINEs COX-2 seletivos. Comparado a COX-1, a COX-2 possui um sítio de ligação 25% maior e apresenta um sítio secundário, permitindo elaboração de AINEs de ligação específica (LUONG et al., 1996).

A síntese de prostaglandinas envolve a dupla oxigenação pela ação da enzima dioxigenase, que adiciona moléculas de oxigênio nos carbonos estruturais para formar diferentes compostos. Ao incorporar um oxigênio ao C15 forma-se um peróxido e ao C9 juntamente com C11 compõe um endoperóxido. Grupos hidroxilas nos C9 e C11 origina a prostaglandina F, um grupo cetona no C9 e hidroxila no C11 resulta em prostaglandina E (HIGGINS; LEES, 1984).

As enzimas prostaglandina E sintase (PTGES) e prostaglandina F sintase (PTGFS) convertem a PGH₂ em PGE e PGF respectivamente, as quais são relacionadas às funções fundamentais do sistema reprodutor como ovulação, luteólise, fertilização e implantação embrionária (ATLI et al., 2010).

Para que a ovulação ocorra, o folículo dominante sofre ação do hormônio luteinizante (LH) para completar seu desenvolvimento e maturação. O LH também possui a função de promover a ovulação, amplificando a expressão da COX-2 na parede do folículo que aumenta as concentrações de PGF e PGE no líquido folicular (SIROIS; DORÉ, 1997).

Na luteólise em éguas, o útero regula o tempo de atividade do corpo lúteo (CL) por intermédio da produção de PGF₂ α , processo denominado luteólise que inicia a partir de 13 a 16 dias após ovulação. A PGF₂ α alcança o tecido ovariano por meio da circulação sanguínea sistêmica, ocasionando queda detectável nos níveis plasmáticos de progesterona em 4 horas e < 1ng/ml depois de 40 horas (BRINSKO et al., 2011).

Durante a luteólise a PGF₂ α atua reduzindo o aporte sanguíneo do tecido luteal, bloqueia esteroidogênese e impede ação de fatores luteotróficos, promovendo apoptose celular. A biossíntese da progesterona diminui rapidamente por inibição do transporte intracelular de componentes devido a queda de RNAm e proteína carreadora de esterol

(SCP-2) que reduz a entrada de colesterol na mitocôndria (MCLEAN et al., 1995). Segundo Girsh et al. (1996), a $PGF2\alpha$ se liga aos receptores de membrana das células luteais ativando a PKC que diminui a biodisponibilidade de colesterol no interior da célula, promove diminuição da expressão dos receptores LH e estimula a síntese de endotelina-1, potente vasoconstritora.

A $PGF2\alpha$ é amplamente utilizada na reprodução equina com o objetivo de manipular o ciclo estral, sincronização de receptoras para TE, interromper gestação inicial, tratar infecções uterinas e estimular a liberação de gonadotrofinas. Os análogos comerciais mais utilizados são dinoprost trometamina, cloprostenol, luprositol e d-cloprostenol (STAEMPFLI, 2011).

As prostaglandinas também possuem importante atividade na permanência da gestação inicial das éguas por meio do reconhecimento materno-fetal, responsável por evitar a formação da luteólise. O interferon-delta ($IFN\delta$) foi descrito em suínos e equinos, sendo expressos entre os dias 16 e 22 de gestação, podendo estar envolvido na comunicação entre endométrio e embrião depois da fase de reconhecimento materno inicial (COCHET; VAIMAN; LEFÈVRE, 2009). Em ruminantes o interferon-tau produzido pelo embrião é o sinalizador para bloqueio da produção de $PGF2\alpha$ endometrial (HELMER et al., 1989).

O embrião equino secreta PGE a partir de 5 dias após ovulação sendo a quantidade secretada diretamente proporcional ao desenvolvimento embrionário, de modo a desencadear o transporte pela tuba uterina e passagem seletiva através da papila tubárica. Posteriormente a entrada no útero, o conceito continua a produção de PGE, podendo estar envolvida no reconhecimento materno da gestação (Weber et al., 1992).

Somente embriões em desenvolvimento conseguem traspor a papila tubárica e os oócitos não fertilizados ficam retidos na tuba uterina (VAN NIEKERK; GERNEKE, 1966). A PGE embrionária relaxa a musculatura lisa presente na papila tubária, promovendo dilatação do esfíncter e passagem do embrião para o útero (WEBER et al., 1991).

São encontrados quatro tipos de receptores para PGE na tuba uterina (Sugimoto e Narumiya, 2007). Segundo Wånggren et al. (2008) os receptores classificados como

EP1 e EP3 são encarregados de induzir contrações da musculatura enquanto os receptores EP2 e EP4 causam o relaxamento.

O embrião equino permanece com a cápsula rígida e não aderido ao endométrio para percorrer toda a extensão uterina de modo a sinalizar sua presença e manter a luteostase até 17 dias de gestação, quando inicia o processo de fixação (ORIOLE; SHAROM; BETTERIDGE, 1993). Dentre os mediadores bioquímicos as prostaglandinas PGF2 α e PGE estimulam as contrações miométriais para que ocorra a mobilidade embrionária e consequente reconhecimento materno da gestação (STOUT; ALLEN, 2001).

2.2 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM ÉGUAS

A sinalização que o embrião realiza no útero é um dos fatores que promove o reconhecimento materno da gestação na égua, resultando no prolongamento da fase luteal e, conseqüentemente, a contínua produção de progesterona. As contrações do miométrio são estimuladas pela liberação dos prostanóides embrionários, impulsionando a vesícula por toda a extensão do útero (GASTAL et al., 1998; KASTELIC; ADAMS; GINTHER, 1987).

Em ambiente uterino, a cápsula glicoproteica do blastocisto é secretada pelo trofotoderma, localizada entre este tecido embrionário e a zona pelúcida. Não é esclarecido se o útero é um ambiente favorável para a formação da cápsula ou se fornece elementos estruturais. A zona pelúcida desaparece após a conclusão da cápsula que aumenta de espessura até o dia 11 depois da ovulação (STEWART et al., 1995). A cápsula participa do reconhecimento materno devido ao seu contato intrínseco com o endométrio (STOUT; MEADOWS; ALLEN, 2005).

A cápsula permanece viável até 22 dias de gestação, considerando que fatores nutricionais uterinos necessitam atravessá-la para alcançar os tecidos embrionários (BETTERIDGE et al., 1982). A proteína 19 kDa não glicosilada é sintetizada pelos endométrio pela ação da progesterona e incorporada pela cápsula do embrião, operando como uma proteína transportadora de moléculas pequenas e hidrofóbicas entre mãe e concepto (CROSSETT; ALLEN; STEWART, 1996).

O contato físico e a pressão exercida pela vesícula também desempenha papel antiluteolítico conforme Rivera del Alamo et al. (2008) relata em seu estudo, onde utilizaram uma esfera composta de polipropileno com 20 mm repleta de água pesando

aproximadamente 3,6 gramas como dispositivo intrauterino. Das 12 éguas utilizadas, 9 (75%) apresentaram permanência do corpo lúteo primário e prolongamento da fase luteal.

O indicador precoce de gestação em equinos denominado *early pregnancy factor* (EPF) foi mensurado por Takagi et al. (1998) em éguas prenhes a partir de 2 dias de ovulação comparando os valores séricos com éguas não prenhes. O EPF é uma proteína estrutural e funcional classificada como proteína de choque térmico (CAVANAGH; MORTON, 1994), atribuída a regulação imunológica da prenhez e propriedades reguladoras de crescimento celular (MORTON et al., 1992; NOONAN et al., 1979). A dosagem de seu nível sérico na égua indica fertilização, esse método é utilizado para avaliar a viabilidade embrionária ou morte embrionária precoce (OHNUMA et al., 2000; TAKAGI et al., 1998).

As proteínas de choque térmico são abundantemente expressas na gestação, incluindo HSPB7 (heat shock protein family B (small) member 7), CRYAB (crystallin alpha B) e HSPB8 (heat shock protein family B (small) member 8), atribuídos a receptividade uterina e ao preparo do endométrio para o embrião (Klein et al., 2010).

Para auxiliar a modulação do desenvolvimento do embrião, Rambags et al. (2008) descreve a presença de receptores de hormônios esteroides no conceito no início da gestação, no momento em que há grande concentração de hormônios em seu meio. O embrião equino não expressa receptores intracelulares de progesterona, porém apresenta expressão para receptores na membrana plasmática, indicando a ação direta da progesterona no conceito. Não foi localizada expressão para receptor de estrógeno no núcleo celular e sim no trofotoderma extraembrionário que apresentou enzimas para a produção de estrógeno.

O sinal produzido pelo conceito para o reconhecimento materno da gestação não foi especificado, porém foram encontradas proteínas de massa molecular de 1 a 6 kDa (WEITHENAUER et al., 1987 apud STOUT, 2016) ou 3 a 10 kDa (ABABNEH et al., 2000). Além desses fatores, há diversos mediadores químicos gerados pelo embrião que regulam essa sinalização como os fatores de crescimento semelhantes à insulina (*Insulin-like growth factors* – IGF-1), estrógenos (WALTERS; ROSER; ANDERSON, 2001), prostaglandinas (STOUT; ALLEN, 2002), entre outros, capazes de alterar composição dos fatores secretados pelo útero, aumentar vascularização local e estimular

contração do miométrio responsável pela mobilidade embrionária (SILVA et al., 2005; STOUT; ALLEN, 2001).

Diversos fatores embrionários associados a fatores endometriais são necessários para manutenção da gestação, de modo que os elementos uterinos essenciais ao conceito podem ser ampliados pelo estrógeno embrionário (MCDOWELL; SHARP, 2011). De acordo com Walters et al. (2001), a fisiologia do embrião equino difere do suíno, pois os IGF-1 de origem endometrial e fetal não são estimulados diretamente pela produção embrionária de estrógeno, demonstrando que o modelo de reconhecimento materno nas éguas é distinto. O IGF-1 é encontrado dentro da blastocèle e possui importante papel como fator de crescimento celular, além de possivelmente participar da comunicação materno-fetal.

Os altos níveis de estrógeno e estrona presentes no lúmen uterino entre 10 e 20 dias de gestação podem estar associados ao aumento de produção de proteínas específicas pelo útero (ZAVY et al., 1984). As proteínas disponibilizadas pelo embrião e útero podem atuar efetivamente na comunicação, ativando receptores, enzimas ou hormônios (MCDOWELL et al., 1990).

Dentre as proteínas secretadas pelo estímulo da progesterona, a uterocalina pode ser detectada no diestro e início da gestação. Sua função é transportar moléculas pequenas e hidrofóbicas entre mãe e conceito através da cápsula do blastocisto, sendo mais evidentes nas glândulas endometriais entre 16 e 28 dias de gestação. A uteroglobina é altamente específica para ligações lipofílicas que pode influenciar na aquiescência uterina e implantação embrionária, protegendo o embrião do sistema imune da gestante. A uteroferrina possui função de carrear moléculas de ferro através da placenta e como fator de crescimento hematopoiético, tornando-se evidenciada em quantidades irrelevantes aos 16 dias e sua expressão aumenta apenas aos 38 dias no trofoblasto e alantocorion (ELLENBERGER et al., 2008). Segundo Zavy et al. (1982) a uteroferrina não é detectada na prenhez inicial ou antes de 12 dias após ovulação.

Presumivelmente, a migração do embrião pela extensão uterina deve ser realizada de modo repetitivo e constante com o propósito de suprimir adequadamente os fatores desencadeadores da luteólise (MCDOWELL et al., 1988). Vernon et al (1981), ao dosar quantidades expressivas de $PGF2\alpha$ no útero de éguas prenhes, constatou que esse prostanóide pode estar envolvido no reconhecimento materno-fetal ao invés da luteólise.

O embrião equino necessita percorrer toda a área uterina entre os dias 7 e 17 de gestação para garantir que seu fator de reconhecimento materno seja distribuído uniformemente por todo endométrio. Para isso secreta quantidades consideráveis de PGF2 α e PGE2 pela membrana coreovitelina, estimulando localmente as contrações da musculatura lisa uterina de forma peristáltica para impulsionar a vesícula (STOUT; ALLEN, 2002).

Em contrapartida, a mobilidade do embrião durante o início da gestação estabelece a diminuição da resposta aos receptores de ocitocina e da expressão da enzima COX-2 no endométrio, impedindo a produção de PGF2 α em quantidades suficientes para alcançar a circulação sistêmica e iniciar o processo luteolítico por volta de 12 a 13 dias após ovulação (EALY; EROH; SHARP, 2010).

Segundo Starbuck et al. (1998), a presença do embrião equino diminui a concentração de receptores de ocitocina no endométrio e sua capacidade de ligação aos mediadores entre os dias 10 e 16 de gestação. No entanto, Boerboom (2004) relata do que ao contrário do que ocorre nos ruminantes, os receptores de ocitocina permanecem elevados no período esperado de luteólise, referindo-se ao embrião como responsável na inibição da expressão de COX-2 e conseqüente liberação de PGF2 α .

Em conseqüência à sinalização embrionária, o fator inibidor da síntese de prostaglandina endometrial (EPSI) é expresso e contribui no bloqueio do processo de luteólise em complemento à diminuição da expressão dos receptores de ocitocina, impedindo a conversão do ácido araquidônico em PGF. Os dois mecanismos em conjunto são capazes de impedir a progressão da luteólise no início da gestação (GAIVÃO; STOUT, 2007; SHARP, 2000).

O gene receptor estrógeno 1 (estrogen receptor 1- ESR1) está envolvido na instituição da luteólise em éguas cíclicas e a diminuição da expressão gênica no endométrio aos 13,5 dias de gestação é autorregulada negativamente pelo estrógeno liberado do próprio embrião (Klein et al., 2010).

Para Bazer et al. (1986) as secreções sintetizadas pelo embrião poderiam ter função antiluteolítica ou luteotrófica. Porém, Klein e Troedsson (2011) relataram que o reconhecimento materno fetal resulta em fatores de característica antiluteolítica ao invés de inibir a ação da prostaglandina nos receptores luteais ou no suporte funcional ao CL

(luteotrófico). Considerando a diminuição na liberação de $\text{PGF2}\alpha$ e não a inibição em decorrência da presença do embrião no útero.

Watson e Sertich (1989) observaram a menor concentração de $\text{PGF2}\alpha$ no meio contendo células endometriais provenientes de éguas prenhes juntamente com o embrião comparado ao endométrio de éguas ciclantes, verificando a produção embrionária de prostaglandinas F, E2 e I2, importantes na sinalização uterina, sendo que a PGE2 e PGI2 demonstraram ter ação antagonista à luteólise em outras espécies domésticas.

De acordo com Weber et al. (1992), a luteólise pode ser impedida pela liberação de PGE2 embrionária no útero, pois participa do processo de reconhecimento materno-fetal. A PGE em espécies domésticas desempenha papel antiluteolítico, como em ovelhas (MAGNESS et al., 1981) e porcas (FORD; CHRISTENSON, 1991). Segundo Stout e Allen (2002), apesar de não haver comprovação científica da função da PGE no endométrio da égua, grandes concentrações dessa prostaglandina são encontradas no lúmen uterino até 20 dias de gestação.

Em um estudo relatado por Klein et al. (2010), avaliando os genes envolvidos com motilidade celular, comunicação celular, ligação de proteínas e resposta a estímulos do endométrio em éguas no início da gestação e não prenhes, 106 genes foram mais expressos (*up-regulated*) e 47 genes foram menos expressos (*down-regulated*) em éguas prenhes. O estrógeno ativa 27% dos genes mais expressos e inibe 31% dos genes menos expressos. Entre os genes mais expressos estão: SLC36A2 (transporte celular) e GM2A (ativador de gangliosídeo) que é a proteína mais expressa no trofoblasto do concepto até 18 dias, responsável pelo transporte de lipídeos, descrita para uterocalina.

Ao avaliar o endométrio de éguas prenhes entre os dias 8 e 12 de gestação Merkl et al. (2010) observaram aumento da expressão dos receptores de PGE: PTGER3 e PTGER4. Além da PGE originada no embrião, o endométrio também sintetiza esse prostanoide com base no aumento da expressão de PTGES no início da gestação, auxiliando a produção embrionária a fim de estimular a contração uterina (BOERBOOM, 2004).

Cultivo celular de endométrio na presença de embrião deprimiu a síntese de PGF, mas as concentrações de PGE e 6-keto-PGF-1 α permaneceram elevadas (WATSON;

SERTICH, 1989). A PGE2 é considerada estimuladora da mitose celular (mitogênese) e da proliferação endotelial para formação de novos vasos sanguíneos, imunomoduladora e anti-apoptótica (TSUJII et al., 1998; TSUJII; DUBOIS, 1995).

A enzima COX-2 foi encontrada em grandes quantidades em endométrio de éguas ciclantes no dia 15 após ovulação, diferentemente de éguas gestantes em que a expressão foi menor, associado à supressão de PGF2 α uterina. O embrião promove diretamente dessensibilização (*downregulation*) da COX-2 (BOERBOOM, 2004).

A COX-1 é considerada constitutiva ou endógena e participa do metabolismo fisiológico de diversos tecidos no organismo, enquanto a COX-2 é classificada como indutiva (HABENICHT et al., 1985). A ativação da COX-2 pode ocorrer por meio de fatores de crescimento tumoral (DE LEDINGHEN et al., 2002), hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) (SIROIS; SIMMONS; RICHARDS, 1992), citocinas inflamatórias (JONES et al., 1993) e endotoxinas provenientes de macrófagos (MONICK et al., 2002).

A expressão gênica da COX-1 no endométrio de éguas prenhes é aumentada devido à presença de estrógeno no início da gestação (18 dias), visto que sua máxima concentração é alcançada aos 22 dias. Considerando a diminuição na expressão da COX-2 nessa fase, a COX-1 é a principal enzima que fornece PGH2 para PTGFS e PTGES, similarmente mais expressas, resultando em produção de prostaglandinas uterinas no início da gestação. O aumento do receptor PTGER2 está envolvido no relaxamento do útero assim como na receptividade e, apesar da produção uterina de PGF o receptor PTGFR é suprimido (ATLI et al., 2010).

Embriões de 10 a 32 dias encubados em cultivo celular produziram quantidades significantes de PGF2 α e PGE2, sendo que os maiores níveis encontrados dos prostanóides foram aos 10 dias, a PGF2 α caiu aos 14 dias e permaneceu em níveis basais e a PGE2 permaneceu relativamente alta. Porém ao adicionar FM, AINE inibidor de COX-1 e COX-2, no cultivo de embriões de 14 dias houve redução apenas nas concentrações de PGE2 no meio, sendo preservada a liberação de PGF2 α (STOUT; ALLEN, 2002).

Desse modo, as prostaglandinas provenientes do embrião estimulam a contração da musculatura lisa uterina que comprime a vesícula e a impulsiona pelo lúmen,

distribuindo fatores de reconhecimento materno por toda extensão do endométrio (MCDOWELL et al., 1988), incluindo estrógeno, INF δ , IGF-1, EPF, uterocalina, uteroglobina, entre outras proteínas que são capazes de modificar o ambiente uterino para que o embrião se desenvolva adequadamente.

2.2.1 Mobilidade embrionária durante a gestação em égua

O embrião migra para o útero aos 8 dias permanecendo móvel até 15 a 17 dias, podendo ser encontrado desde a ponta do corno uterino à cérvix, desse modo é importante que o diagnóstico de gestação seja realizado por todo o útero. Foi observado que o conceito pode ir de um corno uterino ao outro de 10 a 20 vezes em um dia, suportando contrações endometriais a cada 5 a 14 segundos. Sua resistência é atribuída à elasticidade da cápsula e do saco vitelino (GINTHER, 1998).

O tamanho e crescimento adequados da vesícula embrionária é uma condição para que ocorra o reconhecimento materno-fetal (GINTHER, 1983), pois o atraso no desenvolvimento é a maior causa de perda embrionária precoce nessa fase (GINTHER, 1985).

Ginther (1983) determinou por ultrassonografia transretal realizada 3 ou 4 vezes por dia, a localização do embrião e observaram mobilidade entre os dias 11 e 15 de gestação. Na presença de duas vesículas embrionárias, o acompanhamento ultrassonográfico sugeriu que cada embrião tem seu próprio padrão de mobilidade. A migração do conceito começou a diminuir no dia 15 de gestação e cessou aos 17 dias, visto que a fixação ocorreu no corno uterino contralateral à prenhez registrada anteriormente.

Em um experimento conduzido por Leith e Ginther (1984), a mobilidade do embrião foi analisada a partir de palpação transretal seriada do útero acompanhada de ultrassonografia a cada 5 minutos. O registro da localização do conceito foi realizado baseado em desenho esquemático de útero dividido em 9 partes: cada corno e corpo foram divididos em 3 partes. Inicialmente nos dias 9 e 10 de gestação o conceito foi encontrado com maior frequência no corpo do útero.

A contração uterina é observada prevalentemente no segmento uterino que está em contato com o embrião recebendo estímulos químicos de forma direta e, após a

movimentação da vesícula, a intensidade de contrações locais é diminuída, sugerindo que o fator embrionário (prostaglandina) possui ação de curta duração. A administração de estrógeno em éguas prenhes não induz o aumento da contratilidade uterina, indicando que não há interferência desse hormônio na estimulação das contrações do miométrio relacionadas ao embrião (GRIFFIN; GINTHER, 1993).

As prostaglandinas PGE2 e PGF2 α são encontradas em grandes quantidades no saco vitelino e líquido alantoidiano de embriões a partir de 10 dias de gestação. Após inibição das ciclooxigenases de embriões com 14 dias pelo anti-inflamatório não esteroide flunixin meglumine (FM), a queda significativa da PGE2 indica interrupção da produção contínua (de novo) pelo embrião enquanto a PGF2 α continuou em altas concentrações no meio, sugerindo liberação da prostaglandina pré-formada (STOUT; ALLEN, 2002).

Aos 18 dias de idade o embrião equino produz predominantemente a PGE2, apresentando maior atividade no período após fixação e início da implantação. A PGF2 α é sintetizada em maior quantidade no momento referente à mobilidade embrionária (até 16 dias) estimulando a contração do miométrio responsável pelo deslocamento da vesícula embrionária. A PGF2 α de origem embrionária possui efeito local e não atinge a circulação sistêmica (STOUT; ALLEN, 2001, 2002). Aplicação de PGE2 intrauterina aumentou a contratilidade e tônus do miométrio, constatando sua influência na migração do concepto (GASTAL et al., 1998; GINTHER, 1998).

Comprovando a atividade das prostaglandinas na mobilidade embrionária, Stout e Allen (2001) administraram AINE inibidor das enzimas COX-1 e COX-2 FM em éguas com 12 e 14 dias de gestação, observando queda significativa da quantidade de movimentos embrionários. A maior probabilidade é a produção de prostaglandina pela região do endométrio em contato direto com o embrião, suficiente para estimular a contração local.

Para demonstrar que a interação entre embrião e todo o endométrio é fundamental para o reconhecimento materno e inibição da luteólise, McDowell et al. (1988) em seu estudo limitaram o espaço para a migração embrionária com ligaduras no útero e registraram morte embrionária precoce nos grupos onde o embrião tinha acesso a um corno uterino ou a um corno com o corpo uterino. As gestações tiveram continuidade

quando os embriões tinham disponibilidade de um corno uterino, corpo e 80% do corno contralateral.

2.3 USO DE ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDES EM RECEPTORAS DE EMBRIÃO

2.3.1 Tipos de AINEs

Os AINEs são ácidos orgânicos fracos (CHAHADE, 2008). Seu mecanismo terapêutico pode ter ação central (analgésico e antipirético) e periférica como nas reações inflamatórias teciduais, atividade antitrombótica, analgesia e antiendotóxica. Sua principal consequência é a inibição das ciclooxigenases e lipoxigenases, impedindo a degradação do ácido araquidônico. O pH baixo dos tecidos inflamados favorecem a concentração de AINEs no local, aumentando a sua afinidade pela lesão (TASAKA, 2006).

São utilizados como primeira escolha nos tratamentos de afecções inflamatórias (SIMMONS; BOTTING; HLA, 2004). A maioria dos AINEs atua na inibição da ciclooxigenase e sua ação terapêutica está relacionada ao bloqueio, em diferentes proporções, das enzimas COX-1 e COX-2, podendo ser classificados como COX não seletivo, COX-2 preferencial e COX-2 seletivo de acordo com a especificidade de ação (TASAKA, 2006). A inibição da COX-2 (indutiva) pelos AINEs elucida seu benefício terapêutico. Contudo, o bloqueio realizado na COX-1 (constitutiva) é associado aos efeitos colaterais dos medicamentos, principalmente no estômago e rins (Mitchell et al., 1993).

2.3.1.1 Flunixin Meglumine

O FM é classificado como ácido aminonicotínico, sua ação está relacionada à diminuição das prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Sua grande eficácia antiinflamatória e analgésica pode transpor a falsa melhora do animal, considerada 4 vezes mais potente do que a fenilbutazona, com meia vida de 2 horas nos equinos (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006).

Apesar de sua meia-vida curta, o FM possui efeitos farmacológicos acima de 30 horas após aplicação única. Ao aplicar a dose de 1 mg/kg via intravenosa, a concentração plasmática subiu imediatamente para 10 µg/ml e diminuiu para 5 µg/ml

após 12 minutos da aplicação, níveis basais de 0,1 µg/ml foram alcançados dentro de 12 horas (CHAY et al., 1982).

Em um estudo realizado por Beretta et al. (2005) observou que em uma concentração de FM suficientes para inibir 80% das enzimas COX-2, bloqueou 83,81% as enzimas COX-1.

2.3.1.2 Firocoxib

O firocoxib (FIRO) é um AINE da segunda geração dos coxibs, considerado um inibidor altamente seletivo para a COX-2, 265 vezes mais seletivo para COX-2 do que para a COX-1 no equino (MCCANN et al., 2004). A dose recomendada para equinos é de 0,1 mg/kg uma vez ao dia, sua meia-vida é longa (31,5 horas) (COX et al., 2012).

Somente a inibição da COX-2 é suficiente para debelar a reação causada por algum processo inflamatório, prevenindo os efeitos colaterais indesejáveis relacionados com a inibição da COX-1. Porém em uso contínuo, a inibição da COX-2 também apresenta efeitos indesejáveis como diminuição do fluxo sanguíneo e supressão da produção de PGE pela mucosa gástrica (BRZOZOWSKI et al., 2001)

Em equinos, a biodisponibilidade do FIRO atinge o pico sérico 3,9 horas após administração oral. Devido a sua meia-vida de 30 horas, a frequência de aplicação se faz necessária uma vez ao dia. O princípio ativo é difusamente distribuído por todo o organismo do animal em razão de sua característica lipofílica. A dose terapêutica de 0,2mg/kg pode ser utilizada em equinos (KVATERNICK et al., 2007).

2.3.1.3 Meloxicam

O meloxicam (ML) pertence ao grupo dos oxicans, inibindo preferencialmente a COX-2 com meia vida de aproximadamente 3 horas em equinos. Esse fármaco impede a liberação de prostaglandinas e tromboxanos, com ótimas propriedades analgésicas e antipiréticas (TASAKA, 2006).

Em uma concentração eficiente para inibir 80% das enzimas COX-2, o ML se ligou a 70,97% dos receptores de COX-1 (BERETTA; GARAVAGLIA; CAVALLI, 2005). Sua estrutura enol-carboxamida possui um grupo 5-metil no anel tiazolil da molécula, que possui maior afinidade pelo sítio de ligação da enzima COX-2 (SIMMONS; BOTTING; HLA, 2004).

Comparado ao FM e fenilbutazona, o ML possui afinidade 5 a 12 vezes maior pela COX-2 no equino, sua aplicação intravenosa ou oral pode ser realizada por até 14 dias consecutivos em tratamentos antiinflamatórios na dose de 0,6 mg/kg, considerando meia-vida de 5 horas. Os efeitos colaterais também são diminuídos e permite a correta recuperação do sistema gastrointestinal quando há lesões (BURNS et al., 2010).

Apesar de sua utilização segura, pelo fato de ser COX-2 preferencial sua dose terapêutica sempre vai ocasionar diminuição da ação da COX-1 durante o tratamento (BROOKS et al., 1999).

2.3.2 Principais AINEs utilizados na reprodução e seus efeitos

O efeito dos AINEs na medicina veterinária equina, particularmente na reprodução, tem sido analisado por diversos pesquisadores, principalmente o FM (Caiado et al., 2005; Cuervo-Arango e Domingo-Ortiz, 2011; Koblischke et al., 2008; Resende, 2009; Risco et al., 2009; Stout e Allen, 2001, 2002; Wilde et al., 1989), assim como o ácido mefenâmico (CABRERA, 2012; KOBLISCHKE et al., 2008), meloxicam (Lima et al., 2015; Pinto et al., 2017) e firocoxib (Friso et al., 2016; Giguère et al., 2015).

O tratamento com FM com aplicação sistêmica de altas doses na frequência de duas vezes ao dia iniciada quando a égua apresentava folículos maiores que 32 mm promoveu o desenvolvimento de folículo anovulatório hemorrágico em 83% dos animais (5/6) contra nenhuma do grupo controle (CUERVO-ARANGO; DOMINGO-ORTIZ, 2011).

Koblischke et al. (2008) realizaram tratamento antiinflamatório em éguas no intuito de conter a inflamação endometrial causada de TE. Os AINEs FM e ácido mefenâmico (AM) foram aplicados a partir de 1 dia antes da TE duas vezes ao dia até completar 4 dias após procedimento. Os tratamentos foram efetivos na diminuição da resposta inflamatória uterina e nos níveis séricos de PGFM, porém não houve diferença entre os grupos que receberam AINE e o controle em relação à expressão de COX-2 no endométrio.

O tratamento com uma única aplicação de FM em éguas receptoras de embrião 15 minutos antes da TE influenciou na concentração sérica de progesterona, sendo maior no grupo tratado em comparação com as éguas que não receberam medicação. Porém, a

taxa de gestação foi maior no grupo controle (75%) do que no grupo tratado (55%), demonstrando a ineficiência do tratamento (CAIADO et al., 2005).

A terapia elaborada por Resende (2009) consistiu em aplicar FM 6 e 3 horas antes de realizar manipulação da cérvix, resultando em menor concentração plasmática de PGFM nas éguas tratadas. Porém após tratamento com FM em éguas com endometrite não foi observada melhora na inflamação uterina. Para avaliar a influência do FM na taxa de prenhez de éguas receptoras foi administrado FM logo após a TE, resultando em 72,15% de éguas gestantes no grupo controle e 58,13% no grupo tratado.

Ao estudar tratamento com FIRO, Giguère et al. (2015) relata que o uso desse AINE em éguas prenhes entre os dias 306 e 343 de gestação e 12 a 33 dias pós-parto não evidenciou efeitos colaterais referentes ao tratamento, com partos eutócicos e potros saudáveis. Friso et al. (2016) relataram que o uso do FIRO não influenciou na taxa de ovulação em éguas e na taxa de recuperação embrionária, diferentemente de outros AINEs, como FM e ML.

Em éguas que manifestaram endometrite persistente pós-cobertura e receberam o AINE vedaprofen com ação em COX-2, não apresentaram melhora no quadro inflamatório analisado por citologia uterina, com resultados semelhantes ao grupo controle (ROJER; AURICH, 2010).

A utilização de ML e fenilbutazona em éguas com folículos maiores que 32 mm, causou formação de 91% e 82%, respectivamente, de folículos anovulatórios luteinizados devido ao bloqueio das enzimas ciclooxigenases na produção de prostaglandinas importantes no processo ovulatório (LIMA et al., 2015).

Em bovinos, o FM não apresentou diferença na taxa de prenhez quando aplicado nos dias 14 a 16 após inseminação artificial (RABAGLINO et al., 2010; VON KRUEGER; HEUWIESER, 2010), porém quando aplicado no momento da TE a taxa de gestação nas receptoras foi maior. Isso se deve ao efeito prejudicial da PGF2 α presente no lúmen uterino no desenvolvimento do embrião bovino (PURCELL et al., 2005; SCENNA et al., 2005).

Na transferência de embriões em camelos, o ácido meclofenâmico pode ser utilizado para retardar o processo de luteólise em receptoras de embrião, contudo o FM não obteve resultados semelhantes. O FM aplicado 15 minutos antes da TE em receptoras

reduziu a taxa de prenhez significativamente (16%) comparado com o controle (67%), pois reduz a motilidade uterina e os movimentos embrionários, podendo prejudicar o reconhecimento materno da gestação, processo semelhante aos equinos (SKIDMORE, 2006).

Concluimos que o reconhecimento materno da gestação em equinos é complexo e depende de diversos fatores, embrionários e uterinos, que atuam simultaneamente para garantir a eficácia do processo e a continuidade da gestação, não dependendo necessariamente de um fator primordial, mas sim do conjunto de todos os elementos.

3. REFERÊNCIAS

ABABNEH, M.; TROEDSSON, M.; MICHELSON, J.; SEGUIN, B. Partial characterization of an equine conceptus prostaglandin inhibitory factor. **Journal of reproduction and fertility. supplement**, v. 65, p. 607–613, 2000. Abstract.

ALLEN, W. R.; ROWSON, L. E. A. Control of the Mare's Oestrous Cycle by Prostaglandins. *Journal of reproduction and fertility*, v. 33, p. 539–543, 1973.

ATLI, M. O.; KURAR, E.; KAYIS, S. A.; ASLAN, S.; SEMACAN, A.; CELIK, S.; GUZELOGLU, A. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1–2, p. 124–132, 2010.

AXELROD, J.; BURCH, R. M.; JELSEMA, C. L. Receptor-mediated activation of phospholipase A2 via GTPbinding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers. **Tins**, v. 11, p. 117–123, 1988.

BARNES, R. J.; COMLINE, R. S.; JEFFCOTT, L. B.; MITCHELL, M. D.; ROSSDALE, P. D.; SILVER, M. Foetal and Maternal Plasma Concentrations of 13,14-Dihydro-15-Oxo-Prostaglandin F in the Mare During Late Pregnancy and at Parturition. **Journal of Endocrinology**, v. 78, p. 201–215, 1978.

BAZER, F. W.; ROBERTS, J. L.; VALLET, R. M.; SHARP, D. C.; THATCHER, W. W. Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy. *Journals of Reproduction & Fertility Ltd.*, 1986.

BERETTA, C.; GARAVAGLIA, G.; CAVALLI, M. COX-1 and COX-2 inhibition in

horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: An in vitro analysis. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 4, p. 302–306, 2005.

BERRIDGE, M. J.; IRVINE, R. F. Inositol Trisphosphate, a Novel Second Messenger in Cellular Signal Transduction. **Nature**, v. 312, n. 22, p. 315–321, 1984.

BETTERIDGE, K. J.; EAGLESOME, M. D.; MITCHELL, D.; FLOOD, P. F.; BERIAULT, R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. **Journal of anatomy**, v. 135, n. Pt 1, p. 191–209, 1982.

BOERBOOM, D. Expression of Key Prostaglandin Synthases in Equine Endometrium During Late Diestrus and Early Pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 2, p. 391–399, 2004.

BOERBOOM, D.; SIROIS, J. Molecular characterization of equine prostaglandin G/H synthase-2 and regulation of its messenger ribonucleic acid in preovulatory follicles. **Endocrinology**, v. 139, n. 4, p. 1662–1670, 1998.

BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; HINRICHS, K.; DAVID L. HARTMAN. **Manual of equine reproduction**. terceira edição, 2011.

BROOKS, P.; EMERY, P.; EVANS, J. F.; FENNER, H.; HAWKEY, C. J.; PATRONO, C.; SMOLEN, J.; BREEDVELD, F.; DAY, R.; DOUGADOS, M.; EHRICH, E. W.; GIJON-BAÑOS, J.; KVIEN, T. K.; VAN RIJSWIJK, M. H.; WARNER, T.; ZEIDLER, H. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 38, n. 8, p. 779–788, 1999.

BRZozowski, T.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; SLIWOWSKI, Z.; PAJDO, R.; DROZDOWICZ, D.; PTAK, A.; HAHN, E. G. Classic NSAID and selective cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibitors in healing of chronic gastric ulcers. **Microscopy Research and Technique**, v. 53, n. 5, p. 343–353, 2001.

BURNS, P. J.; MORROW, C.; GILLEY, R. M.; PAPICH, M. G. Evaluation of Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships for BioRelease Meloxicam Formulations in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n. 10, p. 539–

544, 2010.

CABRERA, T. Uso do ácido mefenâmico em receptoras de embriões equinos. Tese mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), 2012.

CAIADO, J. R. C.; FONSECA, F. A.; SILVA, J. F. S.; CAIADO, J. C. C.; FONTES, R. da S. Aplicação do flunixin meglumine antes da transferência não-cirúrgica de embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador Application of flunixin meglumine before nonsurgical embryo transfer in Mangalarga Marchador breed mares. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, p. 11–15, 2005.

CAVANAGH, A. C.; MORTON, H. The purification of early pregnancy factor to homogeneity from human platelets and identification as chaperonin 10. **European Journal of Biochemistry**, v. 222, n. 2, p. 551–560, 1994.

CHAHADE, W. Antiinflamatórios não hormonais. **Einstein**, v. 6, n. Supl 1, p. 166–174, 2008.

CHAY, S.; WOODS, W. .; NUGENT, T.; BLAKE, J. M.; TOBIN, T. The pharmacology of Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the Horse: Flunixin Meglumine (Banamine). **Equine Practice**, 1982. .

COCHET, M.; VAIMAN, D.; LEFÈVRE, F. Novel interferon delta genes in mammals: Cloning of one gene from the sheep, two genes expressed by the horse conceptus and discovery of related sequences in several taxa by genomic database screening. **Gene**, v. 433, n. 1–2, p. 88–99, 2009.

COX, S.; DUDENBOSTEL, L.; SOMMARDAHL, C.; YARBROUGH, J.; SALEH, M.; DOHERTY, T. Pharmacokinetics of firocoxib and its interaction with enrofloxacin in horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, n. 6, p. 615–617, 2012.

CROSSETT, B.; ALLEN, W. R.; STEWART, F. A 19 kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. **Biochemical Journal**, v. 320, p. 137–143, 1996.

CUERVO-ARANGO, J.; DOMINGO-ORTIZ, R. Systemic treatment with high dose of flunixin-meglumine is able to block ovulation in mares by inducing hemorrhage and

luteinisation of follicles. **Theriogenology**, v. 75, n. 4, p. 707–714, 2011.

DE LEDINGHEN, V.; LIU, H.; ZHANG, F.; LO, C. R.; SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A. J.; CZAJA, M. J. Induction of cyclooxygenase-2 by tumor promoters in transformed and cytochrome P450 2E1-expressing hepatocytes. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 1, p. 73–79, 2002.

EALY, A. D.; EROH, M. L.; SHARP, D. C. Prostaglandin H synthase Type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 1–2, p. 99–105, 2010.

ELLENBERGER, C.; WILSHER, S.; ALLEN, W. R.; HOFFMANN, C.; KÖLLING, M.; BAZER, F. W.; KLUG, J.; SCHOON, D.; SCHOON, H. A. Immunolocalisation of the uterine secretory proteins uterocalin, uteroferrin and uteroglobin in the mare's uterus and placenta throughout pregnancy. **Theriogenology**, v. 70, n. 5, p. 746–757, 2008.

FORD, S. P.; CHRISTENSON, L. K. Direct effects of oestradiol-17 beta and prostaglandin E-2 in protecting pig corpora lutea from a luteolytic dose of prostaglandin F-2 alpha. **Journal of reproduction and fertility Ltd**, v. 93, p. 203–209, 1991.

FRISO, A. M.; CYRINO, M. A.; TEORO, M. T.; ALVARENGA, M. A. Effect of firocoxib on ovulation and fertility rates of embryo donor mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 41, n. 2016, p. 74, 2016.

GAIVÃO, M. M. F.; STOUT, T. A. E. Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare – a Mini Review. **Revista Lusófona Ciência e Medicina Veterinária**, v. 1, p. 5–9, 2007.

GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; TORRES, C. A. A.; GINTHER, O. J. Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares. **Theriogenology**, v. 50, n. 7, p. 989–999, 1998.

GIGUÈRE, S.; MACPHERSON, M. L.; BENSON, S. M.; COX, S.; MCNAUGHTEN, J. W.; POZOR, M. A. Disposition of firocoxib in late pregnant and early postpartum mares. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 39, n. 2, p. 196–198, 2015.

GINTHER, O. J. Embryonic loss in mares: incidence, time of occurrence, and hormonal involvement. **Theriogenology**, v. 23, n. 1, p. 77–89, 1985.

GINTHER, O. J. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 19, n. 4, p. 401–408, 1983.

GINTHER, O. J. Equine Pregnancy: Physical interactions between uterus and conceptus. **AAEP proceedings**, v. 44, p. 73–104, 1998.

GIRSH, E.; WANG, W.; MAMLUK, R.; ARDITI, F.; FRIEDMAN, A.; MILVAE, R. A.; MEIDAN, R. Regulation of Endothelin-1 Expression in the Bovine Corpus Luteum: Elevation by Prostaglandin F2-alpha. **Endocrinology**, v. 137, n. 12, p. 5191–5196, 1996.

GRIFFIN, P. G.; GINTHER, O. J. Effects of day of estrus cycle, time of day, luteolysis, and embryo on uterine contractility in mares. **Theriogenology**, v. 39, 1993.

HABENICHT, A. J. R.; GOERIG, M.; GRULICH, J.; ROTHE, D.; GRONWALD, R.; LOTH, U.; SCHETTLER, G.; KOMMERELL, B.; ROSS, R. Human platelet-derived growth factor stimulates prostaglandin synthesis by activation and by rapid de novo synthesis of cyclooxygenase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75, n. 4, p. 1381–1387, 1985.

HAMBERG, M.; SVENSSON, J.; WAKABAYASHI, T.; SAMUELSSON, B. Isolation and Structure of Two Prostaglandin Endoperoxides That Cause Platelet Aggregation. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 71, n. 2, p. 345–349, 1974.

HARTMAN, D. L. Embryo Transfer. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. (Ed.). **Equine Reproduction**. segunda edição, p. 2071–2079.2011.

HELMER, S. D.; GROSS, T. S.; NEWTON, G. R.; HANSEN, P. J.; THATCHER, W. W. Bovine trophoblast protein-1 complex alters endometrial protein and prostaglandin secretion and induces an intracellular inhibitor of prostaglandin synthesis in vitro. **J. Reprod. Fert.**, v. 87, p. 421–430, 1989.

HIGGINS, A. J.; LEES, P. The acute inflammatory process, arachidonic acid metabolism and the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Equine Veterinary**

Journal, v. 16, n. 3, p. 163–175, 1984.

JONES, D. A.; CARLTON, D. P.; MCINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 12, p. 9049–9054, 1993.

KASK, K.; ODENSVIK, K.; KINDAHL, H. Prostaglandin F_{2α} release associated with an embryo transfer procedure in the mare. **Equine Veterinary Journal**, 1997. .

KASTELIC, J. P.; ADAMS, G. P.; GINTHER, O. J. Role of progesterone in mobility, fixation, orientation, and survival of the equine embryonic vesicle. **Theriogenology**, v. 27, n. 4, p. 655–663, 1987.

KLEIN, C.; SCOGGIN, K. E.; EALY, A. D.; TROEDSSON, M. H. T. Transcriptional profiling of equine endometrium during the time of maternal recognition of pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 1, p. 102–113, 2010.

KLEIN, C.; TROEDSSON, M. H. T. Maternal recognition of pregnancy in the horse: A mystery still to be solved. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 8, p. 952–963, 2011.

KOBLISCHKE, P.; KINDAHL, H.; BUDIK, S.; AURICH, J.; PALM, F.; WALTER, I.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; HOPPEN, H. O.; AURICH, C. Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. **Theriogenology**, v. 70, n. 7, p. 1147–1158, 2008.

KVATERNICK, V.; POLLMEIER, M.; FISCHER, J.; HANSON, P. D. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, n. 3, p. 208–217, 2007.

LEITH, G. S.; GINTHER, O. J. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 22, 1984.

LIMA, A. G.; COSTA, L. C. B.; ALVARENGA, M. A.; MARTINS, C. B. Does Clinical Treatment with Phenylbutazone and Meloxicam in the Pre-ovulatory Period

Influence the Ovulation Rate in Mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 5, p. 771–775, 2015.

LUONG, C.; MILLER, A.; BARNETT, J.; CHOW, J.; RAMESHA, C.; BROWNER, M. F. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. **Nature Structural Biology**, v. 3, p. 927–933, 1996.

MAGNESS, R. R.; HUIE, J. M.; HOYER, G. L.; HUECKSTEADT, T. P.; REYNOLDS, L. P.; SEPERICH, G. J.; WHYSONG, G.; WEEMS, C. W. Effect of chronic ipsilateral or contralateral intrauterine infusion of prostaglandin E2 (PGE2) on luteal function of unilaterally ovariectomized ewes. **Prostaglandins and Medicine**, v. 6, p. 389–401, 1981.

MCCANN, M. E.; ANDERSEN, D. R.; ZHANG, D.; BRIDEAU, C.; BLACK, W. C.; HANSON, P. D.; HICKEY, G. J. In vitro effects and in vivo efficacy of a novel cyclooxygenase-2 inhibitor in dogs with experimentally induced synovitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 4, p. 503–512, 2004.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C. Maternal Recognition of pregnancy. In: **Equine Reproduction**. segunda edição, p. 2200–2210.2011.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; FAZLEABAS, a T.; ROBERTS, R. M. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins synthesized and released by conceptuses and endometria from pony mares. **Journal of reproduction and fertility**, v. 89, n. 1, p. 107–115, 1990.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; GRUBAUGH, W.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Restricted Conceptus Mobility Results in Failure of Pregnancy Maintenance in Mares. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 340–348, 1988.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; PECK, L. S.; CHEVES, L. L. Short Report - Effect of restricted conceptus mobility on maternal recognition of pregnancy in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, n. 53, p. 23–24, 1985.

MCLEAN, M. P.; BILLHEIMER, J. T.; WARDEN, K. J.; IRBY, R. B. Prostaglandin f2-alpha mediates ovarian sterol carrier protein-2 expression during luteolysis. **Endocrinology**, v. 136, n. 11, p. 4963–4972, 1995.

MERKL, M.; ULBRICH, S. E.; OTZDORFF, C.; HERBACH, N.; WANKE, R.; WOLF, E.; HANDLER, J.; BAUERSACHS, S. Microarray analysis of equine endometrium at days 8 and 12 of pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 5, p. 874–86, 2010.

MITCHELL, J. A.; AKARASEREENONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R. J.; VANE, J. R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 24, p. 11693–11697, 1993.

MONICK, M. M.; ROBEFF, P. K.; BUTLER, N. S.; FLAHERTY, D. M.; BRENT CARTER, A.; PETERSON, M. W.; HUNNINGHAKE, G. W. Phosphatidylinositol 3-kinase activity negatively regulates stability of cyclooxygenase 2 mRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 36, p. 32992–33000, 2002.

MORTON, H.; CAVANAGH, A. C.; ATHANASAS-PLATSI, S.; QUINN, K. A.; ROLFE, B. E. Early pregnancy factor has immunosuppressive and growth factor properties. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 4, p. 411–422, 1992.

NEEDLEMAN, P.; TRUK, J.; JAKSCHIK, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKOWITH, J. B. Arachidonic Acid Metabolism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 69–102, 1986.

NEELY, D. P.; STABENFELDT, G. H.; SAUTER, C. L. The effect of exogenous oxytocin on luteal function in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 55, n. 6, p. 303–308, 1979.

NOONAN, F. P.; HALLIDAY, W. J.; MORTON, H.; CLUNIE, G. J. A. Early pregnancy factor is immunosuppressive. **Nature**, v. 278, p. 649–651, 1979.

OHNUMA, K.; YOKOO, M.; ITO, K.; NAMBO, Y.; MIYAKE, Y. I.; KOMATSU, M.; TAKAHASHI, J. Study of early pregnancy factor (EPF) in equine (*Equus caballus*). **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 43, n. 3, p. 174–9, 2000.

ORIOLE, J. G.; SHAROM, F. J.; BETTERIDGE, K. J. Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 653–664, 1993.

PINTO, M. R.; MIRAGAYA, M. H.; BURNS, P.; DOUGLAS, R.; NEILD, D. M. Strategies for increasing reproductive efficiency in a commercial embryo transfer program with high performance donor mares under training. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.54, p.93-97, 2017.

PURCELL, S. H.; BEAL, W. E.; GRAY, K. R. Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine, administered at the time of embryo transfer, on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. **Theriogenology**, v. 64, n. 4, p. 867–878, 2005.

RABAGLINO, M. B.; RISCO, C. A.; THATCHER, M. J.; LIMA, F.; SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W. Use of a five-day progesterone-based timed AI protocol to determine if flunixin meglumine improves pregnancy per timed AI in dairy heifers. **Theriogenology**, v. 73, n. 9, p. 1311–1318, 2010.

RAMBAGS, B. P. B.; VAN TOL, H. T. A.; VAN DEN ENG, M. M.; COLENBRANDER, B.; STOUT, T. A. E. Expression of progesterone and oestrogen receptors by early intrauterine equine conceptuses. **Theriogenology**, v. 69, n. 3, p. 366–375, 2008.

RESENDE, Á. M. D. E. Efeito do tratamento anti- inflamatório na histologia endometrial, produção de prostaglandina e taxa de gestação após transferência de embriões e / ou manipulação cervical em éguas. Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2009.

RISCO, A. M.; REILAS, T.; MUILU, L.; KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Effect of oxytocin and flunixin meglumine on uterine response to insemination in mares. **Theriogenology**, v. 72, n. 9, p. 1195–1201, 2009.

RIVERA DEL ALAMO, M. M.; REILAS, T.; KINDAHL, H.; KATILA, T. Mechanisms behind intrauterine device-induced luteal persistence in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 1–2, p. 94–106, 2008.

ROJER, H.; AURICH, C. Treatment of persistent mating-induced endometritis in mares with the non-steroid anti-inflammatory drug vedaprofen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. 2009–2011, 2010.

SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. o. **Current Therapy In Equine**

Reproduction. primeira edição. saunders elsevier, 2007.

SAMUELSSON, B.; GOLDYNE, M.; GRANSTROM, E.; HAMBERG, M.; HAMMARSTROM, S.; MALMSTEN, C. Prostaglandins and Thromboxanes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 47, p. 997–1029, 1978.

SCENNA, F. N.; HOCKETT, M. E.; TOWNS, T. M.; SAXTON, A. M.; ROHRBACH, N. R.; WEHRMAN, M. E.; SCHRICK, F. N. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 78, n. 1–4, p. 38–45, 2005.

SHARP, D. C. The early fetal life of the equine conceptus. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 679–689, 2000.

SHIMIZU, T.; WOLFE, L. S. Review: Arachidonic Acid Cascade and Signal Transduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 55, No 1, p. 1–15, 1990.

SILVA, L. A.; GASTAL, E. L.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Changes in Vascular Perfusion of the Endometrium in Association with Changes in Location of the Embryonic Vesicle in Mares. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 755–761, 2005.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 387–437, 2004.

SIROIS, J.; DORÉ, M. The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4427–4434, 1997.

SIROIS, J.; SIMMONS, D. L.; RICHARDS, J. S. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Induction in vivo and in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 16, p. 11586–11592, 1992.

SKIDMORE, J. A. Reproduction in dromedary camels: an update. **Animal Reproduction**, v. 2, p. 161–171, 2006.

SPINOSA, H. de S.; GÓRNIAK, S. L.; MARIA MARTHA BERNARDI. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. quarta edição. 2006.

STABENFELDT, G. H.; HUGHES, J. P.; NEELY, D. P.; KINDAHL, H.; LIU, I.; PASCOE, D. Endogenous and Exogenous Manipulation of the Corpus Luteum of the mare. **Advances in Animal and Comparative Physiology**, v. 20, p. 133–139, 1981.

STAEMPFLI, S. A. Prostaglandins. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**. Terceira edição. p. 1797–1803, 2011.

STARBUCK, G. R.; STOUT, T. a; LAMMING, G. E.; ALLEN, W. R.; FLINT, a P. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, n. 2, p. 173–179, 1998.

STEWART, F.; CHARLESTON, B.; CROSSETT, B.; BARKER, P. J.; ALLEN, W. R. A novel uterine protein that associates with the embryonic capsule in equids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, p. 65–70, 1995.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 771–775, 2001.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Prostaglandin E2 and F2 α production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. **Reproduction**, v. 123, n. 2, p. 261–268, 2002.

STOUT, T. A. E.; MEADOWS, S.; ALLEN, W. R. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. **Animal Reproduction Science**, v. 87, n. 3–4, p. 269–281, 2005.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 16, p. 11613–11617, 2007.

TAKAGI, M.; NISHIMURA, K.; OGURI, N.; OHNUMA, K.; ITO, K.; TAKAHASHI, J.; YASUDA, Y.; MIYAZAWA, K.; SATO, K. Measurement of early pregnancy factor activity for monitoring the viability of the equine embryo. **Theriogenology**, v. 50, n. 2, p. 255–262, 1998.

TASAKA, A. C. Antiinflamatórios não-esteroidais. In: SPINOSA, H.; GÓRNIK, S.;

BERNARDI, M. M. (Ed.). **Farmacologia Aplicada a Medicina Veteriária**. quarta edição. Guanabara koogan, p. 257–271, 2006.

TSUJII, M.; DUBOIS, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell**, v. 83, n. 3, p. 493–501, 1995.

TSUJII, M.; KAWANO, S.; TSUJI, S.; SAWAOKA, H.; HORI, M.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 705–716, 1998.

VAN DORP, D. A.; BEERTHUIS, R. K.; NUGTEREN, D. H.; VONKEMAN, H. The enzymatic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid Prostaglandin and related factors. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 90, p. 204–207, 1964.

VAN NIEKERK, C. H.; GERNEKE, W. H. Persistence and parthenogenic cleavage of tubal ova in the mare. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 33, n. July 1965, p. 195–232, 1966.

VERNON, M. W.; ZAVY, M. T.; ASQUITH, R. L.; SHARP, D. C. Prostaglandin F2alpha in the equine endometrium: steroid modulation and production capacities during the estrous cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 25, n. 3, p. 581–589, 1981.

VON KRUEGER, X.; HEUWIESER, W. Effect of flunixin meglumine and carprofen on pregnancy rates in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 11, p. 5140–6, 2010.

WALTERS, K. W.; ROSER, J. F.; ANDERSON, G. B. Maternal-conceptus signalling during early pregnancy in mares: Oestrogen and insulin-like growth factor I. **Reproduction**, v. 121, n. 2, p. 331–338, 2001.

WÅNGGREN, K.; STAVREUS-EVERS, A.; OLSSON, C.; ANDERSSON, E.; GEMZELL-DANIELSSON, K. Regulation of muscular contractions in the human Fallopian tube through prostaglandins and progestagens. **Human Reproduction**, v. 23, n. 10, p. 2359–2368, 2008.

WATSON, E. D.; SERTICH, P. L. Prostaglandin production by horse embryos and the effect of co-culture of embryos with endometrium from pregnant mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 331–336, 1989.

WEBER, A.; VANDERWALL, K.; FREEMAN, A.; WOODS, G. L. Prostaglandin E2 Secretion by Oviductal Transport-Stage Equine Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 540–543, 1991.

WEBER, J. A.; WOODS, G. L.; FREEMAN, D. A.; VANDERWALL, D. K. PROSTAGLANDIN E2 SECRETION BY DAY-6 TO DAY-9 EQUINE EMBRYOS. **Prostaglandins**, v. 43, n. 1, 1992.

WEITHENAUER, J.; SHARP, D. C.; MCDOWELL, K. J.; SEROUSSI, M.; SHEERIN, P. Characterisation of the equine conceptus prostaglandin inhibitory product. *Biology of Reproduction*, v. 36, n. Abstract 329, 1987. *Apud* STOUT, T. A. E. Embryo – maternal communication during the first 4 weeks of equine pregnancy. **Theriogenology**, v. 86, p. 349–354, 2016.

WILDE, M. H.; DINGER, J. E.; HOAGLANG, T. A.; WOODY, R. L.; GRAVES-HOAGLAND, C. O. The effects of cervical dilation on plasma pgfm, progesterone and the duration of luteal function in diestrous mares. **Theriogenology**, v. 32, n. 1236, p. 675–681, 1989.

ZAVY, M. T.; SHARP, D. C.; BAZER, F. W.; FAZLEABAS, A.; SESSIONS, F.; ROBERTS, R. M. Identification of stage-specific and hormonally induced polypeptides in the uterine protein secretions of the mare during the oestrous cycle and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 64, n. 1, p. 199–207, 1982.

ZAVY, M. T.; VERNON, M. W.; SHARP, D. C.; BAZER, F. W. Endocrine aspects of early pregnancy in pony mares: A comparison of uterine luminal and peripheral plasma levels of steroids during the estrous cycle and early pregnancy. **Endocrinology**, v. 115, n. 1, p. 214–219, 1984.

HIPÓTESE

O flunixin meglumine prejudica as taxas de prenhez após transferência de embriões equinos, por meio da ação em COX-1 e COX-2 no endométrio e embrião, que diminui a quantidade de prostaglandina para estimular a mobilidade embrionária e consequente reconhecimento materno da gestação.

Os antiinflamatórios não esteroides flunixin meglumine, meloxicam e firocoxib interferem na mobilidade embrionária em equinos devido ao efeito antiprostaglandínico dos AINEs

OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da administração do AINE flunixin meglumine, aplicado imediatamente após a transferência, na taxa de prenhez e perda gestacional precoce em éguas receptoras.
- Comparar o efeito dos AINEs flunixin meglumine, meloxicam e firocoxib na mobilidade embrionária, de acordo com a intensidade que estes AINEs interferem na movimentação do embrião pelo útero.

CAPÍTULO 2

Artigo I

Artigo redigido segundo as normas da revista Journal of Equine Veterinary Science, <http://www.j-evs.com/content/authorinfo>. ISSN 0737-0806, fator de impacto 0,73, ranqueada como B1 pelo QUALIS – CAPES de 2015.

Efeito da aplicação de flunixin meglumine nas taxas de prenhez em programas de transferência de embrião equino

RESUMO

Durante a transferência de embrião (TE) em equinos, a manipulação da cérvix das receptoras pode estimular a liberação de prostaglandina $F2\alpha$ (PGF 2α) tecidual. Antiinflamatórios não esteroides como o flunixin meglumine (FM) são utilizados com frequência no intuito de impedir a luteólise causada pela PGF 2α , esse tratamento é justificado devido à possibilidade de inflamação endometrial após TE. No entanto, apesar de diminuir a reação inflamatória e a liberação de prostaglandinas, os resultados da taxa de prenhez com uso do FM e a perda embrionária não são conclusivos. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do FM na taxa de prenhez e perda gestacional precoce em éguas receptoras de embrião. Foram utilizados dados de 409 TE de um centro de reprodução comercial, onde 179 éguas formaram o grupo controle e 230 receptoras receberam um aplicação de 1,1 mg/kg de FM imediatamente após a TE. Os resultados não demonstraram diferença estatística ($p>0,05$) para a taxa de prenhez aos 15 dias (70,95% no grupo controle e 75,22% no tratado) e aos 60 dias (65,22% no controle e 65,92% no tratado). Porém, foi observada taxa de perda gestacional até 60 dias de 5,03% no grupo controle e 10% no grupo tratado, com tendência estatística para aumento de perda gestacional ($p=0,0578$). Concluímos a partir dos resultados do presente experimento que o flunixin meglumine não melhora a taxa de prenhez nas éguas receptoras de embrião, podendo aumentar a perda gestacional precoce.

Palavras-chave: égua, AINEs, mobilidade embrionária.

1. INTRODUÇÃO

Durante a transferência de embrião (TE) em equinos, a manipulação excessiva do trato reprodutivo das receptoras pode ocasionar lesões no útero e cérvix, estimulando a liberação de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) tecidual, que pode ser suficiente para iniciar o processo luteolítico [1]. A TE pode causar uma reação inflamatória subclínica aguda não infecciosa no endométrio e aumento de PGF_{2α} de 2 a 4 dias após o procedimento [2]. Betteridge et al. [3] verificaram um incremento nos níveis séricos de PG após manipulação do trato genital com realização de lavado uterino.

As prostaglandinas são produzidas a partir da enzima prostaglandina G/H sintase (PTGS), também denominada prostaglandina endoperóxido sintase ou ciclooxigenase (COX) [4–6]. A COX possui duas isoformas: a COX-1, endógena ou constitutiva, e a COX-2, considerada indutiva [7].

Wilde et al. [8] demonstraram que a aplicação de um antiinflamatório não esteroide (AINE) flunixin meglumine (FM) logo após manipulação cervical reduziu a liberação de PGFM em éguas. Na tentativa de conter a reação inflamatória do endométrio após a TE, Koblishke et al. [2] utilizaram dois AINEs: FM e ácido meclofenâmico (AM), resultando na diminuição de células polimorfonucleares no útero e nos níveis séricos de PGFM de éguas tratadas comparadas ao grupo controle.

De acordo com Vernon et al. [9], a PGF_{2α} no lúmen uterino de éguas prenhes pode estar envolvida no reconhecimento materno da gestação. O embrião secreta PGF_{2α} e PGE₂ para estimular contrações miometriais e promover a mobilidade embrionária, de modo que ocorra a distribuição uniforme dos fatores de reconhecimento materno da gestação [10].

No entanto, há discordância entre os autores sobre a eficiência da utilização de FM na TE de equinos, pois embora atue prevenindo a reação inflamatória uterina pode influenciar a mobilidade embrionária e reconhecimento materno da gestação, dependentes das prostaglandinas embrionária e endometrial [2,11]. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da administração do antiinflamatório não esteroide FM aplicado imediatamente após a TE na taxa de prenhez de éguas receptoras e na perda gestacional precoce.

2 MATERIAL E MÉTODO

Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética e uso animal (CEUA), com número de protocolo 127/2016, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus Botucatu, SP, Brasil.

2.1 Local e Animais

O estudo foi realizado em um centro comercial de reprodução equina, localizado no sul do estado de Minas Gerais, municípios de Ubá (latitude: 21°07'12"S e longitude: 42°56'34"W), no período da estação de monta 2014/2015.

Foram selecionadas um total de 409 transferências de embrião para éguas sem raça definida, com idade entre 3 e 10 anos, escore corporal entre 5 e 7 em uma escala de 1 a 9 [12], pluríparas, cíclicas a partir do segundo cio após período de anestro, mantidas em piquete com pasto, sal mineral e água *ad libitum*. As éguas foram escolhidas aleatoriamente, de modo que o tratamento foi alternado para apropriada randomização.

2.2 Critério de exclusão

Animais que apresentaram histórico de alterações anatômicas ou no sistema reprodutor que comprometam o procedimento padrão de transferência de embrião (TE) não foram incluídas nos dados do estudo.

Após análise dos dados, éguas que receberam tratamento de progesterona e/ou antibiótico foram retiradas do estudo, assim como as transferências que ocorreram no início ou no final da estação de monta e receptoras às quais foram transferidos embriões de doadoras idosas (>18 anos).

Inicialmente, foram realizadas 620 TE, porém destas, 22 animais receberam outros tratamentos como: antibiótico e progesterona exógena de longa ação (P4LA), 30 animais receberam antibiótico e 95 animais foram tratados com P4LA. Das 265 éguas tratadas com FM, 35 eram idosas e foram retiradas do estudo. A partir das 208 éguas selecionadas como grupo controle, 16 foram retiradas por serem idosas e 13 por receberem embriões no final da estação de monta (a datar de abril). Portanto, dados de 230 animais foram designados para o grupo tratado e 179 para o grupo controle.

2.3 Transferência de Embrião

Os lavados uterinos para coleta de embrião e as transferências para receptoras foram realizados sempre pelo mesmo médico veterinário. As éguas doadoras eram examinadas por ultrassonografia (iBEX PRO, E.I. Medical Imaging®, Colorado, EUA) até a detecção de um folículo de 35 mm e edema uterino grau 3 (de uma escala de 0 a 5) e a ovulação foi induzida com 1 mg de acetato de deslorelina (Sincrorelín, Ouro Fino®, SP, Brasil) para a inseminação artificial (IA) no dia seguinte.

A confirmação da ovulação das éguas doadoras 1 dia após a IA foi considerado D0 da doadora e uma receptora ciclante com folículo de 35 mm ou maior e edema uterino foi selecionada e induzida a ovulação com 1 mg de acetato de deslorelina, sua ovulação foi confirmada dois dias após.

As coletas de embrião foram realizadas de 7 a 9 dias após a ovulação da doadora, utilizando o método de lavado fechado a partir de uma sonda cateter tipo “bullet” transcervical (Embryo Flushing Catheter Bullet tip, Pets-Inc®, Canton, Texas, USA) acoplada a um tubo “Y” com copo coletor em uma extremidade e um litro de ringer com lactato em outra. A lavagem uterina era realizada até 3 vezes com 1 litro cada.

Os embriões (categorias 1 e 2 [13]) foram lavados com meio de manutenção de embrião (Botuembryo, Botupharma®, Botucatu, Brazil) acondicionados em pipeta de inseminação (PROVAR®, São Paulo, Brasil) para a transferência nas receptoras via transcervical.

2.4 Tratamento

Uma única aplicação do FM (Flunixin Injetável, Chemitec®, SP, Brasil) foi administrada por via intravenosa imediatamente após a transferência dos embriões alternadamente, na dose de 1,1 mg/kg. Para melhor padronização as éguas receptoras estavam entre os dias 4 a 7 pós-ovulação (D4 a D7). As éguas foram distribuídas em dois grupos, tratado e controle, de modo que a randomização ocorreu alternando-se as aplicações conforme as transferências foram ocorrendo na rotina das propriedades.

O diagnóstico de gestação foi realizado com 15 dias (D15) a partir da ovulação da doadora, as éguas foram avaliadas novamente para observação de perda embrionária aos 60 dias.

2.5 Análise Estatística

Os dados foram avaliados pelo software Bioestat 5.4 (Belém, PA, Brasil) usando o modelo de regressão logística simples, na qual a taxa de concepção nos momentos 15 e 60 foram consideradas como variáveis dependentes e o efeito do tratamento como variável preditora. A taxa de perda embrionária foi calculada pela subtração do número de receptoras prenhez no D15 pelo número de receptoras prenhez no D60 (X100), utilizando o mesmo modelo de regressão logística simples. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e tendências foram consideradas quando $0,05 < p < 0,10$.

3. RESULTADOS

Aos 15 dias de idade dos embriões, foi observada taxa de prenhez de 70,95% no grupo controle e 75,22% no grupo tratado ($p > 0,05$). Aos 60 dias a taxa de prenhez do grupo controle foi de 65,22% e do grupo tratado 65,92% ($p > 0,05$). A perda gestacional no grupo controle foi de 5,03% e no grupo tratado de 10%. Surpreendentemente, foi observada tendência estatística para aumento da taxa de perda gestacional no grupo de éguas que receberam FM ($p = 0,0578$), mesmo com valores dentro da normalidade.

4. DISCUSSÃO

Estudos desenvolvidos nas últimas décadas demonstrou que a transferência de embrião ou a manipulação do trato reprodutivo da égua pode causar liberação de $\text{PGF2}\alpha$, hormônio precursor da luteólise. Betteridge et al. [3], observaram o aumento de PGFM após lavagem uterina, mas não após a TE, resultado semelhante ao estudo de Wilde et al. [8], no qual a manipulação cervical não estimulou a liberação de $\text{PGF2}\alpha$. Com resultados divergentes, Kask et al. [1], relataram que 6 das 9 éguas utilizadas como receptora de embriões, apresentaram valores altos de PGFM após TE, mas não houve indução da luteólise.

O uso de FM na TE é recomendado por Koblichke et al. [2], em razão da atenuação do processo inflamatório no endométrio que procedimento pode causar, além de diminuir a PGFM plasmática. Um estudo realizado por Resende [24] demonstrou que houve diminuição dos níveis de PGFM após aplicação de FM 3 e 6 horas antes da TE, entretanto, o AINE não foi eficiente no controle do processo inflamatório uterino. Segundo Wilde et al. [8], a manipulação excessiva da cérvix não aumentou as PGFM, porém as concentrações plasmáticas foram menores nas éguas que receberam o AINE.

A partir de 165 TE, 86 éguas tratadas com FM logo após a TE e 79 que não receberam tratamento, Resende [24] observou queda significativa nas taxas de prenhez aos 60 dias de gestação, resultando em 58,13% de éguas prenhes no grupo tratado e 72,15% no grupo controle. Caiado [11], obteve taxas de prenhez avaliadas até 28 dias, maiores no grupo controle 75% (15/20) do que no grupo tratado 55% (11/20), que recebeu única aplicação de FM 15 min antes da TE. Em ambos os trabalhos, não foram apresentados dados de perda gestacional precoce.

No presente estudo, as taxas de prenhez obtidas aos 15 dias de gestação, tanto do grupo tratado com FM (75,22%) quanto no grupo controle (70,95%) são similares às reportadas em outros estudos [14–18]. Porém, a taxa de prenhez do grupo tratado com FM não foi menor como observado nos estudos de Resende [24] e Caiado [11].

A taxa de perda gestacional precoce pode variar entre 10,4% até 15,4% dos 40 aos 60 dias de gestação [19-23]. Em nossos resultados, a taxa de perda gestacional aos 60 dias nas receptoras tratadas com FM foi 10% e, apesar de ser um valor considerado normal para um programa comercial de TE, duplicou quando comparado com as éguas que não receberam a medicação (5%).

Liberadas em pequenas quantidades, as prostaglandias de origem embrionária possuem ação local [25] e ativam o mecanismo de mobilidade que provome o deslocamento do embrião por todo o lúmen uterino, essencial para o reconhecimento materno da gestação [26] e a distribuição de fatores anti-luteolíticos adequadamente [27]. Além disso, a PGE2 estimula a mitose celular e a proliferação endotelial, é imunomoduladora e anti-apoptótica [28-29].

A quantidade de prostaglandinas liberadas depende da expressão das COX. No endométrio, a expressão gênica da COX-2 é suprimida, no mesmo momento em que há aumento da COX-1, sendo considerada a principal enzima na cascata de produção de prostaglandina [30]. Em cultivo celular de células endometriais na presença de um embrião, a síntese de PGF foi reduzida enquanto as concentrações de PGE e 6-keto-PGF-1 α continuaram elevadas [31]. A produção de PGE ocorre simultaneamente entre embrião e endométrio, que também sintetiza esse prostanóide baseado no aumento da expressão na enzima prostaglandina E sintase (PTGES) no início da gestação, estimulando as contrações miometriais [32].

Considerando a expressão da COX-1 no endométrio, o FM também afeta essa origem de prostaglandina que atua em conjunto com a sintetizada pelo embrião. Desse modo, o FM diminui o estímulo para as contrações da musculatura lisa uterina e reduz a mobilidade do embrião, como demonstrado pelo estudo de Stout e Allen [33], que observaram significativa diminuição no número de movimentos embrionários após aplicação de FM em éguas com 12 a 14 dias de gestação.

Embriões de 10 a 32 dias, quando incubados em cultivo celular, produzem quantidade significativa de PGE2 e PGF2 α . Porém, quando o FM é adicionado ao meio ocorre inibição de PGE2, mas não da PGF2 α que é pré-formada e estocada [25]. Demonstrando que o FM é capaz de impedir tanto a liberação de prostaglandinas provenientes do embrião e útero.

A taxa de prenhez menor observada nas éguas que receberam o tratamento com FM [11,24] e o maior valor da taxa de perda gestacional no presente estudo podem ocorrer por consequência à inibição de prostaglandinas devido ao FM, que suprime não seletivamente a COX. Sendo que as prostaglandinas E2, F e I2 produzidas pelo embrião são importantes na sinalização ao útero [31], essencial para a mobilidade embrionária e reconhecimento materno da gestação. A restrição da mobilidade ou diminuição da superfície de contato entre endométrio e embrião podem ocasionar perda gestacional precoce [27].

Concluimos a partir dos resultados do presente experimento, que o flunixin meglumine não melhora a taxa de prenhez nas éguas receptoras de embrião, podendo aumentar a perda gestacional precoce.

5. REFERÊNCIAS

- [1] Kask K, Odensvik K, Kindahl H. Prostaglandin F2 α release associated with an embryo transfer procedure in the mare. *Equine Vet J* 1997;29:286–9.
- [2] Koblichke P, Kindahl H, Budik S, Aurich J, Palm F, Walter I, et al. Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology* 2008;70:1147–58.
- [3] Betteridge KJ, Renard A, Goff a K. Uterine prostaglandin release relative to

- embryo collection , transfer procedures and maintenance of the corpus luteum. *Equine Vet J Suppl* 1985;3.
- [4] Hamberg M, Svensson J, Wakabayashi T, Samuelsson B. Isolation and Structure of Two Prostaglandin Endoperoxides That Cause Platelet Aggregation. *Proc Nat Acad Sci* 1974;71:345–9.
- [5] Samuelsson B, Goldyne M, Granstrom E, Hamberg M, Hammarstrom S, Malmsten C. Prostaglandins and Thromboxanes. *Annu Rev Biochem* 1978;47:997–1029.
- [6] Needleman P, Truk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic Acid Metabolism. *Annu Rev Biochem* 1986;55:69–102.
- [7] Habenicht AJR, Goerig M, Grulich J, Rothe D, Gronwald R, Loth U, Schettler G, Kommerell B, Ross R. Human platelet-derived growth factor stimulates prostaglandin synthesis by activation and by rapid de novo synthesis of cyclooxygenase. *J Clin Invest* 1985;75:1381–7.
- [8] Wilde MH, Dinger JE, Hoagland TA, Woody RL, Graves-Hoagland CO. THE Effects Of Cervical Dilation On Plasma Pgfm, Progesterone And The Duration Of Luteal Function In Diestrus Mares. *Theriogenology* 1989;32:675–81.
- [9] Vernon MW, Zavy MT, Asquith RL, Sharp DC. Prostaglandin F₂alpha in the equine endometrium: steroid modulation and production capacities during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 1981;25:581–9.
- [10] Allen WR. The physiology of early pregnancy in the mare. *AAEP Proc.*, vol. 46, 2000, p. 338–54.
- [11] Caiado JRC, Fonseca FA, Silva JFS, Caiado JCC, Fontes R da S. Aplicação do flunixin meglumine antes da transferência não-cirúrgica de embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador Application of flunixin meglumine before nonsurgical embryo transfer in Mangalarga Marchador breed mares. *Rev Bras Ciência Vet* 2005;12:11–5.
- [12] Henneke DR, Polter GD, Kreider JL, Yeates BF. Relationship between condition score , physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Vet J*

- 1983;15:371–2.
- [13] McCue PM, Ferris RA. How to evaluate equine embryos. Am. Assoc. Equine Pract., Las Vegas, NV, USA.: AAEP proceedings; 2009.
- [14] Foss R, Wirth N, Schiltz P, Jones J. Nonsurgical embryo transfer in a private practice. AAEP Proc 1999;45:210–2.
- [15] Squires EL, McCue PM, Vanderwall D. The current status of equine embryo transfer. Theriogenology 1999;51:91–104.
- [16] Riera FL, McDonough J. Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. Equine Vet J 1993;25:116–8.
- [17] Camargo CE, Weiss RR, Kozicki LE, Duarte MP, Garcia Duarte MC, Lunelli D, et al. Some Factors Affecting the Rate of Pregnancy after Embryo Transfer Derived from the Brazilian Jumper Horse Breed. J Equine Vet Sci 2013;33:924–9.
- [18] Ball BA, Little T V, Hillman RB, Woods GL. Pregnancy Rates At Days 2 and 14 and Estimated Embryonic Loss Rates. Theriogenology 1986;26:611–9.
- [19] Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall D., McCue PM. Factors Affecting Pregnancy Rates and Early Embryonic Death After Equine Embryo Transfer. Theriogenology 2000;54:965–79.
- [20] Villahoz MD, Squires EL, Voss JL, Shindeler R k. Some observations on early embryonic death in mares. Theriogenology 1985;23:915–24.
- [21] Carney NJ, Squires EL, Cook VM, Seidel GE, Jasko DJ. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled transported equine embryos. Theriogenology 1991;36:23–32.
- [22] Ginther O. J. Embryonic loss in mares: incidence, time of occurrence, and hormonal involvement. Theriogenology 1985;23:77–89.
- [23] Panzani D, Vannozzi I, Marmorini P, Rota A, Camillo F. Factors affecting recipients' pregnancy, pregnancy loss, and foaling rates in a commercial equine embryo transfer program. J Equine Vet Sci 2016;37:17–23.

- [24] Resende, A. M. D.E. Efeito do tratamento anti- inflamatório na histologia endometrial , produção de prostaglandina e taxa de gestação após transferência de embriões e / ou manipulação cervical em éguas. Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2009.
- [25] Stout, T. A. E.; Allen, W. R. Prostaglandin E2 and F2 α production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. *Reproduction*, 2002,123:261–268.
- [26] Leith, G. S.; Ginther, O. J. characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology*, 1984:22.
- [27] Mcdowell, K. J.; Sharp, D. C.; Peck, L. S.; Cheves, L. L. Short Report - Effect of restricted conceptus mobility on maternal recognition of pregnancy in mares. *Equine veterinary journal*, 1985; 17:23–24.
- [28] Tsujii, M.; Dubois, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 1995; 83:493–501.
- [29] Tsujii, M.; Kawano, S.; Tsuji, S.; Sawaoka, H.; Hori, M.; Dubois, R. N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 1998; 93:705–716.
- [30] Atli, M. O.; Kurar, E.; Kayis, S. A.; Aslan, S.; Semacan, A.; Celik, S.; Guzeloglu, A. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. *Animal Reproduction Science*, 2010; 122: 124–132.
- [31] Watson, E. D.; Sertich, P. L. Prostaglandin production by horse embryos and the effect of co-culture of embryos with endometrium from pregnant mares. *Journal of reproduction and fertility*, 1989; 87: 331–336.
- [32] Boerboom, D. Expression of Key Prostaglandin Synthases in Equine Endometrium During Late Diestrus and Early Pregnancy. *Biology of Reproduction*, 2004; 70: 391–399.

- [33] Stout, T. A. E.; Allen, W. R. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. *Reproduction*, 2001; 121: 771–775.

Artigo II

Artigo redigido segundo as normas da revista Journal of Equine Veterinary Science, <http://www.j-evs.com/content/authorinfo>. ISSN 0737-0806, fator de impacto 0,73, ranqueada como B1 pelo QUALIS – CAPES de 2015.

Efeito do flunixin meglumine, firocoxib e meloxicam na mobilidade uterina de embriões equinos

RESUMO

A mobilidade embrionária ocorre como resultado da produção de prostaglandinas pelo embrião e pelo endométrio que promovem a contração da musculatura lisa do útero, deslocando a vesícula embrionária por toda a extensão do lúmen, importante para o reconhecimento materno da gestação. Antiinflamatórios não esteroides (AINEs) são rotineiramente utilizados na transferência de embrião e podem alterar a mobilidade do concepto. Por conseguinte, a migração inadequada pode prejudicar o reconhecimento materno da gestação. O objetivo desse estudo foi avaliar e comparar o efeito do flunixin meglumine (FM), firocoxib (FIRO) e meloxicam (ML) na mobilidade embrionária. Os animais foram divididos em 3 tratamentos: FM (1,1mg/kg, IV), FIRO (0,2mg/kg, VO) e ML (0,6 mg/kg, IV), com 10 éguas em cada grupo. Após o diagnóstico de gestação nos dias 12 a 13 pós-ovulação, a mobilidade do concepto foi realizada a partir de ultrassonografia via transretal a cada 5 minutos durante 1 hora de modo a visualizar a localização do embrião. As avaliações foram realizadas em 3 momentos, A primeira ocorreu imediatamente antes do tratamento e a segunda foi executada após administração e os respectivos picos plasmáticos de cada AINE. Uma terceira avaliação foi concluída 24 horas após a aplicação dos AINEs. No grupo de éguas que receberam FM, foi observada diminuição na mobilidade embrionária de $5,8 \pm 0,3$ movimentos/hora (m/h) para $2,3 \pm 0,5$ m/h ($p < 0,05$) e, após 24 horas os valores foram semelhantes à primeira avaliação $5,9 \pm 0,2$ m/h ($p > 0,05$). O tratamento com ML também causou diminuição na quantidade de movimentos embrionários, de $5,9 \pm 0,3$ m/h para $1,9 \pm 0,3$ m/h ($p < 0,05$), 24 horas após o tratamento foram observados valores de $5,7 \pm 0,4$ m/h ($p > 0,05$). O tratamento com FIRO não interferiu na mobilidade do embrião tendo sido a

quantidade de movimentos embrionários de $5,7\pm 0,4$; $5,8\pm 0,3$ e $5,6\pm 0,3$ na primeira, segunda e terceira avaliações respectivamente ($p>0,05$). Em conclusão, o FIRO foi o único AINE que não alterou com a mobilidade embrionária, sendo o mais seguro para uso no início da gestação de éguas. Estes resultados também sugerem que a migração embrionária é dependente da expressão da enzima ciclooxigenase 1.

Palavras-chave: ciclooxigenase, embrião, égua, prostaglandina, reconhecimento materno.

1 INTRODUÇÃO

O embrião equino sintetiza as prostaglandinas PGE-2, PGF2 α e PGI-2, que promovem a sinalização ao útero e estimulam a contração do miométrio e consequente mobilidade embrionária, fundamentais para o reconhecimento materno da gestação [1–3]. As prostaglandinas embrionárias possuem ação local e não alcançam a circulação sanguínea sistêmica, sendo incapaz de induzir a luteólise [4].

A produção das prostaglandinas ocorre a partir do ácido araquidônico (AA) presente na membrana plasmática da célula [5,6]. O AA liberado é transformado em prostaglandina pela ação da enzima prostaglandina G/H sintase (PTGS) também conhecida como prostaglandina endoperoxídeo sintase ou ciclooxigenase (COX) [6,7]. A COX possui duas isoformas COX-1 e COX-2 classificadas como constitutiva e indutiva respectivamente [8]. A COX-1 é a enzima predominante no endométrio da égua no início da gestação, pois a expressão da COX-2 é reduzida [9].

A migração do embrião deve ocorrer por toda a área do endométrio para garantir que o fator de reconhecimento materno seja distribuído de modo uniforme no útero. O pico da mobilidade embrionária acontece entre os dias 11 e 14 pós-ovulação [10,11].

A administração de antiinflamatórios não esteroides (AINEs) no momento da transferência de embrião (TE) é frequentemente utilizada na tentativa de conter a liberação de prostaglandina F2 α (PGF2 α) proveniente da inflamação subclínica no endométrio e manipulação do trato reprodutivo da égua que pode ocorrer após TE [12]. Contudo, antiinflamatórios como o flunixin meglumine (FM), se aplicado na fase inicial da gestação, podem interferir na produção de prostaglandinas do embrião, prejudicando a mobilidade embrionária [10].

Com exceção do FM, não há informações sobre o efeito de outros AINEs na mobilidade embrionária, em vista disso, o propósito desse estudo foi comparar 3 categorias de AINEs, não seletivo para COX-1 e COX-2 (flunixin meglumine), COX-2 preferencial (meloxicam) e COX-2 seletivo (firocoxib), a fim de verificar quais destes interferem na quantidade de movimentos do embrião pelo útero e indicar qual ciclooxigenase é predominante no mecanismo de mobilidade embrionária e, finalmente, qual o fármaco mais seguro para ser utilizado nesta fase de gestação.

2 MATERIAL E MÉTODO

Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética e uso animal (CEUA), com número de protocolo 127/2016, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus Botucatu, SP, Brasil.

2.1 Local e Animais

Foram utilizadas 30 éguas, sem raça definida, com idade entre 8 e 20 anos com média de idade $10,3 \pm 3,73$, nulíparas, pesando de 350 a 450 kg, pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Botucatu, SP, Brasil, (latitude $22^{\circ}53'09''S$ e longitude $48^{\circ}26'42''W$). Todas as éguas estavam em boa condição corporal e receberam 15 kg de pré-secado de coast-cross complementado com 1 kg de ração de manutenção por dia, sal mineral e água *ad libitum*.

O experimento ocorreu durante a estação de monta, de agosto a novembro de 2016. O ciclo estral das éguas foi acompanhado por ultrassonografia via transretal (A5v Sonoscape®, Shenzhen, China) diariamente. Quando detectado folículo maior que 35 mm, as ovulações foram induzidas com 1 mg de acetato de deslorelina (Sincrorelina®, Ouro Fino, SP, Brasil), aplicado via intramuscular. No dia posterior, a inseminação artificial (IA) foi efetivada com 1 bilhão de espermatozoides móveis provenientes de um garanhão de fertilidade conhecida, pertencente ao mesmo local. A ovulação foi confirmada um dia após IA, e o diagnóstico de gestação aos 12 dias após a ovulação e consecutivamente o primeiro momento da mobilidade embrionária foi acompanhado.

2.2 Avaliações ultrassonográficas de mobilidade embrionária

Após o diagnóstico de gestação entre 12 e 13 dias por meio de ultrassonografia via transretal e visualização da vesícula embrionária, uma série de ultrassonografias foi realizada a cada 5 minutos durante uma hora. Cada posição do embrião em relação ao útero foi registrada de acordo com Ginther [13] (figura 1), dividindo o útero em 9 partes, sendo 3 do corpo e 3 de cada corno. Essa primeira hora de exame foi considerado momento controle das éguas.

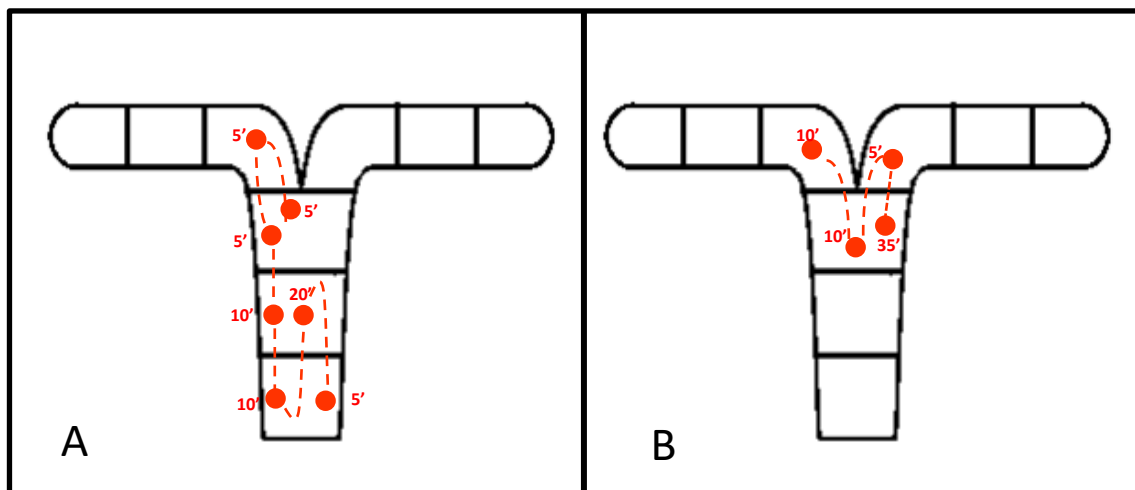


Figura 1: Modelo representativo de útero de uma égua dividido em 9 partes segundo Ginther [13]. (A) Mobilidade do embrião equino por uma hora, pré-tratamento. (B) Mobilidade embrionária por 1 hora pós-tratamento com FM.

2.3 Tratamentos

Os tratamentos com AINEs foram administrados logo após a primeira hora de avaliação ultrassonográfica, flunixin meglumine (Flunixin Injetável®, Chemitec, SP, Brasil) na dose de 1,1 mg/kg aplicado intravenoso, meloxicam (ML) (Maxicam® 2%, Ourofino, SP, Brasil) na dose de 0,6 mg/kg aplicado intravenoso e firocoxib (FIRO) (Previcox®, comprimidos de 227mg, Merial, SP, Brasil) na dose de 0,2 mg/kg via oral.

Os comprimidos de FIRO foram triturados, diluídos em 9 mL de água e divididos em 3 partes de 3 mL contendo 75mg cada porção e congelados a -20°C até o uso [14]. Cada porção foi retirada da congelação alguns minutos antes da administração nas éguas, para descongelar em temperatura ambiente.

Após a administração intravenosa do FM e do ML, as éguas permaneceram em repouso por 1 hora, a fim de que o antiinflamatório alcançasse níveis séricos máximos. Do mesmo modo, após administração do firocoxib via oral, as éguas repousaram por 4 horas, devido ao tempo necessário para esse medicamento atingir níveis plasmáticos satisfatórios [15].

No momento previsto da máxima concentração plasmática do princípio ativo de cada medicamento, a segunda série de ultrassonografias foi realizada. Assim como a primeira, a localização da vesícula embrionária era registrada a cada 5 minutos durante 1 hora no desenho esquemático de útero.

Após 24 horas da aplicação dos AINEs, o terceiro exame ultrassonográfico foi executado no intuito de verificar se houve efeito remanescente dos fármacos sobre a mobilidade embrionária.

2.4 Análise Estatística

Primeiramente realizou-se uma análise descritiva dos parâmetros (média e erro padrão) de acordo com as condições experimentais e avaliação da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov (K-S). Para comparação dos dados de cada tratamento, utilizou-se ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste poshoc de Tukey quando os dados foram paramétricos e o teste de Friedman seguido pelo teste de Dunn quando não paramétrico. Para a avaliação entre os tratamentos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas pelo Programa GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad software, LA Jolla, Califórnia, USA; www.graphpad.com).

3 RESULTADOS

Os resultados da mobilidade embrionária nos diferentes momentos (pré-tratamento, tratado e 24 horas pós-tratamento) com os antiinflamatórios FM, FIRO e ML na mobilidade embrionária estão detalhados na tabela 1.

| Movimentação por Hora | | | |
|-----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| Tratamento | Pré-tratamento | Tratado | 24h pós-tratamento |
| Flunixin Meglumine | 5.8±0.3 ^a | 2.3±0.5 ^{b,B} | 5.9±0.2 ^a |
| Firocoxib | 5.7±0.4 ^a | 5.8±0.3 ^{a,A} | 5.6±0.3 ^a |
| Meloxicam | 5.9±0.3 ^a | 1.9±0.3 ^{b,B} | 5.7±0.4 ^a |

Tabela 1: Resultados e análise descritiva dos parâmetros da mobilidade embrionária (movimentação por hora). ((a,b) Letras minúsculas significam diferença entre as colunas, $p < 0,05$. (C x T x 24T). (A,B) letras maiúsculas significam diferenças entre as linhas, $p < 0,05$. (FM x FIRO x ML)).

O FM e ML reduziram a mobilidade embrionária no pico máximo esperado de concentração plasmática de cada medicamento, retornando aos mesmos valores do momento pré-tratamento após 24 horas do tratamento. A mobilidade dos embriões de éguas que receberam tratamento com FIRO não sofreu interferência do fármaco.

4. DISCUSSÃO

A avaliação da mobilidade embrionária por meio da ultrassonografia foi inicialmente estabelecida por Leith e Ginther (LEITH; GINTHER, 1984) que dividiram o útero em 7 porções (corpo uterino e 3 porções de cada corno) e avaliaram por ultrassonografia a cada 5 minutos durante 2 horas. Posteriormente, Ginther [13] estabeleceu em seu estudo a divisão do útero em 9 porções (3 do corpo e 3 de cada corno). Do mesmo modo, Stout e Allen (STOUT; ALLEN, 2001), avaliaram a mobilidade com ultrassonografia seriada dividindo o útero em 9 porções, e após a primeira hora de avaliação foi administrado FM em éguas com 12 e 14 dias de gestação, seguida da segunda hora de observação. Este modelo foi utilizado no presente estudo.

Em razão dos resultados obtidos por Stout e Allen [10], os exames ultrassonográficos foram realizados no pico de mobilidade embrionária entre os dias 12 e 14 de gestação, com valores de 3.0 ± 1.0 e 4.7 ± 0.8 movimentos por hora de avaliação, respectivamente, e foi observado que a inibição dos movimentos do embrião após aplicação do AINE foi mais evidentes nessa fase. Leith e Ginther [16] observaram médias entre 10 e 13 movimentos embrionários em 2 horas, equivalentes a 5 e 6,5 movimentos por hora. Os resultados de ambos os estudos são semelhantes aos valores encontrados pelo presente estudo.

Segundo Stout e Allen [10], após aplicação de FM, a quantidade de movimentos embrionários por hora diminuiu de 4.7 ± 0.8 para 1.8 ± 0.8 e de 4.3 ± 0.9 para 0.7 ± 0.2 , aos 12 e 14 dias, respectivamente. Dados que corroboram com nossos resultados após tratamento com FM, com diminuição de 5.8 ± 0.3 para 2.3 ± 0.5 movimentos por hora.

A COX-1 é predominante no endométrio da égua no início da gestação devido ao aumento da expressão dessa enzima causada pela estimulação estrogênica embrionária, sugerindo a prevalência da COX-1 na produção de prostaglandinas endometriais. Esse mesmo estímulo do embrião causa redução na expressão da COX-2 [9]. Os resultados de mobilidade embrionária corroboram com o perfil de expressão gênica, em razão da não alteração da quantidade de movimentos realizados pelo embrião após administração de FIRO, ação COX-2 seletiva, sendo mais seguro para utilização nessa fase da gestação. De acordo com Giguère et al. [17], o FIRO não causou alterações no final da gestação e no parto, evidenciando sua eficácia e segurança em éguas prenhes.

Ainda não está esclarecido qual COX é predominante no embrião equino durante a produção das prostaglandinas que promovem a mobilidade embrionária. De acordo com Tan et al. [18], tanto COX-1 como COX-2 são detectados na fase de implantação de embriões humanos. Em camundongos, a COX-1 se manifesta quando o conceito possui mais de 4 blastômeros até blastocisto e a COX-2 aumenta a expressão a partir do estágio de duas células.

O FM atua não seletivamente sobre a COX e, ao bloquear 80% da COX-2, também afeta 83,81% da COX-1 [19], que pode alterar a produção de prostaglandinas uterinas dependentes de COX-1. A produção de prostaglandina E embrionária reduziu significativamente após adição de FM em meio de cultura de embriões [4]. Isso fundamenta a diminuição da quantidade de movimentos embrionários após tratamento com FM.

Com resultados semelhantes ao FM, o ML também reduziu o número de movimentos embrionários por hora devido a sua ação em COX-1. Apesar do seu sítio de ligação ter maior afinidade pelo COX-2, em concentração suficiente para inibir 80% da COX-2 também realiza ligação com 70% da COX-1 [19].

Em função dos resultados do presente experimento podemos concluir que o antiinflamatório FIRO não alterou a mobilidade embrionária, enquanto que os outros AINEs (FM e ML) estudados diminuíram significativamente a quantidade de movimentos. O resultado de mobilidade do FIRO, considerando sua ação seletiva para COX-2, indica que o mecanismo de mobilidade embrionária deva ser mais dependente da COX-1. Os AINE que possuem ação na COX-1 como o FM e ML devem ser evitados no início da gestação, podendo comprometer a mobilidade embrionária transitoriamente e a distribuição de fatores fundamentais para o reconhecimento materno da gestação.

5 REFERÊNCIAS

- [1] Watson ED, Sertich PL. Prostaglandin production by horse embryos and the effect of co-culture of embryos with endometrium from pregnant mares. *J Reprod Fertil* 1989;87:331–6.

- [2] Kastelic JP, Adams GP, Ginther OJ. Role of progesterone in mobility, fixation, orientation, and survival of the equine embryonic vesicle. *Theriogenology* 1987;27:655–63.
- [3] Gastal MO, Gastal EL, Torres CAA, Ginther OJ. Effect of PGE₂ on uterine contractility and tone in mares. *Theriogenology* 1998;50:989–99.
- [4] Stout TAE, Allen WR. Prostaglandin E₂ and F₂ α production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. *Reproduction* 2002;123:261–8.
- [5] Bertan CM, Binelli M, Madureira EH. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. *Brazilian J Vet Res Anim Sci* 2006;43:824–40.
- [6] Shimizu T, Wolfe LS. Review: Arachidonic Acid Cascade and Signal Transduction. *J Neurochem* 1990;55, No 1:1–15.
- [7] Needleman P, Truk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic Acid Metabolism. *Annu Rev Biochem* 1986;55:69–102.
- [8] Habenicht AJR, Goerig M, Grulich J, Rothe D, Gronwald R, Loth U, et al. Human platelet-derived growth factor stimulates prostaglandin synthesis by activation and by rapid de novo synthesis of cyclooxygenase. *J Clin Invest* 1985;75:1381–7.
- [9] Atli MO, Kurar E, Kayis SA, Aslan S, Semacan A, Celik S, et al. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. *Anim Reprod Sci* 2010;122:124–32.
- [10] Stout TAE, Allen WR. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. *Reproduction* 2001;121:771–5.
- [11] Ginther OJ. Mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology* 1983;19:401–8.
- [12] Koblichke P, Kindahl H, Budik S, Aurich J, Palm F, Walter I, et al. Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology* 2008;70:1147–58.

- [13] Ginther OJ. Intrauterine movement of the early conceptus in barren and postpartum mares. *Theriogenology* 1984;21:633–44.
- [14] Kvaternick V, Malinski T, Wortmann J, Fischer J. Quantitative HPLC-UV method for the determination of firocoxib from horse and dog plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2007;854:313–9.
- [15] Kvaternick V, Pollmeier M, Fischer J, Hanson PD. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. *J Vet Pharmacol Ther* 2007;30:208–17.
- [16] Leith GS, Ginther OJ. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology* 1984;22.
- [17] Giguère S, Macpherson ML, Benson SM, Cox S, McNaughten JW, Pozor MA. Disposition of firocoxib in late pregnant and early postpartum mares. *J Vet Pharmacol Ther* 2015;39:196–8.
- [18] Tan H-N, Liu Y, Diao H-L, Yang Z-M. Cyclooxygenases and prostaglandin E synthases in preimplantation mouse embryos. *Zygote* 2005;13:103–8.
- [19] Beretta C, Garavaglia G, Cavalli M. COX-1 and COX-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: An in vitro analysis. *Pharmacol Res* 2005;52:302–6.