



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

Defesa de Dissertação

**EFEITO DO ÁCIDO MEFENÂMICO SOBRE A MOBILIDADE  
EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS**

VERIDIANA DE PAULA ANDRADE

Botucatu – SP

2018

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

**EFEITO DO ÁCIDO MEFENAMICO SOBRE A MOBILIDADE  
EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS**

VERIDIANA DE PAULA ANDRADE

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 Antônio Alvarenga

Botucatu- SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU- UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Andrade, Veridiana De Paula.

Efeito do ácido mefenâmico sobre a mobilidade  
embrionária em éguas / Veridiana De Paula Andrade.  
Botucatu, 2018

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

Orientador: Marco Antônio Alvarenga  
Capes: 50504037

1. Agentes anti-inflamatórios não esteróides. 2.  
Transferência de embriões. 3. Prenhez. 4. Égua. 5.  
Prostaglandinas. 6. Ácido mefenâmico.

Palavras-chave: anti-inflamatório não esteroide; prenhez;  
prostaglandina; transferência de embrião.

Nome da autora: Veridiana De Paula Andrade

Título: Efeito do Ácido mefenâmico sobre a mobilidade embrionária em éguas

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu.

---

Prof. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

---

Prof. Dra. Claudia Barbosa Fernandes

Membro

Departamento de Reprodução Animal  
FMVZ – USP – São Paulo

---

Data da defesa: 15 de Junho de 2018

Dedicado a: Isabel e José Luís

Dedico esse trabalho aos meus pais Isabel De Paula Andrade e José Luís de Freitas Andrade, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo que conquistei até agora, mas peço a Ele para me dar sabedoria para conquistar muito mais.

À minha família, principalmente minha mãe Isabel e meu pai José Luís, minhas irmãs Mariana e Fabiana, meus sobrinhos Maria Elisa e Luís Augusto, minhas avós Deomar e Benedita e meu avó Antônio pela compreensão, incentivo diário amor e carinho incondicional.

Em memória ao meu avó, Luís Augusto de Freitas Andrade, pelos ensinamentos e suas sábias palavras sempre farão eco em nossas consciências.

Ao meu orientador Marco Antônio Alvarenga, pela oportunidade do mestrado, pela amizade e aprendizado constante.

À amiga querida Carolina Okada por toda ajuda, incentivo e risos compartilhados.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal, pelos ensinamentos.

A todos os amigos pós-graduandos, residentes, funcionários e estagiários.

Agradeço também a FMVZ/ UNESP pela oportunidade. É uma honra fazer parte desta instituição.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de mestrado.

E finalmente, agradeço aos animais, pelos ensinamentos diários de lealdade, amizade, amor e simplicidade.

## LISTA DE FIGURAS

## Capítulo 2

## Artigo

Figura 1- Modelo representativo para avaliação da permanência embrionária no útero, onde ambos os cornos foram estatisticamente considerados como um. (1) segmento caudal do corpo uterino, (2) segmento médio do corpo uterino, (3) segmento cranial do corpo uterino, (4) segmento caudal do corno, (5) segmento médio do corno e (6) segmento craniano do corno.....27

Figura 2- Tempo em minutos de permanência do concepto nos segmentos uterinos de acordo com os momentos. Letras minúsculas (a, b, c) demonstram significância estatística ( $p < 0.05$ ) .....29

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AINEs	Antiinflamatórios não estereoidais
CL	Corpo lúteo
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX- 2	Ciclooxigenase 2
EPSt	Fator inibidor da síntese de prostaglandina
FM	Flunixin meglumine
kDa	Quilodalton
P4	Progesterona
PGE-2	Prostaglandina E2
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
PGES	Prostaglandina E sintase
PTGFS	Prostaglandina F sintase
PTGER2	Prostaglandina E tipo 2
TBF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$



# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>xii</b>
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO E MOBILIDADE EMBRIONÁRIA.....	2
2.2 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES E PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINAS.....	9
2.3 EFEITO DOS ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES NA REPRODUÇÃO EQUINA.....	10
3. REFERÊNCIAS.....	12
<b>HIPÓTESE.....</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>21</b>
ARTIGO .....	22
1. INTRODUÇÃO .....	23
2. MATERIAL E MÉTODO .....	24
2.1 Aspectos éticos.....	25
2.2 Local e animais .....	25
2.3 Avaliações ultrassonográficas.....	25
2.4 Tratamento .....	27
2.5 Análise estatística.....	27
3. RESULTADOS .....	27
4. DISCUSSÃO.....	28
5. REFERÊNCIAS.....	31

ANDRADE, V. P. Efeito do ácido mefenâmico sobre a mobilidade embrionária em éguas. Botucatu 2018, 45p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP

## RESUMO

Na espécie equina, o embrião se movimenta no útero entre os dias 9 e 16 após a ovulação, o conceito apresenta uma forma esférica e se move constantemente no lúmen uterino mediante contrações miométriais, produzidas por estimulação química da vesícula embrionária. O deslocamento embrionário durante este período é essencial para o reconhecimento materno da gestação. Este longo período de estímulo garante que o embrião produza sinais anti-luteolíticos no endométrio, evitando a luteólise. Após 17 dias, a vesícula embrionária cessa a mobilidade e ocorre a fixação em um dos cornos. Durante a mobilidade, o embrião produz prostaglandinas PGE-2, PGF-2 $\alpha$  e PGI-2. Se houver uma falha durante a migração embrionária, o reconhecimento materno da gestação pode ser afetado e conseqüentemente há lise do corpo lúteo, resultando na perda precoce da prenhez. O uso do anti-inflamatório flunixin meglumine imediatamente após a transferência do embrião é amplamente utilizado para prevenir uma reação inflamatória local, a luteólise e a perda embrionária precoce. No entanto, de acordo com a literatura, o ácido mefenâmico causa menos efeitos sobre a mobilidade embrionária e aumenta as taxas de gestação. O objetivo deste estudo foi elucidar o efeito do ácido mefenâmico sobre a mobilidade embrionária em éguas. Foram selecionadas 10 éguas para o estudo. Após a confirmação da gestação com ultrassom transretal, a mobilidade embrionária foi avaliada por ultrassonografia em série (a cada 5 minutos) durante 1 hora. Este exame foi considerado como momento controle. As éguas receberam 1,5g de ácido mefenâmico por via oral. O segundo exame de ultrassonografia em série foi realizado 2 horas após administração, quando o fármaco atingiu a concentração máxima sérica. Após 24 horas da ação da administração do medicamento, a terceira avaliação foi realizada para verificar os efeitos residuais. O momento controle resultou em um valor médio de  $6,0 \pm 0,3$  movimentos por hora (m/h) de avaliação. Após o tratamento com o ácido mefenâmico, os embriões apresentaram  $2,7 \pm 0,3$  m/h e 24 horas  $5,2 \pm 0,4$  m/h. Podemos concluir que o ácido mefenâmico afetou a mobilidade embrionária, mas não causou efeitos remanescentes as 24 horas após a administração.

**Palavras-chave:** anti-inflamatório não esteroide, transferência de embrião, prenhez, prostaglandina

ANDRADE, V. P. Effect of mefenamic acid on embryonic mobility in mares. Botucatu 2017, 45p. Thesis (Master degree) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu city, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

## ABSTRACT

In the equine specie, the embryo moves in the uterus between days 9 and 16 after ovulation, the conceptus presents a spherical shape and moves constantly in the uterine lumen through myometrial contractions, produced by chemical stimulation of the embryonic vesicle. Embryonic displacement during this period is essential for maternal recognition of pregnancy. This long stimulus period ensures that the embryo produces anti-luteolytic signals to the endometrium, avoiding the luteolysis. After 17 days the embryonic vesicle stops the mobility and occurs the fixation in one of the horns. During mobility, the embryo produces prostaglandins PGE-2, PGF, and PGI-2. If there is a failure during embryo migration the maternal recognition of pregnancy may be affected and consequently lysis of corpus luteum, resulting in the early pregnancy loss. The use of the anti-inflammatory flunixin meglumine immediately after the embryo transfer is widely used in order to prevent a local inflammatory reaction, luteolysis, and early embryonic loss. However, according to the literature, mefenamic acid cause less effects on embryonic mobility and increases pregnancy rates. The objective of this study was to elucidate the effect of mefenamic acid on embryonic mobility in mares. There were selected 10 mares for the study. After confirmation of pregnancy with transrectal ultrasound, the embryo mobility was evaluated by serial ultrasonography (every 5 minutes) during 1 hour. This examination was considered the control moment. The mares received 1.5 g of mefenamic acid orally. The second serial ultrasound examination was performed 2 hours after administration, when the drug reached the maximum serum concentration. After 24 hours of mefenamic acid administration, the third evaluation was accomplished in order to verify if the meclofenamic acid presented residual effects. The control moment resulted in a mean value of  $6.0 \pm 0.3$  movements per hour (m/h) of evaluation. After treatment with mefenamic acid, the embryos presented  $2.7 \pm 0.3$  m/h and at 24 hours  $5.2 \pm 0.4$  m/h. We can conclude that mefenamic acid affected embryonic mobility, but did not cause remnant effects 24 hours after administration.

**Keywords:** non-steroidal anti-inflammatory, embryo transfer, pregnancy, prostaglandin

# **CAPÍTULO 1**

## 1. INTRODUÇÃO

O complexo do agronegócio do cavalo no Brasil aumentou nos últimos anos, em vista da criação está direcionada a população urbana, as quais utilizam os animais para esporte e lazer. Levantamento feito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento mostrou que em abril de 2015 o mercado atingiu 16,15 bilhões de reais em renda e 3 milhões de empregos diretos e indiretos no país. O número de equinos ultrapassa a marca 5 milhões de cabeças (MAPA, 2016).

Com o surgimento de novas biotécnicas da reprodução nas últimas décadas foi possível agilizar o desenvolvimento de raças e cruzamentos, tendo assim uma maior utilização desses animais. A inseminação artificial foi uma das pioneiras a se sobressair e posteriormente a transferência de embriões (TE), podendo ser considerada a mais promissora (ARRUDA et al., 2001).

A TE em equinos foi inicialmente aceita pela Associação dos Criadores de Cavalo Quarto de Milha, no final da década de 1970, somente para as fêmeas idosas e inférteis, e a técnica não foi empregada até metade da década de 80 em outros países (SQUIRES; MCCUE; VANDERWALL, 1999). Baseando-se nas informações de embriões transferidos, o Brasil ocupa a 1º posição (15.000 produtos nascidos), seguido da Argentina e Estados Unidos (STROUD, 2012).

A eficácia da TE pode ser afetada pela contaminação uterina durante o processo, a intensa manipulação da cérvix e a presença da vesícula embrionária no ambiente uterino da receptora, sendo capaz de ocasionar uma resposta inflamatória subclínica, podendo levar a liberação de prostaglandina F<sub>2</sub> α (PGF<sub>2</sub> α), consequentemente lise do corpo lúteo e morte embrionária (KASK; ODENSVIK; KINDAHL, 1997; NEELY; STABENFELDT; SAUTER, 1979). A perda embrionária precoce é uma das causas da baixa eficiência reprodutiva e subfertilidade em éguas (BALL et al., 1986).

Para resolver isto, Koblischke et al. (2008) utilizaram flunixin meglumine e o ácido mefenâmico após a TE e verificaram que receptoras tratadas com ácido mefenâmico apresentaram concentrações menores de PGFM e não houve alteração na produção de prostaglandina E pelo embrião. Os autores

concluíram que o uso do ácido mefenâmico após a TE provavelmente interfira menos na mobilidade embrionária e reconhecimento materno-fetal quando comparado ao flunixin meglumine.

O embrião equino sinaliza sua presença no útero produzindo as prostaglandinas PGE-2, PGF-2 $\alpha$  e PGI-2 (WATSON; SERTICH, 1989). Em seguida a sinalização, o conceito estimula mecanismos que promovem a mobilidade entre os dias nove e 16 após a ovulação (LEITH; GINTHER, 1984). As taxas de morte embrionária antes de 60 dias oscilam de 2,6% a 24% (média 8,6%), gerando grandes perdas na criação de equinos (VANDERWALL, 2008).

A utilização do anti-inflamatório não esteroideal flunixin meglumine, após a TE é comumente empregado após a técnica, com intuito de impedir que a PGF2 $\alpha$  ocasione a lise do corpo lúteo. Na literatura há trabalhos que demonstraram que o uso deste fármaco pode ser deletério para a mobilidade embrionária, bem como redução das taxas de prenhez (KOBLSCHKE et al., 2008). O uso do ácido mefenâmico já demonstrado como eficaz em éguas receptoras assincrônicas em relação a doadora, mesmo sendo utilizado por vários dias consecutivos, apresentando taxas de prenhez significativamente maiores nos grupos tratados com esse medicamento (WILSHER et al., 2006). O objetivo do presente estudo é analisar o efeito dessa droga em relação a mobilidade do conceito.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO E MOBILIDADE EMBRIONÁRIA

O reconhecimento materno da gestação é frequentemente utilizado para referir a interação entre o embrião e a mãe desde o início da gestação, para assegurar a produção constante de progesterona e da gestação. Em suínos e ruminantes os encarregados pelo reconhecimento são interferon tau e o estrogênio e são os responsáveis pelo prolongamento do corpo lúteo (BAZER; SPENCER; OTT, 1997).

A comunicação física entre o embrião e o útero materno é fundamental para o reconhecimento da gestação. O embrião equino movimenta-se no interior do útero até sua fixação, e essa mobilidade é de suma importância para que não ocorra luteólise (GINTHER, 1985). A movimentação que o conceito executa é um dos componentes do reconhecimento materno da gestação (MCDOWELL et al., 1985). A liberação dos prostanóides promovem contrações miométrais impulsionando a vesícula por todos os segmentos uterinos (KASTELIC; ADAMS; GINTHER, 1987; GASTAL et al., 1998).

No dia 5, após a ovulação o embrião atinge o estágio de mórula compactada e inicia a secreção de grandes quantidades de prostaglandina E2 (PGE-2) para que ocorra o relaxamento das fibras musculares lisas da parede da tuba uterina e, dessa forma, o conceito migra para o útero (GASTAL et al., 1998; STOUT; ALLEN, 2001). No ambiente uterino, a cápsula glicoproteica do blastocisto é secretada pelo trofocotoderma, encontrado entre este tecido embrionário e a zona pelúcida. Após 22 dias de gestação, a cápsula começa a sofrer digestão enzimática (ORIOLE; SHAROM; BETTERIDGE, 1993) e se desfaz (BETTERIDGE, 1989). A cápsula oferece proteção física ao embrião, e também está envolvida no reconhecimento materno da gestação pelo contato íntimo com o endométrio (STOUT; MEADOWS; ALLEN, 2005), servindo para proteger o conceito de microorganismos intra-uterinos e contra o reconhecimento imunológico materno (BETTERIDGE, 1989). Sugere-se que a cápsula auxilia na migração pelo efeito anti-adesivo, devido a elevada concentração de ácido sialicílico carregados negativamente, englobado nas glicoproteínas integrante (ORIOLE; SHAROM; BETTERIDGE, 1993). A cápsula está envolvida no reconhecimento materno devido ao seu contato intrínseco com o endométrio (STOUT; MEADOWS; ALLEN, 2005).

O desenvolvimento embrionário equino foi estudado por Rambags et al. (2008) que identificaram receptores de hormônios esteroides no conceito no início da gestação, quando há elevadas concentrações de hormônios. Verificaram também a expressão para receptores de progesterona na membrana plasmática, apesar de não ter receptores intracelulares deste hormônio. Não foi identificada expressão para receptor de estrógeno no núcleo

celular e sim no trofotoderma extra-embriônico, apresentou enzimas para a produção de estrógeno. Os resultados ampliam a possibilidade de que os esteroides reprodutores sejam capazes de exercer seu impacto sobre o desenvolvimento e pré-implantação do conceito de modo direto e não apenas por meio do endométrio.

A sinalização gerada pelo conceito para que haja o reconhecimento materno da gestação ainda não foi identificada, todavia foram identificadas proteínas de massa molecular de 1 a 6 kDa (WEITHENAUER et al., 1987 apud STOUT, 2016) ou 3 a 10 kDa (ABABHEH et al., 2000). De acordo com Walters, Roser e Anderson (2001), há vários mediadores químicos produzidos pelo embrião que determinam a sinalização, como os fatores de crescimento semelhantes à insulina (Insulin-like growth factors – IGF-1) e estrógenos (STOUT; ALLEN, 2002), dentre outros, aptos a alterar as secreções do útero, aumentando a vascularização local e promovendo a contração do miométrio encarregado pela mobilidade (SILVA et al., 2005; STOUT; ALLEN, 2001).

Umas das condições para que ocorra o reconhecimento materno da gestação, o conceito deve ter tamanho e crescimento apropriado (GINTHER, 1983), sendo que a maior causa de perda embrionária precoce é o atraso no seu desenvolvimento (GINTHER, 1985). Para que ocorra o reconhecimento e manutenção da gestação, as secreções uterinas ou histiotrófo, são promovidos pela migração da vesícula embrionária, que representa uma das fontes de nutrientes na etapa que antecede a formação do corioalantóide; da qual não se inicia antes dos 45 dias de prenhez (MCDOWELL et al., 1988; SHARP et al., 1989; SPENCER et al., 2004)

Uma das proteínas secretadas pelo estímulo da progesterona (P4) no endométrio é a uterocalina (STEWART et al., 1995; CROSSETT; ALLEN; STEWARTT, 1996). Esta proteína é facilmente encontrada nas secreções uterinas e tecido endometrial no diestro e início da gestação (STEWART et al., 2000; CROSSETT et al., 1998). A função da uterocalina é carrear pequenas moléculas hidrofóbicas da fêmea para o conceito. Inicialmente estudos demonstraram que essa proteína é absorvida pela cápsula do blastocisto (STEWARTT et al., 1995). A uteroferrina é outra proteína, cuja produção é



mediada pela P4, foi descrita em suínos (ROBERTS; BAZER 1984; ROBERTS; RAUB; BAZER, 1986), a uteroferrina tem como função o transporte de ferro na placenta. Já a uteroglobina é exclusiva para ligações lipofílicas que é capaz de induzir a quiescência uterina e implantação embrionária, preservando o conceito do sistema imune materno (ELLENBERGER et al., 2008).

A migração da vesícula por toda extensão do útero deve ser executada de modo repetitivo e contínuo com o intuito de suspender devidamente os fatores que desencadeiam a luteólise (MCDOWELL et al., 1988). A prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) uterina (secreção exócrina) foi mensurada em tecido endometrial de 21 éguas, e observou-se que esse prostanóide pode estar ligado ao reconhecimento materno. Na ausência do conceito, as secreções uterinas induzem a PGF<sub>2α</sub> alcançar o estroma uterino e associado ao sistema vascular (secreção endócrina), alcancem o CL e por conseguinte ocorra a luteólise (VERNON et al., 1981).

Em virtude da mobilidade embrionária no início da gestação acontece a redução da expressão de receptores de ocitocina e da expressão da enzima ciclooxigenase-2 no endométrio, impossibilitando a produção de PGF<sub>2α</sub> e o começo do processo de lise do corpo lúteo aproximadamente 12 a 13 dias após a ovulação (EALY; EROH; SHARP 2010).

Como resultado à sinalização do embrião, o fator inibidor da síntese de prostaglandina (EPSI) é produzido e auxilia no bloqueio da lise do CL em complemento a redução da expressão dos receptores de ocitocina, impossibilitando a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina. Os dois processos associados são eficientes para bloquear a luteólise no começo da gestação (GAIVÃO; STOUT, 2007; SHARP, 2000).

Já a PGE<sub>2</sub> embrionária pode inibir a luteólise e colabora com o reconhecimento materno (WEBER et al., 1992). Nas espécies domésticas a PGE exerce papel anti-luteolítico, como em ovelhas (MAGNESS et al., 1981) e porcas (FORD; CHRISTENSON, 1991). Embora não haja a confirmação científica do papel da PGE no endométrio da fêmea equina, elevadas concentrações dessa prostaglandina foram encontradas no lúmen uterino até

os 20 dias de gestação (STOUT; ALLEN, 2002). Além da PGE proveniente no embrião, o endométrio também sintetiza esse prostanóide com base na ampliação da expressão de enzima prostaglandina E sintase (PTGES) no começo da gestação, colaborando com a produção embrionária para promover a contração do útero (BOERBOOM, 2004).

A produção das prostaglandinas acontece a partir da enzima prostaglandina endoperóxido sintase ou ciclooxigenase (HAMBERG et al.; 1974; NEEDLEMAN et al.; 1986). A ativação da fosfolipase resulta na liberação do ácido araquidônico a partir de glicerolípídios complexos e a via da ciclooxigenase (COX) produz prostaglandinas e tromboxanos (HONG; DEYKIN, 1981). A COX possui duas isoformas que apresentam diferenças estruturais pela isoleucina 523 na ciclooxigenase-1 (COX-1) trocada por valina na ciclooxigenase-2 (COX-2), que estimula o sítio de ligação hidrofóbico no qual aderem-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) COX-2 seletivos. A COX-1 quando comparada a COX-2 dispõe de um sítio de ligação 25% maior e possui um sítio secundário, possibilitando a produção de AINEs de ligação específica (LUONG et al., 1996).

A COX-1 é vista como constitutiva ou endógena e colabora com o metabolismo fisiológico de vários tecidos no organismo, já a COX-2 é apontada como indutiva (HABENICHT et al., 1985). A estimulação da COX-2 pode acontecer por via hormônios folículo estimulante e luteinizante (SIROIS; SIMMONS; RICHARDS, 1992), citocinas inflamatórias (JONES et al., 1993) e endotoxinas provenientes de macrófagos (MONICK et al., 2002).

O estrógeno na fase inicial da gestação (18 dias) aumenta a expressão da COX-1 no endométrio de éguas prenhes, sendo que seu pico de concentração ocorre aos 22 dias. Nessa fase ocorre a redução na expressão da COX-2, sendo a COX-1 a enzima fundamental que fornece PGH<sub>2</sub> para prostaglandina F sintase (PTGFS) e enzima PGES, ocasionando a produção de prostaglandinas no começo da gestação. A elevação do receptor de prostaglandina E, tipo 2 (PTGER2) participa do relaxamento do útero e

receptividade e independentemente da produção uterina de prostaglandina, o receptor de prostaglandina F (PTGFR) é suprimido (ATLI et al., 2010).

A COX-2 foi detectada em quantidades abundantes no endométrio de éguas cíclicas (15 dias após a ovulação), já em éguas na fase de gestação foi inferior, relacionado à supressão de PGF<sub>2</sub>α uterina. O embrião favorece de modo direto a dessensibilização da atividade da COX-2 (BOERBOOM, 2004).

Após o embrião entrar no útero ele se movimenta com frequência ao longo dos próximos 10 dias, estimulado por contrações peristálticas do miométrio impulsionado pela liberação das prostaglandinas embrionárias (STOUT; ALLEN, 2001). Após 12 dias a camada externa de células do trofotoderma do blastocisto, até então não expandido, secreta significativas quantidades de glicoproteínas de alta massa molecular ricas em treonina e serina (ORIOLE et al., 1993), formando uma capa resistente e elástica, a cápsula do blastocisto (BETTERIDGE, 1989), que protege o embrião pelos próximos 20-25 dias.

O concepto equino é extremamente móvel no lúmen uterino (GINTHER, 1983) e desloca-se de um corno para o outro em média 13 vezes ao longo do dia, diversas vezes percorre todo o comprimento do corpo uterino e cornos (GINTHER, 1985), e movimenta-se em média 3,4 mm/minuto, sendo os dias 12 ao 14 de maior mobilidade. No dia 9 pode ser observado uma movimentação muito pequena e um aumento no dia 10 (GINTHER 1983b; LEITH; GINTHER 1984). Devido a essa mobilidade o concepto pode ser detectado desde a ponta do corno uterino até a cérvix, portanto o diagnóstico de gestação deve ser feito verificando todo o útero (GINTHER, 1998). Posteriormente ocorre a fixação, que é quando o concepto para de se movimentar, o qual acontece aos 15 dias, e mais comumente no dia 16, e dificilmente no 17º dia (GINTHER, 1983). A interrupção dos movimentos é consequência de um aumento do tônus uterino e do tamanho da vesícula, fazendo com que ela se fixe em um dos cornos uterinos (GINTHER 1983a; GASTAL et al., 1996). Ginther (1984) observou em seu experimento que conceptos duplos se movem autonomamente, sugerindo que o próprio concepto estimula a contração, ocasionando sua movimentação por toda extensão uterina.

Provavelmente a extensa migração por todo o lúmen uterino do concepto equino visa secretar e distribuir um fator anti-luteolítico ainda não conhecido, em toda superfície endometrial (KLEIN; TROEDSSON, 2011). De acordo com Mcdowell et al. (1988) a limitação da mobilidade do embrião a menos de dois terços da superfície endometrial resulta na falha da gestação. O fornecimento de P4 exógena mantém a prenhez, demonstrando que a falha está relacionada a luteólise pela ausência da sinalização pelo embrião e conseqüentemente queda de P4. Os resultados demonstram que as gestações seguiram quando os conceptos tinham acesso a um corno uterino, corpo e 80% do corno contralateral.

Na fêmea equina, o útero desempenha seu efeito luteolítico, particularmente pela via sistêmica útero-ovário, com isso toda a superfície endometrial será apresentada ao sinal de reconhecimento da gestação pelo concepto (GINTHER, 1974).

Leith e Ginther (1984) também analisaram a mobilidade embrionária pela palpação retal auxiliada por ultrassonografia seriada a cada 5 minutos. Após identificar o local que o concepto estava, o mesmo foi marcado no desenho esquemático do útero segmentado em 9 partes cornos e corpo foram divididos em três partes. Verificaram também que o embrião nos dias 9 e 10 de gestação se encontra com maior frequência no corpo uterino.

No segmento uterino que está em contato com o embrião predominantemente observa-se a contração uterina, em vista de estímulos recebe estímulos químicos de forma direta, e depois do deslocamento da vesícula embrionária, a força das contrações locais é reduzida, indicando que a prostaglandina possui ação de curta duração (GRIFFIN; GINTHER, 1993).

O embrião equino aos 18 dias de idade produz principalmente a PGE<sub>2</sub>, manifestando maior ação no período posteriormente a fixação e começo da implantação. A PGF<sub>2</sub> $\alpha$  é sintetizada em grande quantidade na fase relacionada a movimentação do embrião promovendo a contração uterina responsável pelo

deslocamento da vesícula. A PGF2 $\alpha$  oriunda do embrião tem ação local e não chega a circulação sistêmica (STOUT; ALLEN, 2001, 2002). Aplicação de PGE-2 intrauterina elevou a contratilidade e tônus uterino, evidenciando sua influência na mobilidade embrionária (GASTAL et al., 1998; GINTHER, 1998).

Após o período de fixação e antes do desenvolvimento dos cálices endometriais por volta de 35 dias de gestação, o útero parece apresentar um atraso na capacidade de segregar PGF-2 $\alpha$  em resposta a ocitocina. Indicando que para prevenir a luteólise dos 18 aos 35 dias deva necessita de um mecanismo alternativo (STOUT; ALLEN, 2002).

## 2.2 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES E PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINAS

A eficácia da TE pode ser afetada pela probabilidade de contaminação uterina ao decorrer do processo, a intensa manipulação da cérvix pelo operador e até a presença da vesícula embrionária no ambiente uterino da receptora podem ocasionar uma resposta inflamatória no momento, mesmo que subclínica, pode levar a liberação de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), e conseqüentemente lise do corpo lúteo e morte embrionária (KASK; ODENSVIK; KINDAHL, 1997; NEELY; STABENFELDT; SAUTER, 1979). De acordo com Koblischke et al. (2008) o uso de fármacos anti-prostaglandínicos diminui a resposta inflamatória do endométrio, e pode levar ao aumento das taxas de prenhez após a TE.

Hipotetizou-se que o estímulo mecânico da cérvix induz liberação de PGF2 $\alpha$  considerável para inibir a função do CL (HIGGINS; LEES, 1984). Siriois, Betteridge e Goff (1978) observaram que a TE cervical e a dilatação da cérvix não levaram a um acréscimo direto na liberação de PGF2 $\alpha$ , mas Handler et al. (2003) observaram que depois da dilatação cervical a fase lútea diminuiu. Altas concentrações de metabólitos de PGF2 $\alpha$  foram observadas em seis de nove éguas receptoras após TE, mas não causaram luteólise (KASK; ODENSVIK; KINDAHL, 1997).

As taxas de prenhez diferenciam após a transferência cirúrgica ou transcervical (SQUIRES; MCCUE; VANDERWALL, 1999; CARNEVALE et al., 2000; FLEURY et al., 2007). Sugere-se que as causas prováveis para a menor eficiência na transferência transcervical, seja contaminação bacteriana seguida de endometrite, e variações hormonais, provocada pela manipulação cervical, interferindo no mecanismo regulador da função luteotrófica (HIGGINS; LEES, 1984; HANDLER et al., 2003).

### 2.3 EFEITO DOS ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES NA REPRODUÇÃO EQUINA

O ácido mefenâmico e o ácido flufenâmico foram os pioneiros compostos derivados de fenamato a apresentar potencial anti-inflamatório e impedir os efeitos respiratórios a substância de reação lenta da anafilaxia e bradicinina (BERRY e COLLIER, 1964; COLLIER; SHORLEY, 1963; WINDER et al., 1962). O ácido mefenâmico tem sido usado em cavalos há mais de 20 anos no tratamento de claudicação (aguda/crônica) e demais afecções muscoesqueléticas crônicas e osteoatrites agudas e crônicas. O ácido mefenâmico é um inibidor irreversível da COX-1 e da COX-2. O benefício do uso desse fármaco são os seus mínimos efeitos adversos (TASAKA, 1999).

Cuervo- Arango e Ortiz (2011) utilizaram FM de forma sistêmica com elevadas doses 2 vezes ao dia iniciando o tratamento quando as éguas apresentaram folículos maiores que 32 mm e observaram elevados no desenvolvimento de folículo anovulatório hemorrágico em 83% das éguas (5/6) e nenhum no grupo controle, indicando que o FM bloqueia efetivamente a produção de prostaglandinas.

O uso do ácido mefenâmico em receptoras que ovularam antes da doadora foi descrito por Wilsher et al (2006). O mefenâmico foi administrado do 9 dia após a ovulação e por mais 7 dias após a TE. As receptoras foram divididas em grupo controle e tratado. Nesses grupos haviam receptoras que ovularam 2, 3, 4 e 5 dias anteriormente a doadora. As receptoras tratadas com ácido mefenâmico manifestaram taxas de prenhez consideravelmente superiores em

relação ao grupo não tratado. Receptoras que ovularam 3 dias antes da doadora 8 de 10 tratadas com ácido mefenâmico engravidaram contra 2 de 10 no grupo não tratado, já as receptoras que ovularam 4 dias antes da doadora 5 de 8 tratadas engravidaram contra 1 de 8 não tratadas.

O ácido mefenâmico também foi utilizado em camelas a partir do 7º dia após a ovulação e por mais 7 dias após a TE. As TEs ocorreram no D8, D10 e D12. As taxas de gestação foram 80%, 60% e 70% respectivamente, quando comparada a 10% no grupo controle, dos quais os embriões foram transferidos em receptoras que não receberam tratamento no 8º dia após a ovulação. Os resultados sugerem que administração diária de AM pode diminuir a necessidade de sincronia estreita entre doadoras e receptoras, porque se as receptoras ovularem 4 ou 5 dias antes da doadora, essas fêmeas poderiam ser tratadas com ácido mefenâmico até a coleta do embrião da doadora (SKIDMORE; BILLAH, 2005).

Já na TE em camelas o ácido mefenâmico pode ser empregado com o intuito de atrasar a luteólise em receptoras de embrião e o FM não se mostrou eficaz neste estudo. Concluíram também que o FM diminui a taxa de prenhez quando aplicado 15 minutos antes do procedimento. As taxas de prenhez foram 16% grupo tratado e 67% controle (SKIDMORE, 2006).

Com o objetivo de reduzir inflamação após a transferência de embriões Koblischke et al (2008) utilizaram FM e o ácido mefenâmico a partir de um dia antes da TE duas vezes ao dia até quatro dias após a técnica. Foram encontradas diferenças consideráveis em amostras sanguíneas na liberação de PGFM nas três primeiras horas após a TE. Receptoras tratadas com AM apresentaram concentrações menores de PGFM do que as tratadas com FM. Em relação as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), não houve diferenças significativas entre os grupos, já a expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para PGES foi expressivamente superior no grupo FM quando comparado ao AM. A TE causou uma resposta inflamatória do endométrio e elevou o número de polimorfonucleados, e devido a essa resposta inflamatória verificou-se uma

liberação elevada de PGF-2 $\alpha$  em éguas não tratadas nos dias 2 a 4 após o procedimento. Diante do exposto os autores concluíram que o ácido mefenâmico é tão eficiente quanto o FM em inibir a resposta inflamatória, fato este que associado a menor inibição da produção de prostaglandinas quando comparado ao FM fortalece a idéia de que seu uso após a TE provavelmente interfira menos na mobilidade embrionária.

Podemos concluir que o reconhecimento materno da gestação na espécie equina é complexo e necessita de fatores tanto uterinos quanto embrionários e estes devem atuar de forma simultânea para garantir a continuidade da gestação.

### 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.

ALLEN, W. R. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. **Reproduction Domestic Animal**, v, 36, n. 3-4, p.121-131, 2001.

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.

ARRUDA, R. P.; VISINTIN, J. A.; FLEURY, J. J.; GARCIA, A. R.; MADUREIRA, E. H.; CELEGHINI E, C. C.; NETO, J. R. N. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião equinos. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 38, n. 5, p.233-239, 2001.

BALL, B. A.; LITTLE, T. V.; HILLMAN, R. B.; WOODS, G. L. Pregnancy rates at Days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to Day 14 in normal and subfertile mares. **Theriogenology**, v. 26, n. 5, p. 611-619, 1986.

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**, v. 76, n.2, p. 841-850, 1986.



BAZER, F. W.; SPENCER, T. E., OTT, T. L. Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 6, p. 412 – 420, 1997

BERRY, P. A.; COLLIER, H. O. J. Bronchoconstrictor action and antagonism of a slow reacting substance from anaphylaxis of guinea-pig isolated lung. **British Journal of Pharmacology**, v.23, n. 1, p. 201-216, 1964.

BETTERIDGE, K. J. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. S8, p.92–100, 1989.

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.

CARNEVALE, E. M.; RAMIREZ, R. J.; SQUIRES, E. L.; ALVARENGA, M. A.; VANDERWALL, D. K.; MC CUE, P. M. Factor affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 965-979, 2000.

COLLIER, H. O. J.; SHORLEY, P. G. Antagonism of mefenamic and flufenamic acids of the bronchoconstrictor action of kinins in the guinea pig. **British Journal of Pharmacology**, v. 20, n. 2, p.345-351, 1963.

CROSSETT, B., SUIRE, S., HERRLER, A., ALLEN, W. R., & STEWART, F. Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus. **Biology of Reproduction**, v. 59, n.3, p. 483-490, 1998.

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, n.1, 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.

DUBOIS, R. N.; ABRANSON, S.; CROFFORD, L. Cyclooxygenase in biology and disease. **The FASEB Journal**, v.12, n. 12, p. 1063-1073, 1998.

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.

FLEURY, P. D. C.; ALONSO, M. A.; SOUZA, F. A. C. SOUZA, ANDRÉ F. C. ANDRADE, F. C.; ARRUDA, R. P. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hcG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões eqüinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 31, n. 1, p. 27-31, 2007.

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**, v. 93, p. 203–209, 1991

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., KOT, K., GINTHER, O. J. Factors related to the time of fixation of the conceptus in mares. **Theriogenology**. v. 46, n. 7, p. 1171–1180, 1996.

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.

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. Equine Pregnancy: Physical interactions between uterus and conceptus. In. **Proceedings American Association of Equine Practitioners**, v. 44, p. 73–104, 1998.

GINTHER, O. J. Fixation and orientation of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 19, n. 4, p. 613–623, 1983a.

GINTHER, O. J. Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. **Journal of Animal Science**, v. 39, n. 3, p. 550–564, 1974.

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

GINTHER, O. J. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**. v. 19, n. 4, p. 603–611, 1983b.

GINTHER, O. J. Mobility of twin embryonic vesicles in mares. **Theriogenology**. v. 22, n. 1, p. 83–95, 1984.

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, n. 5, 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.; WAKABAYASH, T.; SAMUELSSON, B. Isolation and Structure of Two Prostaglandin Endoperoxides That Cause Platelet Aggregation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 71, n. 2, p. 345-349, 1974.

HANDLER, J.; KONIGSHOFER, M.; KINDAHL, H.; SCHAMS, D.; AURICH, C. Secretion patterns of oxytocin and PGF<sub>2</sub> alpha-metabolite in response to cervical dilatation in cyclic mares. **Theriogenology**, Stoneham, v. 59, n. 5-6, p. 1381-1391, 2003.

HIGGINS, A. J.; LEES, P. The acute inflammatory process, arachidonic acid metabolism and the mode of action of inflammatory drugs. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 3, p. 163-175, 1984.

HONG, S, L., DEYKIN, D. The activation of phosphatidylinositol hydrolyzing phospholipase A<sub>2</sub> during prostaglandin synthesis in transformed mouse BALB 3T<sub>3</sub> cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n.10, p. 5215- 5219, 1981.

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. PGF<sub>2a</sub> release associated with an ET procedure in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 4, p. 286–289, 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.

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.

LEITH, G. S.; GINTHER, O. J. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 22, p. 401–408, 1984.

LUONG, C.; MILLER, A.; BARNETT, J.; CHOW, J.; RAMESHA, C.; BROWNER, M. F. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase2. **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.

MAPA, Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo> > acesso 05/10/2017.

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, n. 2, p. 340–348, 1988.

MCDOWELL, K.J., SHARP, D.C., PECK, L.S., CHEVES, L. L. Effect of restricted conceptus mobility on maternal recognition of pregnancy in mares. **Equine Veterinary**, v. 17, n. S3 p. 23–24, 1985.

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

NEEDLEMAN, P.; TRUK, J.; JAKSCHIK, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKOWITH, J. B. Arachidonic Acid Metabolism. **Annual Review 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.

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.

OHNUMA, K; ITO, K; MIYAKE, Y, I; TAKAHASHI, J; YASUDA, Y. Detection of early pregnancy factor (EPF) in mare sera. **Journal of Reproduction and Development**, v. 42, n. 1, p. 23-28, 1996.

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, n.2, p. 653–664, 1993.

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.

ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W. Uteroferrin: a protein in search of a function. **Bioessays**, v. 1, n. 1, p. 8–11, 1984.

ROBERTS, R. M.; RAUB, T. J.; BAZER, F. W. Role of uteroferrin in transplacental iron transport in the pig. **Proceedings Federation of American Societies Experimental Biology**, v. 45, n. 25, p. 8-13, 1986.

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

SHARP, D.C.; MCDOWELL, K.J.; WEITHENAUER, J.; THATCHER, W.W. The continuum of events leading to maternal recognition of pregnancy in mares. **J Reproduction Fertility and Supplement**, v. 37, p. 101-107, 1989.

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.

SIROIS, J.; BETTERIDGE, K. J.; GOFF, A. K. PGF-2 alpha release, progesterone secretion and conceptus growth associated with successful and unsuccessful transcervical embryo transfer and reinsertion in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 35, p. 419–427, 1978.

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.

SPENCER, T. E.; BURGHART, R. C.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 2, n. 1, p. 49, 2004.

SQUIRES, E. L.; MC CUE, P. M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 91-104, Jan. 1999.

STEWART, F.; CHARLESTON, B.; CROSSETT, B.; BARKER, P. J.; ALLEN, W. R. A novel endometrial protein that associates with the embryonic capsule in equids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, n.1, p. 65-70, 1995.

STEWART, F.; KENNEDY, M. W, SUIRE, S. A novel uterine lipocalin supporting pregnancy in equids. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 57, n. 10, p. 1373–1378, 2000.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Prostaglandin E2 and F2 $\alpha$  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.; 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.; 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

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.

STROUD, B. **IETS 2012 Statistics and Data Retrieval Comitee Report**. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. (Denver); International Embryo Transfer Society's IETS 2012. 14 p. Disponível em [http://www.iets.org/pdf/comm\\_data/December2012.pdf](http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2012.pdf) . Acesso em: 05 fevereiro 2018.

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, S. H.; GÓRNIAC, L.S.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.21, p.212-226, 1999.

VANDERWALL, D.K. Early embryonic loss in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.11, p.691-702, 2008.

VERNON, M. W.; ZAVY, M. T.; ASQUITH, R. L.; SHARP, D. C. Prostaglandin F2 $\alpha$  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.

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.

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, 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.

WILSHER, S.; KOLLING, M.; ALLEN, W. R. Meclofenamic acid extends donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 5, p. 428-432, 2006.

WINDER, C. V.; WAX, J.; SCOTTI, L.; SCHERRER, R. A.; JONES, E. M.; SHORT, F. W.; Anti-inflammatory, antipyretic and antinociceptive properties of N-(2,3-xylol) anthranilic acid (mefenamic acid). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.138, n. 3, p. 405-413,1962.

## **HIPÓTESE**

O ácido mefenâmico não interfere na mobilidade embrionária em éguas.

## **OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi aclarar o efeito do ácido mefenâmico sobre a mobilidade embrionária em éguas.



## **CAPÍTULO 2**

## ARTIGO

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 0882, ranqueada como B1 pelo Qualis – CAPES de 2016-2017

## **Efeito do ácido mefenâmico na mobilidade uterina de embriões equinos**

### RESUMO

Na espécie equina a mobilidade embrionária ocorre entre os dias 9 e 16 após a ovulação e nesta fase o embrião se desloca constantemente pelo ambiente uterino por meio das contrações miométrais produzidas por estímulos químicos. Durante a mobilidade a vesícula embrionária equina produz prostaglandinas PGE-2, PGF-2 $\alpha$  e PG1-2. Com o propósito de reduzir a inflamação após a transferência de embriões (TE) em éguas, o uso do anti-inflamatório não esteroide flunixin meglumine é comumente empregado, contudo, este interfere negativamente na migração do embrião e taxas de prenhez. Por outro lado, o uso do ácido mefenâmico mostrou-se eficiente em elevar as taxas de prenhez em éguas receptoras de embrião assincrônica. O objetivo do trabalho é verificar o efeito do ácido mefenâmico sobre a mobilidade embrionária em éguas. Foram utilizados 10 animais e as avaliações foram realizadas nos dias 12 e 13 após a ovulação, tempo este que coincide com maior pico da mobilidade da vesícula. As éguas foram submetidas a palpação transretal seriada guiada por ultrassonografia cada 5 minutos durante 1 hora. Imediatamente após a primeira hora o animal recebeu de forma oral o ácido mefenâmico e depois de 2 horas após as éguas foram reavaliadas durante mais 1 hora de palpação seriada a cada cinco minutos. Uma terceira avaliação foi realizada após 24 horas, a fim de verificar se o fármaco apresentou efeito residual. O útero foi dividido em 6 segmentos e após a vesícula embrionária ser localizada a mesma foi registrada. Na primeira avaliação foi constatado  $6,0 \pm 0,3$  movimentos por hora (m/h), já no grupo tratado houve uma redução significativa da mobilidade embrionária  $2,7 \pm 0,3$  m/h ( $p < 0,05$ ), e não foi observado diferença na mobilidade 24 horas após a primeira avaliação. A mobilidade embrionária independente dos momentos esteve mais concentrada no segmento cranial do corpo uterino e segmento caudal do corno ( $p < 0,05$ ). Concluímos que o ácido mefenâmico interfere negativamente na mobilidade embrionária.

Palavras-chave: anti-inflamatório não esteroide, mobilidade embrionária, transferência de embrião, prostaglandina, prenhez.

## 1. INTRODUÇÃO

Para o reconhecimento materno da gestação, o embrião equino sinaliza sua presença no ambiente uterino produzindo prostaglandinas PGE-2, PGF-2 $\alpha$  e PGI-2 [1]. Em seguida a sinalização, o conceptoo estimula mecanismos que promovem sua mobilidade entre os dias 9 e 16 após a ovulação [2], necessárias para que haja o reconhecimento materno da gestação [3,4]. As prostaglandinas sintetizadas pelo embrião não chegam a circulação sanguínea sistêmica, sendo assim não são capazes de induzir a lise do corpo lúteo [4].

As prostaglandinas são formadas a partir do ácido araquidônico existente na membrana plasmática das células [5,6]. O ácido araquidônico disponibilizado é convertido em prostaglandina pela atividade da enzima prostaglandina G/H sintase, também identificada como ciclooxigenase (COX) [6,7]. A COX dispõe de duas isorformas, a COX-1 e a COX-2 e são denominadas constitutiva e indutiva na devida ordem [8]. No início da gestação em éguas a COX-1 é a enzima mais presente no endométrio, já COX-2 encontra-se em baixa concentração [9].

A mobilidade embrionária ocorre por toda extensão do endométrio com intuito de assegurar que o fator de reconhecimento materno seja distribuído de forma uniforme no ambiente uterino. O pico da migração da vesícula ocorre por volta dos dias 11 e 14 após a ovulação [10,11].

A utilização de anti-inflamatórios não esteroides (AINES), após a transferência de embriões (TE), é comumente empregado [12]. Seu uso se justifica em virtude da contaminação uterina durante a TE, a intensa manipulação da cérvix e a presença da vesícula embrionária no ambiente uterino da receptora podem ocasionar uma resposta inflamatória após o processo, mesmo que subclínica, levando a liberação de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2  $\alpha$ ), e conseqüentemente lise do corpo lúteo e morte embrionária [13,14]. Com o propósito de reduzir a inflamação após a TE em éguas, o uso do anti-inflamatório não esteróide flunixin meglumine (FM) é comumente empregado, contudo, este interfere negativamente na migração do embrião e taxas de prenhez [4].

O uso do ácido mefenâmico foi descrito por Koblischke et al. [12], os quais encontraram diferenças consideráveis em amostras sanguíneas na liberação de PGFM nas três primeiras horas após a TE. Receptoras tratadas com ácido mefenâmico apresentaram concentrações menores de PGFM do que as tratadas com FM. Já a expressão de transcritos para PGES foi superior no grupo flunixin meglumine quando comparada ao ácido mefenâmico. Diante do exposto os autores concluíram que o ácido mefenâmico é tão eficiente quanto o FM em inibir a resposta inflamatória, fato este que associado a menor inibição da produção de prostaglandinas quando comparado ao FM fortalece a idéia de que seu uso após a TE provavelmente interfira menos na mobilidade embrionária durante a fase de reconhecimento materno da gestação.

O uso do FM em receptoras também foi descrito por Okada et al. [15], onde foram usadas 230 receptoras que receberam 1,1 mg/kg de FM em seguida a TE. Contudo verificaram que o flunixin não aumentou as taxas de prenhez nas éguas receptoras de embrião, apresentando tendência em aumentar a perda gestacional precoce.

O ácido mefenâmico também foi utilizado por 9 dias após a ovulação e por mais 7 dias após a TE para sincronizar receptoras de embrião equino assincrônicas em relação a doadora e os resultados demonstram que as taxas de prenhez foram consideravelmente superiores em relação ao grupo não tratado [16].

O efeito do ácido mefenâmico sobre a mobilidade embrionária ainda não foi descrito na literatura, no entanto alguns autores sugerem que o fármaco possa ter uma menor interferência nos movimentos executados pelo embrião. Desta forma, o objetivo deste estudo foi elucidar o efeito do ácido mefenâmico sobre a mobilidade do embrião equino.

## 2. MATERIAL E MÉTODO

## 2.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética e uso animal (CEUA), com número de protocolo 0196/2017, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), câmpus Botucatu, SP, Brasil.

## 2.2 Local e animais

O experimento foi realizado durante a estação reprodutiva, no hemisfério sul nos meses de novembro de 2016 a fevereiro de 2017, na Universidade Estadual Paulista (UNESP) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia na cidade de Botucatu, SP, Brasil (latitude 22°53'09"S e longitude 48°26'42"W).

Foram utilizadas 10 éguas, sem raça definida, entre 8 e 20 anos de idade, nulíparas, pesando 350 a 450 kg, pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP). As éguas foram mantidas em piquetes e receberam diariamente 15 kg de pré-secado de capim tifton, sal mineral e água *ad libitum*. Todos os animais estavam em plena atividade reprodutiva e não possuíam quaisquer anormalidades no trato reprodutivo que pudessem ser detectadas por exame de palpação ou ultrassonografia transretal. Dois garanhões com fertilidade comprovada foram utilizados como doadores de sêmen.

## 2.3 Avaliações ultrassonográficas

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 250 microgramas de acetato de estrelin (Estrelin®, Botupharma, Botucatu, Brasil, aplicado via intramuscular. No dia posterior, a inseminação artificial (IA) foi efetivada com 1 bilhão de espermatozoides móveis. A ovulação foi confirmada no dia seguinte a IA, e o diagnóstico de gestação aos 12 ou 13 dias após a ovulação e posteriormente o primeiro momento da mobilidade embrionária foi acompanhado.

Logo após o diagnóstico de gestação por meio de ultrassonografia transretal e visualização da vesícula embrionária, uma série de ultrassonografias, foram realizadas a cada 5 minutos durante 1 hora. A posição do embrião, em relação ao útero, foi anotada de acordo com Okada et al [19] (Figura 1), dividindo o útero em 6 partes, sendo 3 do corpo e 3 de cada corno. Essa primeira hora de exame foi denominada pré-tratamento.

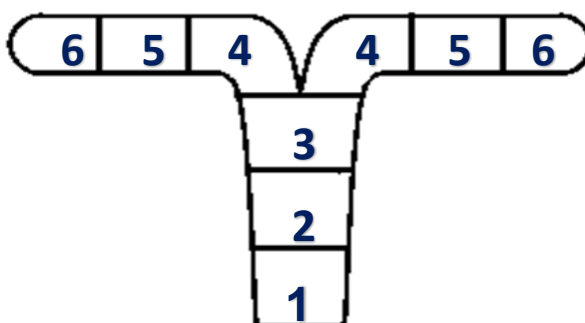


Figura 1: Modelo representativo para avaliação da mobilidade embrionária no útero, onde ambos os cornos foram estatisticamente considerados como um. (1) segmento caudal do corpo uterino, (2) segmento médio do corpo uterino, (3) segmento cranial do corpo uterino, (4) segmento caudal do corno, (5) segmento médio do corno e (6) segmento craniano do corno

## 2.4 Tratamento

O tratamento com o ácido mefenâmico foi realizado após a 1 hora de análise sequencial de mobilidade. A dose administrada foi de 1,5g por animal de ácido mefenâmico (Ponstan®, Pfizer) em forma de comprimidos contendo 500mg de ácido mefenâmico. Os comprimidos foram macerados, diluídos em água, colocados em seringa e posteriormente administrados por via oral.

No tempo previsto da máxima (2 horas) concentração plasmática [22] da administração do medicamento, a segunda série de ultrassonografias foi realizada. Assim como a primeira, a localização da vesícula embrionária foi registrada a cada 5 minutos durante 1 hora.

24 horas após a aplicação do ácido mefenâmico, o terceiro exame ultrassonográfico foi realizado com o objetivo de verificar o efeito residual do fármaco sobre a mobilidade embrionária.

## 2.5 Análise Estatística

As avaliações dos movimentos por hora foram representadas pela média e erro padrão de acordo com as condições experimentais e avaliação da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov (K-S). Como as variáveis não apresentaram distribuição normal utilizou-se o teste de Friedman seguido pelo 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](http://www.graphpad.com)).

Os dados da mobilidade embrionária para o tempo de permanência do embrião em cada segmento uterino foi avaliado utilizando SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). As diferenças entre os tratamentos foram analisadas utilizando testes paramétricos (teste de Duncan) e não paramétricos (Wilcoxon), de acordo com a normalidade do resíduo (distribuição gaussiana) e a homogeneidade da variância. As transformações foram aplicadas sempre que possível.

## 3 RESULTADOS

A mobilidade foi reduzida 2 horas após o tratamento ( $2,7 \pm 0,3$  movimentos/hora) ( $p > 0,05$ ) e retornou aos valores iniciais, pré-tratamento ( $6,0 \pm 0,3$  movimentos/hora), as 24 horas após o tratamento ( $5,2 \pm 0,4$  movimentos/hora).

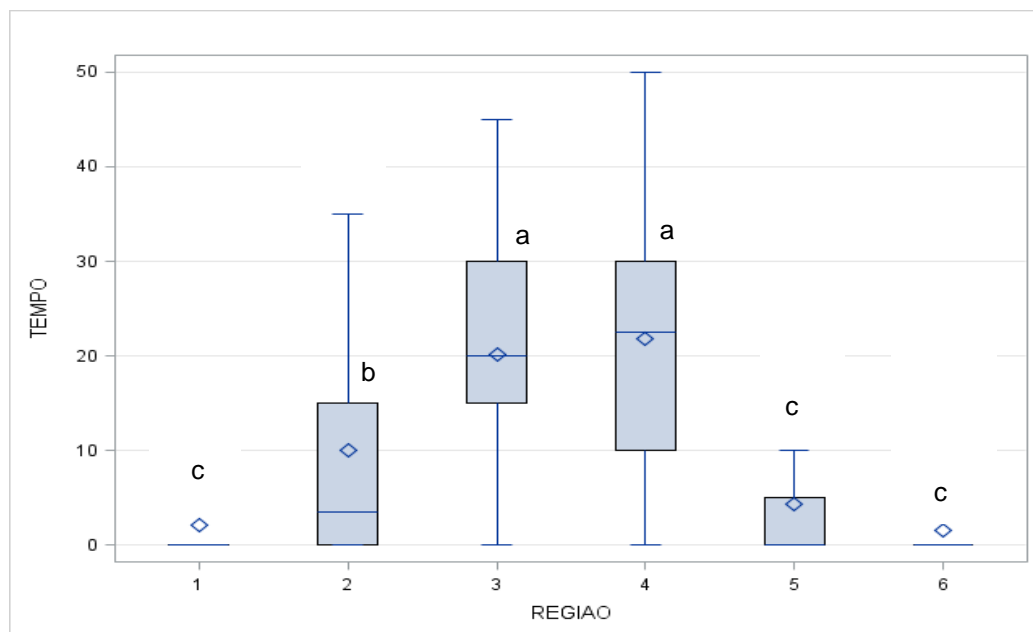


Figura 1. Tempo em minutos de permanência do concepto nos segmentos uterinos de acordo com os momentos. (1) segmento caudal do corpo uterino, (2) segmento médio do corpo uterino, (3) segmento cranial do corpo uterino, (4) segmento caudal do corno, (5) segmento médio do corno e (6) segmento craniano do corno Letras minúsculas (a, b, c) demonstram significância estatística ( $p < 0.05$ )

Independente dos momentos a migração do embrião esteve mais concentrada nas regiões 3 e 4 do útero e um pouco menos no segmento 2 e nas regiões 1 e 6 o embrião praticamente não esteve em contato.

#### 4 DISCUSSÃO

A primeira avaliação por ultrassonografia da mobilidade embrionária em equinos foi estabelecida por Leith e Ginther [2] os quais segmentaram o útero em 7 partes (corpo do útero e 3 partes de cada corno) e analisaram a cada 5 minutos por 2 horas, observando 6,5 movimentos por hora. Ginther [17] avaliando a mobilidade dividiu o útero em 9 partes (corpo 3 e cada corno 3) e observou que em 2 horas o embrião se movimentou em média 0.9 vezes de um corno ao outro, o que equivale a 11 vezes ao dia. Stout e Allen [10] também avaliaram a mobilidade por meio de ultrassonografia seriada durante 1 hora e foram observados 4, 7 movimentos por hora. As avaliações foram realizadas em



éguas aos 12 e 14 dias de gestação. Seguindo esse mesmo modelo Okada et al. [19] segmentaram o útero em 6 partes e também avaliaram a mobilidade durante uma hora e observaram 4,7 movimentos por hora. O mesmo padrão proposto por estes autores foi aplicado neste estudo.

As avaliações de Stout e Allen [10] e Okada et al. [19] foram seguidas da aplicação do anti-inflamatório não esteroide flunixin meglumine (FM), com intuito de verificar alteração nos movimentos embrionários. Estes observaram uma queda da mobilidade embrionária de  $4,7 \pm 0,8$  para  $1,8 \pm 0,8$  movimentos por hora durante o pico de mobilidade aos 12 e 14 dias após a ovulação. Okada et al. [19] também observaram após a aplicação do FM redução da mobilidade de  $5,8 \pm 0,3$  para  $2,3 \pm 0,5$  movimentos por hora.

O efeito do ácido mefenâmico sobre a mobilidade embrionária em éguas ainda não foi descrito na literatura, mas seu uso foi relatado por Wilsher et al. [16] em éguas receptoras que ovularam antes da doadora levando a um incremento nas taxas de prenhez quando comparados ao grupo não tratado. Das receptoras que ovularam 3 dias antes da doadora 8 de 10 ficaram gestantes contra 2 de 10 do grupo não tratado, das que haviam ovulado 4 dias antes da doadora 5 de 8 éguas tratadas contra 1 de 8 não tratada. Em estudo realizado em camélas animais tratados com ácido mefenâmico (a partir do 7º dia após ovulação e por mais 8 dias após TE) apresentaram taxas de prenhez de 80%, 60% e 70% transferidos em receptoras D8, D10 e D12, respectivamente. Contudo, as taxas de prenhez do grupo não tratado foram de 10% [18].

O tratamento de éguas com AINE's tem sido uma opção para a redução da inflamação uterina após a TE. O FM e o ácido mefenâmico foram utilizados por Koblischke et al. [12] em éguas receptoras de embrião a partir de um dia antes da TE 2 vezes ao dia até 4 dias após a técnica. O controle da reação inflamatória foi similar entre os dois tratamentos. Contudo, foram encontradas concentrações menores de PGFM no grupo tratado com o ácido mefenâmico e a expressão de RNAm para PGES foi maior no grupo FM em relação ao ácido mefenâmico, demonstrando que o mefenâmico tem uma menor interferência na liberação de prostaglandinas.

Ainda não se sabe qual COX é predominante no embrião equino no decorrer da produção de prostaglandinas que propiciam a mobilidade. Para Tan et al. [20] tanto a COX-1 bem como a COX-2 são observadas na fase de implantação de embriões humanos. Já em camundongos, a COX-1 está expressa quando o embrião possui mais de 4 blastômeros até blastocisto e a COX-2 intensifica sua expressão a partir do estágio de duas células.

No início da gestação em éguas, a COX-1 é predominante no endométrio, isso porque ocorre o aumento da expressão dessa enzima pela estimulação estrogênica embrionária. Por outro lado, o estímulo do embrião ocasiona a redução na expressão da COX-2 [21].

O ácido mefenâmico é um inibidor da COX-1 e COX-2 e reduziu neste experimento em média 55% da mobilidade embrionária. Já no estudo de Okada et al. [19] o FM inibidor também não seletivo da COX-1 e COX-2 reduziu em média 60% da mobilidade. O meloxicam, mesmo sendo COX-2 preferencial diminuiu em 67% os movimentos embrionários. O firocoxibe, um inibidor COX-2 seletivo não alterou a mobilidade embrionária. Diante do exposto, os autores concluíram que o mecanismo da mobilidade embrionária deva ser mais dependente da COX-1 e que o firocoxibe seria uma alternativa viável para o tratamento, quando necessário, com anti-inflamatório não esteroide no início da gestação em éguas.

Em relação ao tempo médio de permanência do embrião em cada segmento uterino de acordo com os momentos pré-tratamento, tratado e 24 após, observamos que independente do tratamento, o embrião permaneceu mais tempo nas regiões 3 (segmento cranial do corpo uterino) e 4 (segmento caudal do corno) do útero e por menos tempo no segmento 2 (segmento médio do corpo uterino), já as regiões 6 (segmento craniano do corno) e 1 (segmento caudal do corpo uterino) praticamente não estiveram em contato com o concepto. Os resultados corroboram com os de Okada et al. [19], no qual a migração embrionária do grupo meloxicam foi mais concentrada nas regiões 2, 3 e 4, e a região 6 também foi a que menos esteve em contato com o embrião.

Já o deslocamento do conceito foi mais lento no momento tratado em relação ao pré-tratamento e 24 horas, sendo 3 movimentos por hora momento tratado, 5 movimentos por hora 24 horas após o tratamento e 6 movimentos por hora no pré-tratamento. Okada et al. [19] também observaram um valor médio similar ao do presente experimento no momento pré-tratamento 8 movimentos por hora, 24 horas após o tratamento 7 movimentos por hora.

De acordo com os resultados do presente experimento podemos concluir que o anti-inflamatório ácido mefenâmico interfere negativamente na mobilidade embrionária, a despeito de outros autores terem observado um incremento nas taxas de prenhez utilizando este fármaco em receptoras de embrião. Este fato sugere que a redução momentânea da mobilidade embrionária observada com o uso do ácido mefenâmico não interfere na continuidade 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. *Journal of Reproduction and Fertility* 1989; 87:331–336.

[2] Leith GS, Ginther OJ. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology* 1984;22: 401–408.

[3] Gastal MO, Gastal EL, Torres CAA, Ginther OJ. Effect of PGE<sub>2</sub> on uterine contractility and tone in mares. *Theriogenology* 1998;50:989–99.

[4] Stout TAE, Allen WR. Prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> 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 Journal of Veterinary Research Animal Science* 2006;43:824–40.

[6] Shimizu T, Wolfe LS. Review: Arachidonic Acid Cascade and Signal Transduction. *Journal Neurochem* 1990;55:1–15.

- [7] Needleman P, Truk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic Acid Metabolism. *Annual Review Biochemistry* 1986;55:69–102
- [8] Habenicht AJR, Goerig M, Grulich J, Rothe D, Gronwald R, Loth U. Human platelet-derived growth factor stimulates prostaglandin synthesis by activation and by rapid de novo synthesis of cyclooxygenase. *Journal of Clinical Investigation* 1985;75:1381–7
- [9] Gastal MO, Gastal EL, Torres CAA, Ginther OJ. Effect of PGE<sub>2</sub> on uterine contractility and tone in mares. *Theriogenology* 1998;50:989–999.
- [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;19:401–408.
- [12] Koblischke P, Kindahl H, Budik S, Aurich J, Palm F, Walter I. Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology* 2008;70:1147–1158.
- [13] Kask K, Odensvik K, Kindahl H. PGF<sub>2a</sub> release associated with an ET procedure in the mare. *Equine Veterinary Journal* 1997;29:286–289.
- [14] Neely DP, Stabenfeldt GH, Sauter CL. The effect of exogenous oxytocin on luteal function in mares. *Journal of Reproduction and Fertility* 1979;55:303–308.
- [15] Okada CTC, Segabinazzi LG, Crespilho AM, Dell'Aqua JA, Alvarenga MA. Effect of the flunixin meglumine on pregnancy rates in an equine embryo transfer program. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2018;62:40-43
- [16] Willsher S, Kolling M, Allen WR. Meclofenamic acid extends donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. *Equine Veterinary Journal*. 2006;38:428-432.
- [17] Ginther OJ. Mobility of twin embryonic vesicles in mares. *Theriogenology* 1984;22:83–95.
- [18] Skidmore JA, Billah, M. Embryo transfer in the dromedary camel using asynchronous, meclofenamic acid- treated recipients. *Reproduction, Fertility and Development*. 2005;17:417-421.
- [19] Okada CTC, Andrade VP, Dell'Aqua CF, Nichi M, Fernandes CB, Papa FO, Alvarenga MA. The effect of flunixin meglumine, firocoxib and meloxicam on the uterine mobility of equine embryos. *Theriogenology*. 2018 (in press)
- [20] Tan HN, Liu Y, Diao HL, Yang ZM. Cyclooxygenases and prostaglandin E synthases in preimplantation mouse embryos. *Zygote* 2005;13:103–8.

[21] Atli MO, Kurar E, Kayis SA, Aslan S, Semacan A, Celik S. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. *Animal Reproduction Science* 2010;122:124–32.

[22] Bland SA, Blake JW, Ray RS. Mefenamic Acid Blood and Urine Levels in the Horse Determined by Derivative Gas-Liquid Chromatography—Electron Capture. *Journal of Chromatographic Science*, 1976; 14: 201-203.