

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DO FLUNIXIN MEGLUMINE NA DURAÇÃO DA FASE LUTEAL E NA
TAXA DE PRENHEZ DE RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS**

RODOLFO DE CARVALHO CARDOSO

Botucatu – SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DO FLUNIXIN MEGLUMINE NA DURAÇÃO DA FASE LUTEAL E NA
TAXA DE PRENHEZ DE RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS**

RODOLFO DE CARVALHO CARDOSO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eunice Oba

Botucatu – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Cardoso, Rodolfo de Carvalho.

Efeito do Flunixin Meglumine na duração da fase luteal e na taxa de prenhez
de receptoras de embriões bovinos. / Rodolfo de Carvalho Cardoso. –
Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

Orientadora: Eunice Oba

Assunto CAPES: 50504002

1. Bovino - Reprodução 2. Prenhez em novilhas - Estudos experimentais

CDD 636.2.0824

Palavras-chave: Bovinos, embriões, Flunixin meglumine, Progesterona,
Receptora.

Nome do Autor: Rodolfo de Carvalho Cardoso

Título: EFEITO DO FLUNIXIN MEGLUMINE NA DURAÇÃO DA FASE LUTEAL
E NA TAXA DE PRENHEZ DE RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Eunice Oba
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Roberto Sartori Filho
Membro
Departamento de Zootecnia
ESALQ – USP - Piracicaba

Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes
Membro
Universidade José do Rosário Vellano
UNIFENAS - Alfenas

Data da defesa: 02 de julho de 2009

“A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós.”

Marcel Proust

Dedico este trabalho à minha Família

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e a Seção de Pós-graduação pela oportunidade concedida.

Aos meus pais, Nilson e Marlene, e ao meu irmão Pedro, pelo apoio incondicional e pelo constante incentivo durante toda minha jornada. Vocês sempre foram o alicerce para que eu pudesse atingir meus objetivos.

À minha namorada Bruna pelo companheirismo, carinho e paciência durante todo o período de realização do meu mestrado. Agradeço também pela grande ajuda na realização das atividades práticas, principalmente durante sábados e domingos quando você abria mão de seu escasso tempo de descanso para me ajudar com os animais.

À Profa. Eunice Oba pela orientação e amizade. Agradeço muito pela confiança e apoio.

Aos docentes João Carlos Pinheiro Ferreira, Sony Dimas Bicudo e Roberto Sartori pelas contribuições técnicas em relação ao meu trabalho.

Ao Prof. Alcides de Amorim Ramos pela ajuda na análise estatística dos dados.

Aos Professores da Pós-graduação: João Carlos Pinheiro Ferreira, Roberto Sartori, José Luiz Moraes Vasconcelos, José Buratini Junior, Eunice Oba e Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga pelo conhecimento compartilhado durante as aulas ministradas, que foi de extrema importância para minha formação.

Ao Prof. Carlos Antonio de Carvalho Fernandes, e colegas da Biotran, Bruno, Eduardo e Claudiomar pelo grande apoio e confiança durante a realização de meu experimento.

Aos pós-graduandos Wolff Camargo Marques Filho e Caroline Junko Fujihara pela grande ajuda na realização da parte experimental desse trabalho.

Aos Funcionários da Fazenda Edgárdia: João Ratti Júnior, João Faustino Fogaça, Altamiro Rosam Bocetto e Benedito Faustino Fogaça pela atenção e imensa contribuição para a realização das atividades práticas.

À Chemitec Agro-veterinária pelo fornecimento dos medicamentos utilizados para realização desse trabalho.

À Biotran por possibilitar a realização de parte das atividades práticas desse trabalho junto à empresa.

À CAPES pela bolsa concedida.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho. Muito obrigado!

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

<u>TABELA 1</u>	Taxa de prenhez aos 30 dias de gestação de receptoras de embriões inovuladas com embriões produzidos <i>in vitro</i> em diferentes estágios de desenvolvimento. Grupo 1 = grupo controle; Grupo 2 = grupo de receptoras tratadas com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no momento da inovulação dos embriões	43
<u>TABELA 2</u>	Taxa de perda embrionária entre aproximadamente 30 e 60 dias de gestação de receptoras de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> em diferentes estágios de desenvolvimento. Grupo 1 = grupo controle; Grupo 2 = grupo de receptoras tratadas com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no momento da inovulação do embriões.	47
<u>TABELA 3</u>	Volume médio do corpo lúteo (cm ³) durante a fase luteal (D7 a D18) dos animais dos diferentes grupos experimentais (Grupo 1 – animais controle; Grupo 2 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo no D7; Grupo 3 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo e tratados com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no D7) (média ± erro padrão).....	49
<u>TABELA 4</u>	Valores médios para as concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) ao decorrer da fase luteal (D7 a D18) dos animais dos diferentes grupos experimentais (Grupo 1 – animais controle; Grupo 2 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo no D7; Grupo 3 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo e tratados com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no D7) (média ± erro padrão)	51

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA 1</u>	Taxa de prenhez aos 30 dias de receptoras de embriões bovinos inovuladas com embriões produzidos <i>in vitro</i> , do grupo 1 (controle) X grupo 2 (tratadas com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no momento da inovulação) ($p > 0,05$)	42
<u>FIGURA 2</u>	Volume do corpo lúteo (cm^3) durante a fase luteal (D7 a D18) dos animais dos diferentes grupos experimentais (Grupo 1 – animais controle; Grupo 2 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo no D7; Grupo 3 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo e tratados com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no D7) ($p > 0,05$).....	49
<u>FIGURA 3</u>	Valores médios para as concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) ao longo do ciclo estral (D7 a D19) entre os diferentes grupos experimentais (Grupo 1 – animais controle; Grupo 2 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo no D7; Grupo 3 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo e tratados com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no D7) ($p < 0,05$)	52
<u>FIGURA 4</u>	Valores individuais das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) ao longo do ciclo estral (D7 a D19) das fêmeas bovinas pertencentes ao grupo controle (Grupo 1)	54
<u>FIGURA 5</u>	Valores individuais das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) ao longo do ciclo estral (D7 a D19) dos animais pertencentes ao grupo de animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo no D7 do ciclo estral (Grupo 2)	55
<u>FIGURA 6</u>	Valores individuais das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) ao longo do ciclo estral (D7 a D19) dos animais pertencentes ao grupo de animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo e tratados com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no D7 do ciclo estral (Grupo 3).....	56

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE: Antiinflamatório não esteroideal

BI: Blastocisto inicial

BL: Blastocisto

BX: Blastocisto expandido

CL: Corpo Lúteo

COX: Ciclooxygenase

DAG: Diacilglicerol

DHA: Ácido docosahexaenóico

E₂: Estradiol

EPA: Ácido eicosapentaenóico

ER: Receptor de estradiol

FIV: Fecundação *in vitro* de embriões

FM: Flunixin meglumine

FSH: Hormônio folículo estimulante

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG: Gonadotrofina coriônica humana

IA: Inseminação artificial

IATF: Inseminação artificial em tempo fixo

IP₃: Trifosfato inositol

IFN- τ : Interferon-tau

IM: Intra-muscular

LH: Hormônio luteinizante

MCP-1: Proteína-1 quimiotática de monócitos

MGA: acetato de melengestrol

MIV: Maturação *in vitro* de embriões

mRNA: RNA mensageiro

OT: Ocitocina

OTR: Receptor de ocitocina

P₄: Progesterona

PG: Prostaglandina

PGF_{2α}: Prostaglandina F_{2α}

PGFM: 13,14 diidro-15 ceto prostaglandina F_{2α}

PIV: Produção *in vitro* de embriões

PKC: Proteína quinase C

PLA₂: Fosfolipase A₂

rIFN-τ: Interferon-tau recombinante

StAR: Proteína regulatória aguda da esteroidogenese

TE: Transferência de embriões

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
2. Revisão de Literatura.....	05
2.1. Ciclo estral de fêmeas bovinas.....	06
2.1.1. Luteólise e ação das prostaglandinas.....	07
2.2. Desenvolvimento embrionário inicial e estabelecimento da prenhez.	10
2.2.1. Progesterona pós-fecundação X taxa de sobrevivência embrionária.....	11
2.2.2. Reconhecimento materno da gestação.....	13
2.2.3. Estrutura e mecanismos de ação do IFN- τ	14
2.3. Falhas no estabelecimento da prenhez e mortalidade embrionária.....	15
2.4. Estratégias para diminuir a mortalidade embrionária precoce em receptoras de embriões.....	20
2.4.1. Aumentar o tamanho da folículo pré-ovulatório para gerar um CL maior.....	20
2.4.2. Aumentar a taxa de crescimento do CL.....	21
2.4.3. Aumentar o número de CLs.....	22
2.4.4. Aumentar o estímulo anti-luteolítico pelo conceito.....	23
2.4.5. Diminuir a resposta luteolítica pela unidade materna.....	23
3. Objetivos.....	28
3.1. Objetivos Gerais.....	29
3.2. Objetivos Específicos.....	29
4. Material e Métodos.....	31
4.1. Experimento 1.....	32
4.2. Experimento 2.....	35

5. Resultados e Discussão.....	41
5.1. Experimento 1.....	42
5.2. Experimento 2.....	48
5.2.1. Taxa de sincronização.....	48
5.2.2. Manipulação do trato reprodutivo.....	48
5.2.3. Volume do CL.....	49
5.2.4. Concentração plasmática de progesterona.....	50
6. Conclusões.....	58
7. Considerações Finais.....	60
8. Referências.....	62
9. Trabalhos Científicos.....	79

Resumo

CARDOSO, R.C. **Efeito do flunixin meglumine na duração da fase luteal e na taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos.** Botucatu, 2009. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O objetivo do presente estudo foi de avaliar o efeito da aplicação do flunixin meglumine (FM) no momento da inovulação de embriões bovinos sobre a taxa de prenhez de receptoras e identificar o possível mecanismo pelo qual o FM interfere positivamente na taxa de prenhez desses animais. Para tanto, foram realizados dois experimentos, sendo que no experimento 1 foram utilizadas 184 fêmeas cruzadas inovuladas com embriões produzidos *in vitro* e divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais: controle (G1) e grupo FM (G2) onde as receptoras receberam uma aplicação de 1,1 mg/Kg de FM no momento da inovulação. No experimento 2, 22 fêmeas nelore foram divididas aleatoriamente em três grupos: controle (G1); manipulação (G2) onde os 8 animais foram submetidos a manipulação do trato reprodutivo similar a inovulação de embrião no dia 7 do ciclo estral; e grupo manipulação + FM (G3), onde sete fêmeas foram submetidas a manipulação do trato reprodutivo e uma aplicação de FM (1,1 mg/Kg). Os animais dos três grupos foram submetidos a exames ultrassonográficos e colheitas de sangue diárias durante o restante do ciclo estral para determinação da duração da fase luteal e avaliação das concentrações plasmáticas de progesterona. No experimento 1 não foi observada diferença na taxa de prenhez dos animais no grupo controle e grupo FM (40,2% e 44,6%, respectivamente) ($p = 0,55$). No experimento 2 não foi observada diferença significativa na duração da fase luteal do ciclo estral entre os grupos experimentais, porém foi observado que os animais do grupo manipulação apresentaram valores médios para as concentrações plasmáticas de progesterona inferiores quando comparados aos valores observados nos grupo controle e manipulação + FM. Dessa forma, foi observado efeito positivo da aplicação do FM no momento da inovulação sobre a concentração plasmática de progesterona no restante do ciclo estral, porém, não foi observada diferença na taxa de prenhez dos animais tratados.

Palavras chave: receptora, embriões, bovinos, flunixin meglumine, progesterona.

Abstract

CARDOSO, R.C. **Effect of flunixin meglumine on the length of luteal phase and pregnancy rates of bovine embryo recipients.** Botucatu, 2009. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The aim of this study was to evaluate the effects of an administration of flunixin meglumine (FM) at the moment of bovine embryo transfer on pregnancy rates of recipients and also to determine the possible mechanisms by which FM improves the pregnancy rates of these animals. Therefore two experiments had been carried out in a way that in experiment 1 184 crossbreed females were transferred with an *in vitro* produced embryo and randomly divided into two experimental groups: control group (G1) and FM group (G2) in which recipients received one administration of 1.1 mg/Kg of FM at the moment of embryo transfer. In experiment 2, 22 nelore females were randomly divided into three groups: control (G1), manipulation (G2) in which animals were submitted to a reproductive tract manipulation (similar to an embryo transfer) at day 7 of the estrous cycle, and manipulation + FM group (G3) in which females were submitted to a reproductive tract manipulation and an administration of FM. To determine the length of luteal phase and evaluate the progesterone release profile of the corpus luteum, animals of the three groups were submitted to successive ultrasound examinations and blood sample collections during the rest of the estrous cycle. In experiment 1 no significant difference was observed on the pregnancy rates of animals of control group and FM group (40.2% and 44.6%, respectively). In experiment 2 no significant difference was observed on the length of the luteal phase of the estrous cycle between experimental groups, however animals of manipulation group presented lower average values of plasma progesterone concentrations when compared to average values observed on control group and manipulation + FM group. Thus a beneficial effect of the administration of FM at the time of embryo transfer over the plasma progesterone concentration was observed, however, no significant difference was observed on the pregnancy rates of treated animals.

Key words: bovine, embryo, recipients, flunixin meglumine, progesterone.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos o Brasil se consagrou como um dos maiores produtores e exportadores de carne bovina, sendo atualmente detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 170 milhões de cabeças, cuja produção representa cerca de 50% do produto interno bruto nacional agrícola (IBGE, 2006). Além disso, o Brasil exerce grande papel como exportador mundial de leite, sendo considerado o sexto maior produtor do mundo, e tendo grande potencial para crescimento na atividade leiteira durante os próximos anos. Contudo, a taxa de melhoramento genético dos rebanhos bovinos nacionais, tanto dos rebanhos de corte como leiteiros, ainda está muito abaixo das taxas observadas em países mais desenvolvidos como nos Estados Unidos e Canadá.

O melhoramento genético dos rebanhos bovinos é certamente o principal meio pelo qual se pode melhorar a eficiência produtiva e a lucratividade dos sistemas de criação nacionais. Dentre diversas ferramentas de melhoramento genético como a seleção de reprodutores, o descarte de animais e a inseminação artificial (IA) pode-se destacar a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIV) como as ferramentas que melhor possibilitam o aproveitamento do material genético proveniente de fêmeas bovinas. Atualmente o Brasil apresenta participação expressiva na atividade mundial de TE, com mais de 230.000 embriões bovinos transferidos durante o ano de 2006, sendo classificado como o país que mais transferiu embriões produzidos *in vitro* no mesmo ano e, como o segundo país com maior número de embriões bovinos produzidos *in vivo* transferidos (IETS, 2006).

Apesar do grande avanço no número de embriões bovinos transferidos durante os últimos anos, o estabelecimento da prenhez em receptoras de embriões permanece com alta taxa de variação entre diferentes centrais de receptoras e também entre diferentes lotes de receptoras da mesma central de receptoras, sendo que, em grande parte desses casos a taxa de prenhez dessas receptoras está muito abaixo da taxa esperada. Essa grande variação nas taxas de prenhez observadas pode ser resultado de fatores embrionários,

maternos, ambientais ou mesmo de uma combinação entre eles (SREENAN & DISKIN, 1987).

Para que ocorra o estabelecimento da gestação é necessária a presença de um embrião bem desenvolvido no corno uterino ipsolateral ao ovário que apresenta um corpo lúteo (CL) funcional antes do momento do reconhecimento materno da gestação (ROBERTS et al., 1992). Na maioria das transferências de embriões são utilizadas receptoras entre o sexto e o nono dia após a detecção do cio. Geralmente a avaliação da presença, tamanho e qualidade do CL no ovário é realizada pela palpação retal e, em alguns casos, através do auxílio do exame ultrassonográfico. Em seguida, após a seleção das receptoras, ocorre a manipulação transretal da cérvix e do útero para auxiliar na penetração do inovulador até o lúmen do corno uterino ipsolateral ao CL. Por último, é feito o posicionamento do inovulador e a deposição do embrião no terço final do corno uterino da receptora. Embora seja uma técnica relativamente simples, em algumas receptoras a passagem do inovulador pelos anéis cervicais e seu posicionamento no terço final do corno uterino pode ser um processo difícil de ser executado, exigindo certa experiência do técnico responsável.

Foi identificado que essa manipulação do trato reprodutivo da receptora no momento da inovulação do embrião resulta em estimulação na liberação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) pelo endométrio uterino (FERGUSON, 1941; SCHALLENBERGER et al., 1989; WANN & RANDEL, 1990; SCENNA et al., 2005). Esse aumento na liberação de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio pode comprometer a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos pela ação prejudicial ao desenvolvimento embrionário afetando diretamente na qualidade do embrião ou mesmo através de comprometimento na função luteal dessas receptoras o que indiretamente, pode afetar no desenvolvimento do embrião (WILTBANK et al., 1989; SEALS et al., 1998; SCHRICK et al., 2003; HOCKETT et al., 2004).

Avaliando os efeitos negativos da liberação de $PGF_{2\alpha}$ no momento da transferência do embrião, pode-se presumir que estratégias que objetivem a

inibição específica de enzimas que participem da síntese de prostaglandina possam aumentar as taxas de prenhez de receptoras de embriões bovinos.

Portanto, nessa dissertação será revisado o processo de regressão do CL em fêmeas bovinas, os principais fatores que afetam o desenvolvimento embrionário inicial, os mecanismos envolvidos no processo de reconhecimento materno da gestação em bovinos e também algumas estratégias desenvolvidas com o objetivo de aumentar a taxa de prenhez em receptoras de embriões bovinos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência do flunixin meglumine (FM), um inibidor da síntese de prostaglandina, sobre a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro* e também de avaliar sua influência sobre as concentrações plasmáticas de progesterona (P_4) e sobre a duração da fase luteal em fêmeas bovinas.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ciclo estral de fêmeas bovinas

As fêmeas bovinas são animais poliétricos, não estacionais, que apresentam ciclos estrais com aproximadamente 21 dias de duração. Durante cada ciclo estral existe um longo período denominado período luteal, caracterizado pela secreção do hormônio esteróide P_4 pelo CL e um período mais curto denominado período folicular, caracterizado por baixas concentrações plasmáticas de P_4 e altas concentrações do hormônio estrógeno (E_2) secretado pelo folículo dominante. A emergência da onda folicular é determinada pela secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise. Os folículos ovarianos em cada onda de crescimento folicular passam pelas etapas de recrutamento, seleção, dominância e atresia, sendo que, o folículo dominante da última onda folicular do ciclo estral se torna folículo ovulatório e, assim, não sofre atresia. Durante a fase final de crescimento folicular, o folículo dominante depende do hormônio luteinizante (LH) para seu crescimento e posterior ovulação (ADAMS, 1999).

Após a ovulação, as células da teca e da granulosa do folículo ovulatório passam por alterações morfológicas e são responsáveis pela formação do tecido luteal que irá secretar P_4 . O tamanho do CL e a produção de P_4 aumentam até aproximadamente o meio da fase luteal quando atingem um platô (MCCRACKEN et al., 1999). A P_4 restringe a secreção de LH e FSH a pulsos de baixa frequência durante a fase luteal devido ao “feedback” negativo sobre a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo (NISWENDER et al., 2000). Se o ovócito liberado pelo folículo ovulatório não for fertilizado ou ocorrer qualquer falha no desenvolvimento inicial do embrião, haverá liberação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) pelo endométrio, entre os dias 15 e 18 do ciclo estral, que dará início ao processo de luteólise (AROSH et al., 2002). A ocitocina (OT) liberada pelo CL e pela hipófise exerce efeito estimulatório sobre a liberação de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio (MCCRACKEN et al., 1999).

Como resultado do processo de lise do CL, ocorre queda na concentração circulante de P_4 , removendo assim o “feedback” negativo sobre a liberação de GnRH, aumentando a frequência e a amplitude de liberação de LH pela hipófise, estimulando o crescimento de folículo dominante, que irá produzir mais E_2 estimulando positivamente o hipotálamo a secretar mais GnRH, que é seguido por pico de LH que induz a ovulação e o início de um novo ciclo estral (NISWENDER et al., 2000; THATCHER et al., 2001).

2.1.1. Luteólise e a ação das prostaglandinas

Durante o ciclo estral das fêmeas bovinas, o CL sofre regressão morfológica e funcional aproximadamente entre 16 a 20 dias após a ovulação. O processo de lise do CL é caracterizado pelo cessar da produção de P_4 e fragmentação dos componentes celulares, incluindo a redução do suporte vascular, proliferação do tecido conjuntivo, desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteais (MILVAE et al., 1996). A luteólise funcional é caracterizada pelo rápido declínio de níveis de P_4 dentro das primeiras 8 a 12 horas após a secreção de $PGF_{2\alpha}$. A luteólise estrutural é determinada como a diminuição de tamanho e perda de peso do CL em consequência da apoptose das células luteínicas (NEUVIANS et al., 2003).

A $PGF_{2\alpha}$ é a substância responsável pela lise do CL, sendo secretada de forma pulsátil durante o período da luteólise pelo endométrio bovino (MCCRACKEN et al., 1973). A $PGF_{2\alpha}$ secretada pelo endométrio atinge o CL através de um sistema circulatório local de contra-corrente (HIXON & HANSEL, 1974).

A OT é um dos hormônios que regulam a síntese de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio bovino. Esse hormônio é secretado pela hipófise posterior e também pelo CL. Próximo ao final da fase luteal ocorre um processo de dessensibilização (“down regulation”) dos receptores de P_4 na hipófise e endométrio, permitindo o retorno da ação do E_2 , que estimula a hipófise a secretar pulsos de baixa concentração e alta frequência de OT (MCCRACKEN et al., 1999). Posteriormente a OT age na regulação da síntese de $PGF_{2\alpha}$ através de sua ligação aos receptores de OT (OTR) no endométrio estimulando

a secreção de pequenas quantidades de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo útero, as quais ainda não são suficientes para causar luteólise (DURAS et al., 2005). No entanto, essa liberação de pequenas quantidades de $\text{PGF}_{2\alpha}$ induz a liberação da OT que foi estocada pelo CL que, conseqüentemente, irá estimular maior liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio formando assim um ciclo de retroalimentação positivo entre a $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a OT, que resultará na liberação de altas quantidades de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que irá desencadear o processo de luteólise (MCCRACKEN et al., 1999). Além disso, em estudo mais recente foi identificado que as próprias células luteais têm capacidade de secretar $\text{PGF}_{2\alpha}$, sendo que em fêmeas bovinas ocorre um “feedback” positivo entre pequenas quantidades de $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberadas pelo endométrio e a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo tecido luteal, provavelmente devido a ativação da enzima COX-2 nas células luteais grandes (Diaz et al., 2002).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberada pelo endométrio e pelo CL se liga a receptores específicos na membrana das células luteais esteroidogênicas ativando os mensageiros secundários: trifosfato inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG) (AROSH et al., 2004). DAG e o IP_3 estimulam a ativação da proteína quinase C (PKC) e a liberação de cálcio intracelular, respectivamente (NISWENDER et al., 2000). O mecanismo celular de como a PKC e o Ca^{++} agem na lise do CL em bovinos ainda não foi completamente elucidado, porém, algumas hipóteses sugerem uma diminuição no fluxo sanguíneo para o CL e inibição da proteína regulatória aguda da esteroidogênese (StAR; MCCRACKEN et al., 1999). Essa inibição da StAR acarreta em diminuição na captação e transporte de colesterol para a membrana mitocondrial interna onde ele é transformado em pregnolona. Portanto, provavelmente o transporte do colesterol é o ponto principal na inibição exercida pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre a síntese de P_4 pelo CL (NISWENDER et al., 2000).

Mudanças morfológicas no CL durante a luteólise não são observadas até 24 a 36 horas após a exposição à $\text{PGF}_{2\alpha}$ (NISWENDER et al., 2000). A luteólise estrutural na vaca é provavelmente mediada através de uma variedade de fatores como: apoptose, rompimento das junções “gap”, células

imune, metaloproteinases, proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1) e fator- α de necrose tumoral (MCCRACKEN et al., 1999).

No processo de luteólise a P_4 e o E_2 exercem papel importante na regulação dos receptores de OT no endométrio. A P_4 regula a luteólise de diferentes formas. A exposição à P_4 promove o acúmulo nas células endometriais de ácido araquidônico e ciclooxygenase (COX), elementos essenciais à síntese de $PGF_{2\alpha}$. Por outro lado, até a segunda metade do ciclo estral, a P_4 também exerce efeito supressivo à secreção de $PGF_{2\alpha}$ (SILVIA et al., 1991). Esse efeito supressivo é devido à ação inibitória da P_4 na expressão do gene dos OTR (JENNER et al., 1991; MANN & LAMMING, 1994) e bloqueadora ao E_2 (MCCRACKEN et al., 1999). Após aproximadamente 12 dias de exposição contínua, o bloqueio da P_4 nos OTR se reduz (LAFRANCE & GOFF, 1988), possivelmente devido a redução nas concentrações dos receptores de P_4 (PR) causada pela própria P_4 ("down regulation") e, a partir desse momento o endométrio passa a responder à OT secretando $PGF_{2\alpha}$.

O E_2 exerce efeito na regulação da síntese de $PGF_{2\alpha}$ pelo útero através de uma elevação nas concentrações de OTR endometriais após a metade da fase luteal (HIXON & FLINT, 1987). Esse efeito do E_2 é dependente da P_4 , pois ele só é observado após a prévia exposição ("priming") do endométrio à P_4 (LAFRANCE & GOFF, 1988; LAMMING & MANN, 1995). Outro importante fator na regulação dos OTR pelo E_2 é a sua concentração plasmática. Assim, após a metade da fase luteal, as concentrações dos receptores de E_2 (ER) aumentam, possivelmente devido ao "up regulation" pelo E_2 de seus próprios receptores endometriais (XIAO & GOFF, 1999), elevando conseqüentemente as concentrações de OTR. Já nos momentos que antecedem a ovulação, altos níveis de E_2 secretados pelo folículo ovulatório resultam em diminuição nas concentrações dos OTR ("down regulation"), acarretando em ausência de resposta do endométrio à OT nos primeiros dias do ciclo estral (LAMMING & MANN 1995).

2.2. Desenvolvimento embrionário inicial e estabelecimento da prenhez

A primeira clivagem sofrida pelo zigoto bovino ocorre cerca de 20 horas depois do momento da ovulação (VAN SOOM & KRUIF, 1998). O embrião completa as próximas divisões mitóticas enquanto é transportado pelo oviduto. Durante esse transporte, glicoproteínas do oviduto se ligam à zona pelúcida e também ocupam o espaço perivitelínico, sendo que essas glicoproteínas exercem funções importantes no embrião, tais como: proteção do embrião contra proteases e facilitar o transporte através do oviduto (DUBY et al., 1997). Após o transporte pelo oviduto, o embrião bovino entra no útero no estágio de 8 a 16 células, no período entre o 4º e 6º dia de gestação (HACKETT et al., 1993). O desenvolvimento embrionário subsequente ocorre dentro do útero, onde três processos morfogênicos importantes ocorrem: compactação, cavitação e eclosão do blastocisto (BL).

Na produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos os oócitos podem ser obtidos através da aspiração de folículos ovarianos guiada por ultrassom de um animal com alto potencial genético ou através da aspiração folicular de ovários adquiridos de matadouro. Esses oócitos derivados de folículos antrais geralmente com diâmetro de 2 a 6 mm precisam ainda maturar, onde irão sofrer mudanças nucleares e citoplasmáticas e reiniciarão a primeira divisão meiótica devido a estímulos de hormônios esteróides (E2) e gonadotrofinas (LH e FSH). Após a maturação, a próxima etapa da PIV é a colocação desses oócitos maturados em gotas com meio de fertilização ideal para capacitação espermática e, posteriormente, colocação dos espermatozóides nas gotas com aproximadamente 1 a 2 milhões de espermatozóides por gota. Os possíveis zigotos são transferidos então para gotas com meio de cultivo embrionário e permanecem durante 7 dias quando então são envasados em palhetas e são transferidos em vacas receptoras de embriões da mesma maneira que embriões produzidos *in vivo* (BRACKETT et al., 1982). Após o processo de eclosão do blastocito, tanto o embrião produzido *in vivo* como o embrião de PIV, se alongam formando uma fita que se distribui ao longo do lúmen uterino.

Uma vez fora da zona pelúcida, o BL pode fazer contato celular direto com o epitélio útero (HACKETT et al., 1993).

Entre o 15º e o 17º dia de gestação, o concepto produz proteínas ácidas de baixo peso molecular, entre elas, a glicoproteína interferon-tau (IFN- τ). Essa glicoproteína de origem trofoblástica atua como um hormônio parácrino, transmitido de célula a célula, diretamente no endométrio influenciando a síntese de proteínas e inibindo a produção de prostaglandinas. Mann e Lamming (2001) observaram importante correlação entre o tamanho do concepto no período crítico do reconhecimento materno e a quantidade de IFN- τ encontrada no lúmen uterino. Concluíram também que conceptos com menor desenvolvimento estão diretamente associados a baixas quantidades de IFN- τ intra-uterino e, portanto, associados a falhas no bloqueio da liberação de PGF_{2 α} pelo endométrio resultando em altos índices de perda embrionária.

Portanto, segundo os trabalhos supracitados uma boa taxa de desenvolvimento embrionário inicial é extremamente importante para a obtenção de um concepto com grande alongamento no período crítico do reconhecimento materno. O concepto que apresentar maior alongamento durante esse período conseqüentemente apresentará maior área de contato com o lúmen uterino e também apresentará maior capacidade de secretar grandes quantidades de IFN- τ , tendo assim, maior capacidade de bloquear a lise do CL. A principal variável relacionada à taxa de crescimento embrionário inicial é a secreção de P₄ pelo CL. Não só a quantidade de P₄, mas também o seu perfil de liberação exercem grande influência sobre a taxa de desenvolvimento do embrião.

2.2.1. Progesterona pós-fecundação x taxa de sobrevivência embrionária

Diversos estudos relataram uma grande associação entre a concentração plasmática de P₄ com o desenvolvimento embrionário inicial em fêmeas bovinas (BULMAN & LAMMING, 1978; LAMMING et al., 1989; MANN et al., 1999; STRONGE et al., 2005; DISKIN et al., 2006). Starbuck et al. (2001) demonstraram que em um estudo monitorando as concentrações de P₄ no leite

de mais de 1400 vacas holandesas no 5º dia pós-ovulação, foi observada alta correlação entre vacas que apresentaram baixas concentrações de P_4 no dia 5 com menores índices de prenhez. Neste estudo vacas com adequados níveis de P_4 no leite (> 3 ng/ml) tiveram taxas de prenhez em torno de 50-55% enquanto que vacas com baixas concentrações de P_4 no leite (< 1 ng/ml) apresentaram taxas de prenhez inferiores a 10%.

Além disso, também foi identificada correlação entre a quantidade de P_4 com a quantidade de interferon-tau produzido pelo concepto (MANN et al., 1999). Nesse estudo as vacas foram inseminadas e posteriormente abatidas no 16º dia após inseminação para coletar os conceptos e avaliar a produção de interferon- τ . Foi observado que as vacas que apresentaram altas concentrações de P_4 entre a inseminação e o 16º dia apresentavam conceptos significativamente maiores, e também foi observado que a quantidade de interferon- τ produzido por esses conceptos também foi maior.

Atualmente parece haver consenso em relação aos efeitos prejudiciais da baixa concentração plasmática de P_4 sobre o desenvolvimento embrionário inicial e, conseqüentemente, sobre o reconhecimento materno. Porém a identificação dos fatores que determinam uma baixa concentração plasmática de P_4 em fêmeas bovinas após a ovulação é um assunto menos esclarecido. Existem algumas evidências que sugerem que o fator nutricional é o principal responsável pela regulação dos níveis de P_4 em vacas. Foi observado que vacas leiteiras de alta produção apresentam alto consumo de matéria seca, e devido a isso, maior fluxo sanguíneo através do fígado foi observado, aumentando assim a metabolização dos hormônios esteróides e, conseqüentemente, diminuindo as concentrações plasmáticas de P_4 (SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003). Uma estratégia que se mostrou eficiente para aumentar as concentrações plasmáticas de P_4 em fêmeas bovinas foi a suplementação nutricional com ácidos graxos, através da adição de gordura protegida a dieta. Hawkins et al. (1995) suplementaram novilhas de corte com ácidos graxos de cadeia longa e observaram aumento significativo nas concentrações plasmáticas de P_4 , provavelmente devido a redução na taxa de metabolização hepática dos hormônios esteróides. Carroll

et al. (1990) realizaram experimento similar com vacas leiteiras e também observaram aumento na concentração de P_4 nesses animais.

Após diversos experimentos realizados para identificar os fatores que interferem na concentração plasmática de P_4 , Mann (2001) concluiu que esse acontecimento é um fenômeno multifatorial. Porém ele observou que há correlação entre baixas concentrações de P_4 no 5º dia de gestação e escore de condição corporal reduzido além de baixas concentrações plasmáticas de leptina em vacas leiteiras. Concluindo, portanto, que o baixo status energético pode ser considerado uma causa parcial da baixa secreção de P_4 no período pós-ovulatório.

2.2.2. Reconhecimento materno da gestação

A expressão “reconhecimento materno da gestação” foi definida por Roger Short, em 1969, como o processo pelo qual o concepto sinaliza sua presença à unidade materna, prolongando a vida do CL e mantendo a gestação devido a um diálogo bioquímico que se estabelece entre o concepto e o tecido endometrial nas diversas espécies mamíferas (SPENCER & BAZER, 2004, revisado por MARQUES et al., 2007).

Em experimentos realizados nos anos 60 (MOOR & ROWSON, 1964; 1966) e no final dos anos 70 (MARTAL et al., 1979), evidenciou-se que a manutenção do CL em ovinos ocorre pela atuação de fatores produzidos pelo concepto no endométrio materno. Outros estudos na década de 80 demonstraram que a infusão de proteínas secretadas por conceptos no útero de vacas não gestantes retardou a luteólise nesses animais (KNICKERBOCKER et al., 1986; HELMER et al., 1989). Tais fatores antiluteolíticos foram denominados inicialmente de trofoblastina (MARTAL et al., 1979) ou proteína trofoblástica-1 (GODKIN et al., 1984; BARTOL et al., 1985). Posteriormente, com a purificação, a clonagem e o sequenciamento desses fatores, foram verificadas estruturas semelhantes com um grupo de glicoproteínas conhecidas como interferons (IFN) tipo I (IMAKAWA et al., 1987). Ainda observou-se que tais interferons produzidos pelos conceptos apresentavam atividades peculiares aos IFN tipo I, como atividade antiviral,

antiproliferativa e imunomodulatória. Dessa forma, os interferons de origem trofoblástica foram nomeados de interferon-tau (IFN- τ) (ROBERTS et al., 1992). Posteriormente diversos autores observaram que a administração de IFN recombinante (rIFN- τ) prolonga a vida do CL em ovinos, caprinos e bovinos (OTT et al., 1993; L'HARIDON et al., 1995; MEYER et al., 1995).

2.2.3. Estrutura e mecanismos de ação do IFN- τ

Os interferons são citocinas sintetizadas e secretadas por células somáticas das espécies mamíferas. A designação coletiva de interferons surgiu com estudos de Stewart (1979) que assim os nomeou por sua peculiar capacidade de interferir na biologia das células mamíferas induzindo um estado antiviral (revisado por MARQUES et al., 2007).

Na espécie bovina, foram identificados múltiplos subtipos de IFN- α , IFN- β , IFN- ω , e ainda se observou a expressão de IFN- τ responsável pelo reconhecimento materno nessa espécie (ROBERTS et al., 1992). Genes que codificam o IFN- τ foram identificados somente em ruminantes (LEAMAN & ROBERTS, 1994). O IFN- τ apresenta atividades inerentes aos interferons, como potente atividade antiviral, inibição na proliferação celular e efeitos regulatórios nas células do sistema imune semelhantes ao IFN- α (MARQUES et al., 2007). Sua molécula é composta por 172 aminoácidos e assim como todos IFN tipo I, o IFN- τ se liga às subunidades de receptor para interferon 1 e 2 (LI & ROBERTS, 1994).

De maneira geral, as respostas biológicas aos interferons são iniciadas pela sua ligação aos receptores de superfície celular específicos e pela subsequente ativação de vias de transdução de sinal citoplasmático, ativando a expressão de genes regulados por IFN (SEN E LENGYEL, 1992). A ligação do IFN ao seu receptor desencadeia fosforilações intracelulares que ativam mensageiros secundários conhecidos como Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição os quais se ligam aos elementos de resposta estimulados por interferon nos genes que os possuem (BINELLI et al., 2001).

O mecanismo geral pelo qual o IFN- τ inibe a regressão do CL dá-se pela supressão da liberação pulsátil de PGF_{2 α} endometrial. Sabe-se que o IFN- τ

produzido pelo embrião atua de maneira parácrina no tecido materno suprimindo a transcrição de genes para OTR e ER no endométrio (LAMMING et al., 1995; revisado por MARQUES et al., 2007). Especula-se que, por meio da inibição de ER, o IFN- τ iniba a regulação positiva nos OTR. Com tal mudança na célula endometrial, a OT de origem hipofisária ou luteal não terá possibilidade de promover a liberação de pulsos de PGF_{2 α} essenciais à luteólise. Arnold et al. (2000) observaram o efeito do IFN- τ na inibição da síntese de PGF_{2 α} em explantes endometriais de fêmeas bovinas e Binelli et al. (2000) observaram o mesmo efeito em células endometriais epiteliais da mesma espécie. Robinson et al. (2001) estudaram a expressão gênica de receptores para OT e E₂ no endométrio bovino durante o ciclo estral e durante o período inicial de gestação por meio da técnica de hibridização *in situ* e imunohistoquímica. Nesse estudo, não foi observada a expressão de RNA mensageiro (RNAm) para OTR entre os dias 12 e 18 após o estro no endométrio de fêmeas bovinas gestantes. Já no endométrio de fêmeas cíclicas foi observada expressão gênica de OTR durante esse mesmo período. Dados similares foram obtidos por Martin et al. (2006) em vacas Nelore cíclicas.

Quanto aos ER, Robinson et al. (2001) observaram que a presença de um conceito não surtiu efeito na expressão de RNAm para ER no epitélio luminal uterino, nas glândulas superficiais ou no estroma subepitelial entre os dias 12 e 14 pós-estro. Contudo, entre os dias 16 e 18 pós-fecundação, observou-se aumento nas concentrações de RNAm para ER no epitélio luminal de fêmeas cíclicas, enquanto em fêmeas gestantes notou-se declínio, tornando-se indetectável no 18º dia. Esses resultados indicam que a inibição de OTR promovida pelo IFN- τ não está relacionada temporalmente à expressão de ER nas fêmeas bovinas, concluindo que provavelmente o IFN- τ iniba diretamente a expressão de OTR.

2.3. Falhas no estabelecimento da prenhez e mortalidade embrionária

A mortalidade embrionária é considerada a principal causa responsável pelo aumento no intervalo de partos e um dos principais fatores que comprometem a eficiência reprodutiva dos rebanhos bovinos.

Diversos estudos têm relatado que a taxa de fecundação após a IA de estruturas colhidas no oviduto e no útero de vacas é alta, independente de idade ou raça (DISKIN & SREENAN, 1980; HAWK & TANABE, 1986; RYAN et al., 1993; SAACKE et al., 1998; DUNNE et al., 2000; SARTORI et al., 2002; CERRI et al., 2004; SARTORI et al., 2004b). Porém as taxas de parição normalmente observadas são muito inferiores quando comparadas as taxas de fecundação relatadas. Trabalhos demonstraram que a maioria das perdas embrionárias ocorre durante o período embrionário de gestação (< 42 dias) tanto em bovinos de corte como de leite (THATCHER et al., 1994; VANROOSE et al., 2000). A mortalidade ocorrida até o 24º dia de prenhez se classifica como mortalidade embrionária precoce e se ocorrida entre o 24º e o 42º dia de gestação é denominada mortalidade embrionária tardia (Committee on Bovine Reproduction Nomenclature, 1972).

Kunz et al. (2002) relataram taxas de mortalidade entre 20 e 40% até o 22º dia de prenhez em bovinos e Peters (1996) observou que cerca de 25% de mortalidade embrionária durante mesmo período em vacas leiteiras. Diskin e Sreenan (1980) verificaram que a mortalidade embrionária atinge aproximadamente 30% entre os dias 8 e 16 de prenhez. Adicionalmente, Dunne et al. (2000) verificaram que a maioria das perdas pré-natais ao longo de toda prenhez, ocorreu antes do 14º dia de gestação. Esses achados coincidem cronologicamente com os eventos fisiológicos relacionados ao estabelecimento da prenhez, como a sinalização pelo embrião de sua presença no útero e o bloqueio da luteólise. Qualquer fato que induza liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode causar luteólise e a perda da gestação. Doenças infecciosas podem causar efeitos sistêmicos que induzem liberação de prostaglandinas, que em alguns casos podem acarretar em luteólise e, conseqüentemente, em perdas gestacionais (VANROOSE et al., 2000).

A manipulação do trato reprodutivo de fêmeas bovinas no momento da inovulação também pode resultar em estimulação na liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio (FERGUSON, 1941; SCHALLENBERGER et al., 1989; WANN & RANDEL, 1990; SCENNA et al., 2005). Esse acontecimento é conhecido como reflexo de Ferguson.

Wann e Randel (1990) observaram que a manipulação uterina por 2 minutos em vacas multíparas aos 35 dias pós-parto resultou em aumento na 13,14 diidro-15 ceto prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGFM), metabólito produzido a partir da metabolização da $PGF_{2\alpha}$ pelos pulmões. Scenna et al. (2005) avaliaram o efeito da manipulação do trato reprodutivo de receptoras de embriões bovinos sobre a liberação direta de $PGF_{2\alpha}$ através da canulação da veia safena e coletas de sangue sucessivas. Os autores observaram que após a manipulação do trato reprodutivo das receptoras de embriões ocorreu liberação pulsátil de $PGF_{2\alpha}$, sendo que, no período de 10 a 60 minutos após a manipulação as concentrações plasmáticas da $PGF_{2\alpha}$ atingiram valores de 241,2 pg/ml nos animais que apresentaram escore 1 de dificuldade de inovulação (manipulação mínima), sendo que no momento anterior a manipulação esses valores eram inferiores a 235,0 pg/ml. No período de 130 a 230 minutos após a manipulação as concentrações de $PGF_{2\alpha}$ atingiram valores de 249,7 pg/ml. Já no período de 70 a 120 minutos após a manipulação as concentrações de $PGF_{2\alpha}$ não diferiram estatisticamente das concentrações observadas antes da manipulação, que foram em torno de 230,00 pg/ml. Esses dados caracterizam o padrão pulsátil da liberação de $PGF_{2\alpha}$ após a manipulação do trato reprodutivo, padrão similar ao observado na liberação de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio no momento da luteólise em fêmeas bovinas.

Diversos estudos relataram que embriões têm seu desenvolvimento inicial prejudicado pela exposição a $PGF_{2\alpha}$. O tratamento *in vitro* de embriões de rato no estágio de oito células com $PGF_{2\alpha}$ inibiu o desenvolvimento desses embriões até o estágio de mórula, e quando o mesmo procedimento foi realizado com embriões de coelhos de oito células esses não atingiram o estágio de blastocisto expandido (BX) (MAURER & BEIER, 1976; BREUEL et al., 1993).

Seals et al. (1998) conduziram um experimento para determinar os efeitos da $PGF_{2\alpha}$ no intervalo entre o 5º e 18º dia após o estro sobre a taxa de prenhez de vacas de corte suplementadas com acetato de melengestrol (MGA). 91 vacas de corte foram divididas para receberem solução salina (controle), 15 mg de $PGF_{2\alpha}$, intramuscular, a cada 8 horas ou 15 mg de $PGF_{2\alpha}$ + remoção

mecânica do CL, sendo que todos animais foram suplementados com 4 mg de MGA/cabeça/dia. Os autores observaram que as concentrações de PGFM foram significativamente superiores nos animais dos grupos $\text{PGF}_{2\alpha}$ em relação aos animais do grupo $\text{PGF}_{2\alpha}$ + remoção mecânica do CL, e ambos os grupos apresentaram concentrações de PGFM superiores aos animais do grupo controle. Os autores observaram também que a taxa de prenhez dos animais no grupo $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi 48% menor ($p < 0,05$) que a taxa observada no grupo controle, porém já os animais do grupo $\text{PGF}_{2\alpha}$ + remoção do CL apresentaram taxa de prenhez similar à taxa dos animais controle. Assim os autores concluíram que para que haja efeito deletério da $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre a sobrevivência embrionária inicial é necessária a presença do CL nas fêmeas bovinas, e sugerem que esse efeito deletério ocorre provavelmente devido ao fato da $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimular liberação de OT pelo CL em regressão, assim estimulando maior liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio. Produtos liberados pelo CL em regressão também podem estar relacionados com o efeito embriotóxico exercido pela $\text{PGF}_{2\alpha}$, sendo que os autores destacam os inibidores teciduais de metaloproteinases-1 e -2, fator de necrose tumoral- α (TNF α), interleucinas, interferon- γ e OT (SEALS et al., 1998). Além disso, em estudo mais recente foi identificado que as próprias células luteais têm capacidade de secretar $\text{PGF}_{2\alpha}$, sendo que em fêmeas bovinas ocorre um “feedback” positivo entre pequenas quantidades de $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberadas pelo endométrio e a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo tecido luteal, provavelmente devido a ativação da enzima COX-2 nas células luteais grandes (Diaz et al., 2002).

Hockett et al. (2004) em experimento similar avaliaram o efeito da administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no período entre o 5º e o 8º dia após a IA sobre o desenvolvimento embrionário inicial em vacas de corte que foram suplementadas com MGA (4 mg/cabeça/dia). Os autores observaram que as vacas tratadas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ produziram 64% dos embriões no estágio de mórula no 8º dia após o estro, enquanto no grupo controle 80% dos embriões recuperados no mesmo momento já haviam se desenvolvido para o estágio de BX. Além disso, foi observada menor porcentagem de embriões classificados como grau 1 de qualidade (alta qualidade) em vacas tratadas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ quando comparados aos embriões recuperados das vacas controle (29%

versus 60%, respectivamente). Portanto, os autores concluíram que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ interferiu no desenvolvimento embrionário a partir do estágio de mórula e sugeriram que o possível mecanismo para essa interferência seja a partir de um efeito prejudicial da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no processo de compactação embrionária.

Wiltbank et al. (1989) demonstraram que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumentou o fluxo intracelular do cálcio e esse aumento da quantidade de cálcio dentro da célula pode interferir com o processo de compactação, assim prevenindo a formação da blastocle. Schrick et al. (2003) avaliaram o efeito da adição de diferentes concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 no meio de cultivo de embriões bovinos de 16 a 32 células produzidos *in vitro*. Os autores observaram que os embriões cultivados em meio acrescido de $\text{PGF}_{2\alpha}$ tiveram menor porcentagem de desenvolvimento até o estágio de BL, porém não foi observada diferença na taxa de formação de BL nos embriões que foram cultivados com meio acrescido de PGE_2 em relação aos embriões controle.

Portanto, os resultados dos trabalhos citados acima sugerem que o principal período do desenvolvimento embrionário onde o embrião é mais susceptível aos efeitos negativos da presença de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é o período de transição do estágio de mórula para o estágio de BL/BX (dias 5 a 8 do desenvolvimento embrionário). O exato mecanismo pelo qual a $\text{PGF}_{2\alpha}$ interfere no desenvolvimento embrionário inicial ainda não foi totalmente elucidado, porém diversos estudos sugerem que essa interferência ocorre provavelmente devido ao fato da $\text{PGF}_{2\alpha}$ prejudicar o processo de compactação e formação da blastocle em embriões bovinos (WILTBANK et al., 1989; SCHRICK et al., 2003; HOCKETT et al., 2004). Além disso, a presença do CL no momento da liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode potencializar esse efeito deletério sobre o desenvolvimento do embrião, seja através da liberação de OT pelo CL estimulando maior liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio, seja pelo efeito embriotóxico de outros produtos liberados no processo de regressão do CL (SEALS et al., 1998).

2.4. Estratégias para diminuir a mortalidade embrionária precoce em receptoras de embriões

A partir da compreensão dos fatores que afetam o desenvolvimento embrionário inicial e dos mecanismos envolvidos no reconhecimento materno da gestação pode-se propor algumas estratégias para aumentar a fertilidade em receptoras de embriões bovinos. De forma geral, essas estratégias podem ser divididas da seguinte forma (baseado em BINELLI et al., 2001):

2.4.1. Aumentar o tamanho do folículo pré-ovulatório para gerar um CL maior

Foi observado que folículos pré-ovulatórios maiores geram CLs maiores, que secretam maiores quantidades de P_4 , melhorando assim o desenvolvimento embrionário inicial e conseqüentemente aumentando a taxa de prenhez em fêmeas bovinas (VASCONCELOS et al., 2001).

O mecanismo mais utilizado para a obtenção de um folículo pré-ovulatório maior é promovendo seu crescimento sob baixas concentrações de P_4 e seus análogos, o que causa a persistência do folículo dominante. A taxa de concepção após a IA de animais com folículo dominante persistente geralmente é baixa, devido a alterações no ambiente do oviduto ou devido à ativação prematura do oócito (MIHM et al., 1994). Porém, isso não ocorre no caso das receptoras de embriões, que não terão seus oócitos oriundos de folículos persistentes fertilizados. Assim, esses animais apresentariam CLs maiores, com maiores concentrações plasmáticas de P_4 e, portanto, embriões com maior desenvolvimento.

Para testar essa hipótese, Moura et al. (2001) trataram novilhas cruzadas com um implante de norgestomet por 9 dias. No dia 0, os implantes foram administrados e as receptoras foram divididas para receber 5mg de valerato de estradiol e 3mg de norgestomet intramuscular (grupo 1; n= 40) ou 400 µg de delprostenato (análogo de $PGF_{2\alpha}$, grupo 2; n=42). No dia 9 todas novilhas receberam injeção de delprostenato e tiveram a ovulação induzida através de uma aplicação de benzoato de estradiol (1mg) no dia 10. Era

esperado que o tratamento administrado as novilhas do grupo 1 induzisse a ovulação de um folículo menor, enquanto que o tratamento administrado as novilhas do grupo 2 deveria induzir o crescimento e a ovulação de um folículo maior, já pré existente. Nos resultados do experimento foi observado que os animais do grupo 2 realmente apresentaram um folículo dominante de maior tamanho, o que resultou em CLs de maior tamanho e concentrações plasmáticas de P_4 maiores. Porém, a taxa de prenhez entre os grupos não foi diferente (25% vs. 30,9%, grupo 1 e 2, respectivamente). O fato de o grupo 2 ter apresentado maiores concentrações de P_4 no 17º dia corrobora a hipótese de folículos persistentes gerarem maiores CLs, e esses por sua vez secretarem maiores quantidades de P_4 . Provavelmente se um número maior de animais tivesse sido utilizado nesse experimento seria observada diferença estatística entre as taxas de prenhez dos grupos 1 e 2. Portanto, os autores sugerem que novos estudos são necessários para averiguar o efeito da indução de folículos dominantes persistentes sobre a taxa de prenhez em receptoras de embriões bovinos.

2.4.2. Aumentar a taxa de crescimento do CL

A ótima diferenciação e a taxa de crescimento do CL estão relacionadas com a duração e a amplitude do pico ovulatório de LH (AMBROSE, et al., 1998). Picos de LH induzidos, por exemplo, através de injeções de GnRH em protocolos Ovsynch, são freqüentemente de duração menor do que picos não induzidos, o que poderia limitar o ótimo crescimento do CL. Ambrose et al. (1998) induziram a ovulação em vacas leiteiras com um implante de Deslorelina (agonista de GnRH), como parte de um programa de Ovsynch. Os autores observaram que as vacas que receberam o implante apresentaram melhor taxa de crescimento do CL, e maiores concentrações plasmáticas de P_4 comparadas ao grupo controle. Os autores concluíram que uma liberação prolongada de GnRH fornecida pelo implante de Deslorelina induziu um pico de LH de duração maior e, portanto, estimulou de forma mais efetiva a diferenciação e o crescimento do CL, aumentando assim sua funcionalidade.

Marques et al. (2002) compararam a influência de diferentes indutores de ovulação como LH, análogos de GnRH, e hCG sobre o tamanho do CL formado e sobre a concentração plasmática de P_4 durante a fase luteal em novilhas cruzadas. Foi observado que os CLs induzidos pela aplicação de hCG apresentavam diâmetro maior quando comparados aos CLs induzidos por outros indutores de ovulação. Além disso, também foi observado que as concentrações plasmáticas de P_4 eram maiores nessas novilhas. Os autores concluíram que devido ao fato da hCG apresentar meia-vida maior que os outros indutores testados, ela apresenta persistência maior na circulação e portanto, apresenta efeito luteotrófico maior, estimulando o crescimento do CL e, conseqüentemente, maior secreção de P_4 .

2.4.3. Aumentar o número de CLs

Outra possível estratégia para aumentar as concentrações plasmáticas de P_4 de fêmeas bovinas após a ovulação é através da utilização de estratégias farmacológicas para induzir a formação de CLs acessórios através da ovulação do folículo dominante da primeira onda do ciclo estral. Essa formação pode ser alcançada através da utilização de GnRH (HOWARD et al., 2006; MACHADO et al., 2008), LH (KASTELIC & AMBROSE, 2004) ou hCG (SANTOS et al., 2001; STEVENSON et al., 2007)

Machado (2005) demonstrou que uma combinação farmacológica (GnRH ao início e hCG ao final da fase luteal) foi capaz de aumentar ($p < 0,05$) a concentração plasmática de P_4 , bem como retardar a luteólise e prolongar a fase luteínica de vacas Red Angus. Marques (2002) comparou a eficiência de diferentes indutores de ovulação (LH, análogo de GnRH ou hCG) sobre as concentrações plasmáticas de P_4 e sobre os parâmetros do CL de novilhas cruzadas. O autor observou que todos fármacos utilizados foram eficientes em induzir a formação de CLs acessórios, e que além disso, devido a maior meia vida do hCG, as novilhas tratadas com este indutor no D7 do ciclo estral apresentaram diâmetros do CL principal e dos CLs acessórios maiores quando comparados aos animais que foram tratados com outros indutores de ovulação. Além disso novilhas tratadas com indutores de ovulação no D7 do ciclo estral

apresentaram concentrações plasmáticas de progesterona maiores quando comparadas as novilhas do grupo controle.

2.4.4. Aumentar o estímulo anti-luteolítico pelo concepto

Durante o período crítico, o concepto bovino apresenta uma fase de crescimento rápido em seu tamanho. Porém, Thatcher e Hansen (1992) encontraram conceptos variando entre 15 a 250 mm no 17º dia de gestação em vacas de leite. Concepts menores não são capazes de sintetizar IFN- τ suficiente para bloquear a luteólise. Portanto, a gestação é interrompida uma vez que o concepto não é capaz de enviar sinais antiluteolíticos para o endométrio materno. Um modo possível de prevenir essas perdas embrionárias seria através da administração de IFN- τ para as vacas durante o período crítico. Meyer et al. (1995) realizaram infusões intra-uterinas de IFN- τ recombinante (rIFN- τ) duas vezes ao dia em vacas holandesas, entre os dias 14 e 24 do ciclo estral. O tratamento com rIFN- τ aumentou o tempo de vida do CL e, conseqüentemente, a duração do ciclo estral das vacas que receberam o tratamento em comparação com as vacas que receberam infusão intra-uterina de proteína controle (albumina do soro bovino). Infelizmente, um esquema mais prático para a utilização do rIFN- τ em fêmeas bovinas, com uma via de aplicação mais acessível, ainda não foi desenvolvido.

2.4.5. Diminuir a resposta luteolítica pela unidade materna

Avaliando os efeitos negativos da liberação de PGF_{2 α} no momento da inovulação, pode-se presumir que estratégias que objetivem a inibição específica de enzimas que participem da síntese de prostaglandina devem aumentar as taxas de prenhez nas receptoras de embriões.

O local responsável pela síntese de prostaglandina no útero é o endométrio. As prostaglandinas pertencem a classe de compostos conhecidos como eicosanóides, que são derivados de ácidos graxos poliinsaturados com 18, 20 ou 22 cadeias de carbono. O ácido araquidônico, um ácido graxo essencial, é o precursor das prostaglandinas associadas à reprodução, incluindo a PGF_{2 α} e a PGE₂. A biosíntese das prostaglandinas ocorre em 3

etapas: hidrólise do ácido araquidônico por fosfolipases; oxidação e redução do ácido araquidônico para prostaglandina H_2 pela ação da enzima prostaglandina endoperóxido sintase (COX-1 e COX-2); e por último a conversão da PGH_2 para produtos finais biologicamente ativos através de sintases específicas (AROSH et al., 2002).

O ácido araquidônico é armazenado em fosfolipídios de membrana (AROSH et al., 2004). No final do ciclo estral, ocorre o aumento na secreção de OT que se liga aos OTR no epitélio luminal do endométrio ativando a fosfolipase C que metaboliza o fosfoinositol bifosfato em IP_3 e DAG (AROSH et al., 2004). Esses mensageiros aumentam a atividade da fosfolipase A_2 (PLA_2) (THATCHER et al., 1997). O ácido araquidônico esterificado é liberado da bicamada lipídica pela clivagem hidrolítica desencadeada pela PLA_2 . Após sua liberação, o ácido araquidônico pode levar à formação de leucotrienos ou levar à formação de prostaglandinas e tromboxanos (AROSH et al., 2004).

Os dois fatores limitantes na secreção de $PGF_{2\alpha}$ são a disponibilidade do ácido araquidônico e das endoperóxido sintases (COX-1 e COX-2; THATCHER et al., 1997). Arosh et al. (2004) estudaram a expressão do RNA mensageiro (mRNA) de ambas ciclooxygenases, COX-1 e COX-2, nas células luteais grandes e pequenas durante todo o período de duração do CL bovino. Os autores observaram que houve expressão do mRNA da COX-2 entre os dias 7 e 17 do ciclo estral (d0 = estro), enquanto o mRNA da COX-1 foi expresso em níveis baixos durante toda a duração do CL. Durante o ciclo estral de bovinos a expressão do mRNA da COX-2 no endométrio foi significativamente maior entre os dias 13 e 21 comparada à expressão no período entre os dias 1 e 12 do ciclo (AROSH et al., 2002). Esses estudos indicam que há maior expressão de COX-2 no final do ciclo estral, próximo ao momento da luteólise quando a secreção de $PGF_{2\alpha}$ de origem endometrial está aumentada.

Certos compostos têm a capacidade de inibir a ação das COXs. Alguns ácidos graxos poliinsaturados inibem a síntese de prostaglandina através do bloqueio da atividade da COX. Thatcher et al. (1994) relataram que o ácido linoléico inibiu a síntese de prostaglandina pelo endométrio pela inibição da atividade da COX-2 *in vitro*. Além disso, os autores demonstraram que havia

maiores quantidades de ácido linoléico e menores quantidades de ácido araquidônico no endométrio de vacas no 17º dia de prenhez quando comparadas com vacas vazias também no 17º dia do ciclo estral. Em outro estudo, vacas holandesas em lactação que receberam infusão de gordura amarela de origem animal (“yellow grease”) no abomaso (rico em ácido linoléico) secretaram menos $\text{PGF}_{2\alpha}$ em resposta ao desafio de OT no 15º dia do ciclo estral (OLDICK et al., 1997).

Mas recentemente, Coyne et al. (2008) avaliaram o efeito da suplementação de dietas ricas em ácido linolênico por 45 dias sobre a expressão de genes envolvidos na síntese de prostaglandina pelo útero de novilhas de corte. Os autores observaram que as novilhas que receberam dietas ricas em ácido linoléico apresentaram menores concentrações de ácido araquidônico quando comparadas as vacas do grupo controle. Os autores relataram também que a expressão do mRNA da PLA_2 foi menor para os animais que apresentaram altas concentrações de ácido linoléico no tecido endometrial. Com esses resultados os autores concluíram que a expressão dos genes responsáveis pela síntese de prostaglandina no endométrio pode ser regulada com a suplementação de dietas ricas em ácido linoléico em novilhas de corte.

O ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) são outros dois ácidos graxos que tem a capacidade de inibir a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio. Mattos et al. (2002) suplementaram vacas leiteiras em lactação por 50 dias com dietas contendo diferentes concentrações de farinha de peixe “menhaden”, rico em EPA e DPA. Após 30 a 34 dias de suplementação, o estro (d 0) foi sincronizado e no 15º dia do ciclo estral subsequente foram aplicados E_2 e OT para induzir liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$. As vacas suplementadas com a farinha de peixe apresentaram concentrações plasmáticas de PGFM inferiores após o desafio com E_2 -OT quando comparadas às vacas que não receberam farinha de peixe. Thatcher et al. (1997) também observaram que vacas em lactação suplementadas por 25 dias com farinha de peixe “menhaden” apresentaram menores concentrações de PGFM em resposta a aplicações de E_2 e OT 15 dias após o estro.

Outro método de inibir a síntese de prostaglandina é através da utilização de drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs). Os AINEs impedem a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio através da inibição das enzimas COX-1 e COX-2 envolvidas na formação das prostaglandinas. Odensvik et al. (1998) avaliaram os efeitos da suplementação de novilhas com grânulos de FM (2,2 mg/Kg de peso corporal) sobre a duração do ciclo estral e a manutenção do CL. Os animais receberam os grânulos de FM duas, três e quatro vezes ao dia, por um período de 9 dias começando no 14º ou 15º dia do ciclo estral. A duração média do ciclo estral foi aumentada nas novilhas que receberam FM três vezes ao dia de 19,8 para 22,5 dias e novilhas que receberam FM quatro vezes ao dia tiveram o ciclo estral estendido de 19,5 para 26 dias. Além disso, o processo de luteólise não ocorreu até que o tratamento fosse suspenso (dias 23 e 24 do ciclo estral) em novilhas que receberam FM quatro vezes ao dia.

A administração de AINEs no momento da TE pode influenciar positivamente na taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos, uma vez que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberada pelo endométrio durante a manipulação do trato reprodutivo no momento da inovulação do embrião, (FERGUSON, 1941; SCHALLENBERGER et al., 1989; SCHRICK et al., 2003; SCENNA et al., 2005) pode interferir aumentando a mortalidade embrionária precoce, seja pelo efeito negativo sobre a funcionalidade do CL (SEALS et al., 1998), seja pelo efeito direto da $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre o desenvolvimento do embrião (WILTBANK et al., 1989; SEALS et al., 1998; SCHRICK et al., 2003; HOCKETT et al., 2004).

Elli et al. (2001) administraram lisinato de ibuprofeno (AINE que inibe a atividade da enzima COX-2) uma hora antes da transferência de embriões em 100 novilhas e obtiveram taxas de prenhez superiores no grupo tratado quando comparado ao grupo controle (82 vs. 56%). Pugh et al. (2004) trataram vacas com aspirina, outro inibidor da COX-2, e obtiveram aumento significativo de 18% na taxa de prenhez em comparação as vacas do grupo controle.

Schrack et al. (2001) administraram 500 mg de FM em 737 vacas 2 a 5 minutos antes da inovulação de embriões bovinos. A taxa de prenhez dos animais que foram tratados com FM foi significativamente maior quando comparados aos animais controle (63,8% e 51,1%, respectivamente). Scenna

et al. (2005) avaliaram o efeito de uma única aplicação de FM (500 mg) sobre a taxa de prenhez de 1300 receptoras de embriões produzidos *in vivo* e observaram que os animais que receberam a aplicação de FM apresentaram taxa de prenhez significativamente maior que os animais do grupo controle (65% X 60%). Os autores observaram também que não houve efeito benéfico do FM sobre a taxa de prenhez de receptoras que foram inovuladas com embriões de grau 1 de qualidade, no entanto, receptoras que receberam embriões grau 2 de qualidade apresentaram taxa de prenhez superior quando tratadas com FM em relação as receptoras não tratadas (64,2% X 53,5%, respectivamente).

No entanto, McNaughtan (2004) avaliou o efeito da administração de 500 mg de FM no momento da inovulação do embrião em 326 novilhas inovuladas com embriões produzidos *in vivo* que foram congelados/descongelados e não observou diferença na taxa de prenhez dos animais tratados em relação aos animais controle (50% X 45%, respectivamente).

Diversos estudos relataram efeito benéfico da administração de diferentes inibidores da síntese de PG sobre a taxa de prenhez em receptoras de embriões bovinos, apesar de ter sido observada grande variação nas taxas de prenhez dos animais tratados com AINEs. Portanto o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da administração de FM sobre a taxa de prenhez de receptoras de embriões de PIV, e também avaliar o efeito dessa administração sobre as características da fase luteal desses animais.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

- Avaliar o efeito da aplicação de FM no momento da inovulação de embriões sobre a taxa de prenhez e sobre as características da fase luteal de receptoras bovinas.

Para tanto foram realizados dois experimentos, sendo que para facilitar a apresentação do presente estudo o experimento 1 foi denominado: *“Efeito do flunixin meglumine sobre a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos”* e o experimento 2 foi denominado *“Efeito do flunixin meglumine sobre as características da fase luteal de fêmeas bovinas”*

3.2. Objetivos Específicos

Experimento 1 – Efeito do flunixin meglumine sobre a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos

Objetivo

- Avaliar o efeito de uma aplicação de FM no momento da inovulação de embriões sobre a taxa de prenhez em receptoras bovinas aos 30 e 60 dias de gestação.

Hipótese

- A aplicação de FM, um inibidor da síntese de prostaglandina, no momento da inovulação do embrião aumenta a taxa de prenhez em receptoras de embriões bovinos.

Experimento 2 – Efeito do flunixin meglumine sobre as características da fase luteal de fêmeas bovinas

Objetivo 1

- Avaliar o efeito da manipulação do trato reprodutivo de fêmeas bovinas realizada no D7 do ciclo estral sobre a duração da fase luteal desses animais.

Hipótese

- A manipulação do trato reprodutivo de fêmeas bovinas no 7º dia do ciclo estral reduz a duração funcional do CL, diminuindo a duração da fase luteal.

Objetivo 2

- Avaliar o efeito da manipulação do trato reprodutivo de fêmeas bovinas realizada no D7 do ciclo estral sobre a concentração plasmática de P_4 durante o restante da fase luteal.

Hipótese

- A manipulação do trato reprodutivo de fêmeas bovinas no 7º dia do ciclo estral diminui a concentração plasmática de P_4 durante a fase luteal do ciclo estral.

Objetivo 3

- Avaliar o efeito de uma aplicação de FM no momento da manipulação do trato reprodutivo sobre a duração da fase luteal do ciclo estral de fêmeas bovinas.

Hipótese

- A aplicação de FM no D7 do ciclo estral bloqueia uma possível redução na duração da fase luteal causada pela manipulação do trato reprodutivo de fêmeas bovinas.

Objetivo 4

- Avaliar o efeito de uma aplicação de FM no momento da manipulação do trato reprodutivo sobre a concentração plasmática de P_4 durante a fase luteal do ciclo estral.

Hipótese

- A aplicação de FM no D7 do ciclo estral bloqueia uma possível diminuição na concentração plasmática de P_4 durante a fase luteal causada pela manipulação do trato reprodutivo de fêmeas bovinas.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Experimento 1 – Efeito do flunixin meglumine sobre a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos

Período de realização

O experimento foi realizado entre janeiro e março de 2008, caracterizado por período quente e úmido, com alta disponibilidade de forragens.

Animais

Foram utilizadas 184 receptoras de embriões bovinos, cruzadas (Nelore ou Gir X Girolando ou Holandês ou Pardo suíço ou Angus ou Simental), adultas (primíparas e multíparas), com escore de condição corporal igual ou superior a 3 (escala de 0 a 5; HOUGHTON et al., 1990), apresentando atividade ovariana cíclica e período pós-parto superior a 60 dias, provenientes dos rebanhos de centrais comerciais de receptoras de embriões localizadas próximas a região de Alfenas, MG. Os animais foram mantidos sob pastejo de *Brachiaria* sp e tiveram livre acesso a sal mineral e água durante todo o período experimental e também durante o período que antecedeu as transferências de embriões.

Embriões

Foram utilizados 184 embriões produzidos *in vitro* pelo Laboratório de fecundação *in vitro* Bioembryo®, localizado no município de Bauru, SP. Os oócitos utilizados foram originados de aspirações foliculares de matrizes zebuínas P.O. (Nelore e Guzerá), realizadas pela Biotran® – Assistência e Consultoria em Medicina Veterinária, localizada no município de Alfenas, MG. O sêmen utilizado para as FIVs era proveniente de touros zebuínos P.O. (Nelore e Guzerá), sendo que o sêmen utilizado era proveniente de touro da mesma raça da matriz que originou o oócito. Foram utilizados embriões na fase de desenvolvimento de blastocisto inicial (BI; n = 40), blastocisto (BL; n = 68) e blastocisto expandido (BX; n = 76), todos apresentavam grau 1 de qualidade (alta qualidade). Para a classificação dos embriões conforme o estágio de

desenvolvimento embrionário e a qualidade do embrião foram utilizados os padrões determinados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS).

Sincronização das receptoras

As receptoras foram sincronizadas através de uma aplicação de cloprostenol (Ciosin[®] ¹, 500 µg, intramuscular). No período entre 2 a 5 dias após a aplicação os animais foram observados para detecção de cio duas vezes ao dia, sendo que o estro foi considerado como o primeiro momento no qual a receptora manifestou sinais de cio (aceitação a monta).

Seleção das receptoras e inovulação dos embriões

Foram utilizadas receptoras entre o 6º e o 9º dia após a observação do estro. No dia da inovulação, as receptoras foram selecionadas através da palpação retal e exame ultrassonográfico do trato reprodutivo. As receptoras que apresentavam um CL e não apresentavam conteúdo líquido no útero foram selecionadas para receberem os embriões.

Após a seleção, as receptoras consideradas aptas para receber o embrião foram contidas em tronco onde cada receptora foi submetida aos seguintes processos:

- Anestesia peridural caudal, com 4 ml de lidocaína a 2% (Anestésico L^{®2}, Pearson Saúde Animal).
- Higienização da vulva e da região perineal com água e papel toalha.
- Introdução de inovulador protegido por camisa sanitária no fundo vaginal e, com auxílio da palpação retal foi feita a passagem do inovulador através dos anéis cervicais sendo que, após a passagem da cérvix ocorre o rompimento da camisa sanitária, possibilitando o contato direto entre o inovulador e a parede uterina.

¹ Ciosin, Schering-Plough, São Paulo, Brasil.

² Anestésico L, Pearson Saúde Animal, São Paulo, Brasil.

- Posicionamento do inovulador no terço final do corno uterino ipsolateral ao ovário que apresentou o CL no exame de palpação, onde os embriões foram depositados.
- Todas as inovulações foram classificadas conforme a dificuldade para realização do procedimento, sendo determinadas como escore 1 as inovulações que não apresentaram dificuldade em transpassar a cérvix e posicionar o inovulador no terço final do corno uterino. Nas inovulações de escore 2 houve uma dificuldade moderada para a realização do procedimento e nas inovulações classificadas como escore 3 houve uma grande dificuldade para realização do procedimento.

No experimento 1 as inovulações foram realizadas por 2 técnicos capacitados que apresentam uma grande experiência na realização desse procedimento.

Após esses procedimentos as receptoras foram divididas aleatoriamente em dois grupos: grupo 1 (controle) e grupo 2 (experimental), sendo que foi feita uma divisão casualizada em blocos dos embriões entre os dois grupos de forma que ambos recebessem o mesmo número de BI, BL e BX.

Os animais do grupo 1 foram liberados imediatamente após o procedimento de inovulação e, os animais do grupo 2 receberam uma aplicação de FM (Flunixin Injetável^{®3}, 1,1 mg/kg, intramuscular) logo após a inovulação.

Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado através de exames ultrassonográficos trans-retais aos aproximadamente 30 e 60 dias de gestação, com a utilização do aparelho de ultra-som Esaote^{®4}, modelo Aquila ProVet, com transdutor bifrequencial (6-8 MHz). O diagnóstico de prenhez aos 30 dias de gestação foi confirmado pela visualização do embrião, que se apresenta como estrutura hiperecogênica, sem qualquer diferenciação visível, sendo

³ Flunixin Injetável, Chemitec Agro-Veterinária, São Paulo, Brasil.

⁴ Esaote Pie Medical Equipment B.V., Maastricht, Holanda.

constatados os batimentos cardíacos (PIERSON e GINTHER, 1984). Avaliação similar foi feita aos 60 dias.

Análise estatística

Os dados das taxas de prenhez foram analisados estatisticamente por meio do teste de Qui-quadrado, a um nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Para tanto, foi utilizado o procedimento FREQ do programa SAS System for Windows® (2001).

4.2. Experimento 2 - Efeito do flunixin meglumine sobre as características da fase luteal de fêmeas bovinas

Período de realização

O experimento foi realizado nos meses de novembro e dezembro de 2008, caracterizados por um período quente e com alta taxa de precipitação pluviométrica. Durante todo experimento houve alta disponibilidade de forragens, sendo que, essa disponibilidade foi gradativamente aumentando no decorrer do experimento.

Animais

Foram utilizadas 33 fêmeas bovinas da raça Nelore, adultas (primíparas e multíparas), com escore de condição corporal igual ou superior a 3 (escala de 0 a 5; HOUGHTON et al., 1990), apresentando atividade ovariana cíclica e período pós-parto superior a 90 dias, provenientes dos rebanhos das fazendas Experimentais Edgárdia e São Manuel da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu. Os animais foram mantidos a pasto de *Brachiaria* sp durante todo o período que antecedeu o experimento, e durante o período experimental os animais foram suplementados com feno de capim Coast-cross e mistura concentrada composta de farelo de soja, farelo de trigo e polpa cítrica (aproximadamente 14% de proteína). Além disso, durante todo período foi fornecido sal mineral e água a vontade.

Sincronização dos animais e detecção do estro

Os animais foram sincronizados através da administração de duas doses de cloprostenol sódico (Sincrocio[®] ⁵, 500 µg, intramuscular), com intervalo de 11 dias entre as aplicações. No período entre 2 a 5 dias após a segunda aplicação os animais foram observados para detecção de cio duas vezes ao dia, por aproximadamente uma hora, sendo que o estro foi considerado como o primeiro momento no qual o animal manifestou sinais de cio (aceitação da monta). Para o auxílio na detecção de estro foi utilizado rufião Nelore, vasectomizado provido de buçal marcador, introduzido ao lote das fêmeas uma semana antes da segunda aplicação de cloprostenol para que houvesse plena adaptação do mesmo ao restante dos animais, e este permaneceu com o lote de fêmeas até o final do período de observação de cio.

Ao término do período de observação de cio, 25 fêmeas haviam apresentado sinais de estro durante o intervalo de observação, sendo que os 8 animais que não foram observados em cio foram descartados do experimento.

Avaliação dos animais e manipulação do trato reprodutivo

Após 7 dias da manifestação de cio (D7) as 25 fêmeas foram submetidas a avaliação ultrassonográfica do trato reprodutivo para determinação das características do CL e também para a avaliação da parede uterina e para determinar uma possível presença de conteúdo no lúmen uterino. Além disso, no mesmo dia foi coletado sangue para dosagem da concentração plasmática de P₄. Nessa etapa um animal foi descartado do experimento por apresentar conteúdo líquido no lúmen uterino, uma fêmea foi descartada por não apresentar imagem nítida de um CL durante o exame ultrassonográfico e outro animal foi descartado posteriormente por apresentar concentração plasmática de P₄ abaixo de 1 ng/ml no dia da manipulação (D7).

Os 22 animais restantes foram divididos aleatoriamente entre os grupos: G1 (controle, $n=7$), G2 (manipulação, $n=8$) e G3 (manipulação + FM, $n=7$).

⁵ Sincrocio, Ouro Fino Saúde Animal, Ribeirão Preto, Brasil.

Grupo 1 (controle)

As 7 fêmeas do grupo 1 não foram submetidas a nenhum tipo de manipulação do trato reprodutivo além dos exames ultrassonográficos dos ovários e do útero, e também não receberam nenhum fármaco durante o D7 ou posteriormente durante o experimento. Os animais do G1 foram submetidos a exames ultrassonográficos e dosagens hormonais entre o D7 e o final da fase luteal (D7, D9, D11, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D19 e D20) para determinação do perfil de concentração plasmática de P_4 e duração funcional do CL.

Grupo 2 (manipulação)

As 8 fêmeas do grupo 2 foram submetidas a manipulação do trato reprodutivo no D7, de forma semelhante à inovulação de um embrião, logo após a avaliação ultrassonográfica e a colheita de sangue. Antes da manipulação os animais foram submetidos a uma anestesia epidural caudal, com 4 ml de lidocaína a 2% (Anestésico L^{®6}, Pearson Saúde Animal). Após a realização da anestesia foi feita higienização da vulva e da região perineal com água e papel toalha. Em seguida, foi introduzido inovulador protegido por camisa sanitária no fundo vaginal da fêmea bovina e, através do auxílio da palpação retal foi feita a passagem desse inovulador através dos anéis cervicais, sendo que, após a passagem da cervix ocorreu o rompimento da camisa sanitária, possibilitando o contato direto entre o inovulador e a parede uterina. Por último o inovulador foi posicionado no terço final do corno uterino ipsolateral ao ovário que apresentou o CL no exame de palpação. Assim como no experimento 1, todas as manipulações foram classificadas com escore de dificuldade de 1 a 3 (1 = inovulador facilmente posicionado no terço final do corno uterino; 3 = grande dificuldade para posicionar o inovulador no terço final do corno uterino). Os animais do G2 foram submetidos a exames ultrassonográficos e dosagens hormonais entre o D7 e o final da fase luteal assim como realizado no grupo 1.

⁶ Anestésico L, Pearson Saúde Animal, São Paulo, Brasil.

Grupo 3 (manipulação + flunixin meglumine)

As 7 fêmeas do grupo 3 foram submetidas à uma manipulação do trato reprodutivo no D7 logo após a avaliação ultrassonográfica e a colheita de sangue, simulando uma inovulação de embrião, de forma idêntica à técnica descrita para os animais do grupo 2. Porém, ao final da manipulação os animais receberam uma aplicação de FM (Flunixin Injetável^{®7}, 1,1 mg/kg, intramuscular).

Os animais do G3, assim como os animais dos outros grupos, foram submetidos a exames ultrassonográficos e dosagens hormonais entre o D7 e o final da fase luteal para determinação do perfil de concentração plasmática de P₄ e duração funcional do CL.

As manipulações realizadas no experimento 2 não foram realizadas pelos mesmos técnicos que realizaram as inovulações dos embriões no experimento 1, sendo que, o técnico que realizou as manipulações no experimento 2 apresenta pouca experiência na realização desse procedimento.

Exames Ultrassonográficos

Os exames ultrassonográficos trans-retais foram realizados com os animais contidos em estação, com a utilização do aparelho de ultra-som Aloka^{®8}, modelo SSD 500, com transdutor de frequência 5 MHz. O volume do tecido luteal e da cavidade luteal foram calculados pela fórmula matemática: $V = 4/3 \cdot P \cdot a/2 \cdot (b/2)^2$, em que a = eixo longitudinal e b = eixo transversal. O volume final foi considerado como o volume total do CL subtraído o volume da cavidade (GRYGAR et al., 1997).

Colheita de sangue

As amostras de sangue foram colhidas logo após os exames ultrassonográficos (D7, D9, D11, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D19 e D20)

⁷ Flunixin Injetável, Chemitec Agro-Veterinária, São Paulo, Brasil.

⁸ Aloka Co. Ltda, Tokio, Japão.

por venopunção dos vasos coccígeos com agulhas 21GX1⁹ e depositadas em tubos de colheita de sangue¹⁰ a vácuo heparinizados.

Os tubos contendo as amostras foram mantidos em caixa térmica refrigerada até o momento da centrifugação realizada a 2500 x g por 15 minutos. O plasma obtido foi acondicionado em tubos plásticos identificados e estes armazenados em freezer a -70°C até o momento das dosagens hormonais.

Dosagens hormonais de progesterona

As dosagens plasmáticas de P₄ foram determinadas através da utilização de kits comerciais em fase sólida¹¹, com leitura por sistema de radioimunoensaio (Packard Cobra II Auto Gamma¹²) seguindo-se as instruções do fabricante. Os controles utilizados para o teste foram: 0; 0,1; 0,5; 2; 10; 20 e 40 nanogramas de P₄ por mililitro (ng/mL). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu.

O processamento das amostras foi realizado em 2 ensaios, sendo o coeficiente de variação intra-ensaio de 1,87%, o coeficiente de variação inter-ensaio de 3,75% e a sensibilidade dos ensaios de 0,02 ng/mL.

Análise estatística

Para a análise estatística das características avaliadas foi empregado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS, System for Windows, versão 2001). As variáveis concentração plasmática de P₄ e volume do CL foram comparadas nos diferentes momentos (D7, D9, D11, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D19 e D20) por meio do procedimento GLM do SAS (General Linear Model Procedure – PROC GLM), utilizando-se o teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Para comparar a concentração plasmática de P₄ entre

⁹ Vacutainer® BD, São Paulo – SP, Brasil

¹⁰ Vacutainer® BD, São Paulo – SP, Brasil.

¹¹ Coat A – Count Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA, USA.

¹² GMI Inc. – Ramsey, MN - USA

os diferentes grupos foi realizada análise de variância e regressão, tendo como fonte de variação os dias das amostragens. Para a comparação entre as médias foi utilizado o teste t de Student, onde foi empregado nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

As variáveis dependentes foram concentração plasmática de P_4 e o volume do CL, e as independentes foram os dias das colheitas e as vacas.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento 1 – Efeito do flunixin meglumine sobre a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos

Do total de 184 inovulações de embriões, 148 (80,4%) foram classificadas com escore 1 de dificuldade (procedimento facilmente realizado), 30 (16,3%) foram classificadas com escore 2 (dificuldade média) e apenas 6 (3,3%) inovulações foram classificadas com escore 3 (grande dificuldade).

A taxa de prenhez geral em torno dos 30 dias de gestação das 184 receptoras de embriões foi de 42,39% (78/184), sendo que não houve diferença entre a taxa de prenhez dos animais do grupo 1 (40,22% - 37/92) em relação à taxa de prenhez dos animais no grupo 2 (44,57% - 41/92) ($p=0,55$) (figura 1).

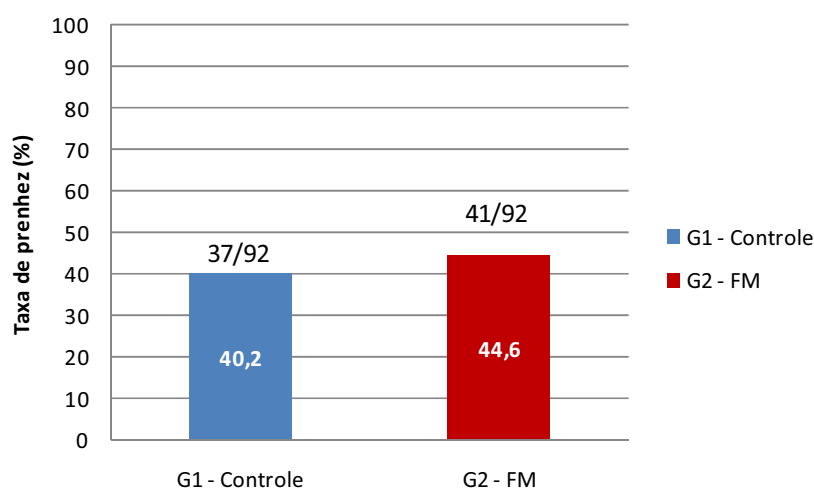


Figura 1 - Taxa de prenhez aos 30 dias de receptoras de embriões bovinos inovuladas com embriões produzidos *in vitro*, do grupo 1 (controle) X grupo 2 (tratadas com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no momento da inovulação) ($p> 0,05$).

Não houve diferença ($p>0,05$) na taxa de prenhez entre os animais que foram submetidos à inovulações classificadas com diferentes escores de dificuldade, sendo que a taxa de prenhez das receptoras inovuladas com escore 1 foi de 43,92% (65/148), das receptoras inovuladas com escore 2 foi de 36,67% (11/30) e dos animais inovulados com escore 3 foi de 33,33% (2/6). Da mesma forma, não houve diferença nas taxas de prenhez entre diferentes

grupos experimentais considerando os diferentes estágios de desenvolvimento embrionário (BI, BL e BX) ($p>0,05$). Os resultados referentes às taxas de prenhez das receptoras de embriões utilizadas no experimento 1 estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Taxa de prenhez aos 30 dias de gestação de receptoras de embriões inovuladas com embriões produzidos *in vitro* em diferentes estágios de desenvolvimento. Grupo 1 = grupo controle; Grupo 2 = grupo de receptoras tratadas com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no momento da inovulação dos embriões.

Grupos	Taxa de prenhez aos 30 dias (%)			
	Blastocisto inicial	Blastocisto	Blastocisto expandido	Total
Grupo 1	40,0% (8/20) ^{ab}	52,9% (18/34) ^a	28,9%(11/38) ^b	40,2% (37/92)
Grupo 2	35,0 % (7/20) ^c	52,9% (18/34) ^c	42,1%(16/38) ^c	44,6% (41/92)
Total	37,5% (15/40) ^{de}	52,9% (36/68) ^d	35,5% (27/76) ^e	42,4% (78/184)

^{a, b, c, d, e} Valores com diferentes sobrescritos na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).

A taxa de prenhez geral observada no presente estudo foi semelhante aos valores observados em diversos estudos que relataram taxa de prenhez de embriões produzidos *in vitro* variando de 30 a 50% (HASLER, 2000; VAN WAGTENDONK et al., 2000; FARIN et al., 2001; HOSHI, 2003; SCHIMIDT, 2007). No presente estudo houve grande variação nas taxas de prenhez observadas em diferentes lotes de receptoras, sendo que, o fator que mais influenciou sobre a taxa de prenhez nesse estudo foi a disponibilidade de receptoras de embriões. Em situações onde a proporção de receptoras e número total de embriões a serem transferidos era em torno de 1,5:1 a 2:1 a taxa de prenhez observada variou de 50 a 70%, e já em situações onde essa proporção era de aproximadamente 1,1:1 a 1,4:1 as taxas de prenhez observadas eram inferiores com valores em torno de 30 a 40%. Essa variação na taxa de prenhez provavelmente foi observada devido ao fato de uma menor disponibilidade de receptoras de embriões não possibilitar uma seleção rigorosa desses animais, sendo que nesses casos alguns embriões são transferidos para receptoras que apresentam alguma condição desfavorável como: CLs pequenos, tonicidade uterina inadequada, cervix difícil de ser transpassada pelo inovulador entre outros.

Não foi observada diferença na taxa de prenhez entre as receptoras do grupo controle (Grupo 1) em relação às receptoras do grupo FM (Grupo 2) (Tabela 1). De forma oposta, diversos estudos demonstraram efeitos positivos da utilização de inibidores da síntese de prostaglandina sobre a taxa de prenhez desses animais (ELLI et al., 2001; PUGH et al., 2004). Scenna et al. (2005) também relataram efeito benéfico do tratamento de receptoras de embriões bovinos com inibidores de prostaglandina. Nesse estudo os autores observaram aumento significativo na taxa de prenhez de receptoras tratadas com FM imediatamente antes da transferência dos embriões em relação às receptoras do grupo controle. Além disso, no mesmo trabalho, os autores relataram a ocorrência de aumento significativo na síntese de prostaglandina pelo endométrio após a manipulação uterina necessária para a inovulação dos embriões, sendo que as concentrações mais altas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foram detectadas entre 130 e 230 minutos após a manipulação.

Provavelmente um possível fator que justifique essa discordância entre os resultados obtidos nos trabalhos acima citados e o presente estudo é a diferença na quantidade de $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberada pelo endométrio no momento da inovulação. Embora não mensurada no atual estudo, é esperado que tenha ocorrido discreta liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante as inovulações dos embriões, uma vez que a grande maioria dessas inovulações (80,4% - 148/184) foi classificada com escore de inovulação 1 (cervix facilmente transpassada e posicionamento do inovulador no terço final do corno uterino exigindo mínima manipulação uterina), fato ocorrido devido a fatores como a grande experiência do técnico que realizou as inovulações e o descarte de receptoras que anteriormente apresentaram cervix difícil de serem transpassadas.

Rowe et al. (1980) já haviam relatado correlação inversa entre o tempo e a dificuldade encontrada para realização das inovulações com as taxas de prenhez de receptoras de embriões bovinos. De forma semelhante, Schrick et al. (2003) relataram que conforme a dificuldade para a inovulação do embrião aumentava, a taxa de prenhez diminuía significativamente. Os autores concluíram que esse acontecimento tinha correlação direta com a quantidade de $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberada no momento da transferência dos embriões.

Portanto, provavelmente as baixas quantidades de $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberadas pelo endométrio das receptoras do grupo controle no atual estudo não foram suficientes para interferir negativamente no desenvolvimento embrionário ou mesmo para exercer algum efeito deletério sobre a funcionalidade do CL, justificando assim a inexistência de diferença significativa entre as taxas de prenhez observadas entre as receptoras do grupo controle e as receptoras do grupo tratado com FM.

Outro fator que pode ter influenciado para a inexistência de efeito positivo da administração de FM em receptoras de embriões sobre a taxa de prenhez desses animais foi o grau de desenvolvimento e de qualidade dos embriões. Como citado na revisão de literatura, diversos estudos (MAURER & BEIER, 1976; WILTBANK et al., 1989; SCHRICK et al., 2003; HOCKETT et al., 2004) sugerem que o principal período do desenvolvimento embrionário onde o mesmo é mais susceptível aos efeitos deletérios da $\text{PGF}_{2\alpha}$ é o período de transição do estágio de mórula para o estágio de blastocisto/blastocisto expandido. Portanto, o fato de não terem sido utilizados embriões no estágio de mórula no presente estudo pode ser um dos motivos para a inexistência de um aumento na taxa de prenhez das receptoras tratadas com FM.

Além disso, Scenna et al. (2005) não observaram aumento significativo na taxa de prenhez de receptoras, que receberam embriões produzidos *in vivo* frescos e congelados classificados como grau 1 de qualidade, que foram submetidas a uma aplicação de FM no momento da inovulação quando comparada a taxa de prenhez dos animais do grupo controle. Porém, as receptoras que receberam um embrião de grau 2 de qualidade (média qualidade) e foram submetidas a uma aplicação de FM no momento da transferência apresentaram taxa de prenhez 11% maior que os animais do grupo controle que receberam embriões de mesma qualidade. De forma semelhante, Purcell et al. (2005) observaram efeito benéfico da administração de FM sobre a taxa de prenhez de receptoras inovuladas com embriões produzidos *in vivo* frescos e congelados de grau 2 e 3 de qualidade (média e baixa qualidade, respectivamente). Portanto, o fato de somente terem sido utilizados embriões de grau 1 de qualidade (alta qualidade) no atual trabalho

pode ser um fator que tenha contribuído para a inexistência de diferença significativa entre as taxas de prenhez dos diferentes grupos experimentais.

Entre as receptoras do grupo controle (Grupo 1), os animais que receberam um embrião no estágio de BL apresentaram maior taxa de prenhez em relação as receptoras que receberam um embrião no estágio de BX (Tabela 1). Quando considerado o número total de animais também foi observada diferença entre a taxa de prenhez das receptoras que receberam BL e a taxa de prenhez das fêmeas que receberam BX (Tabela 1).

Dados similares foram observados em outros dois estudos (MONSON et al., 1992; HASLER et al., 1995). Já Suzuki et al. (1991) observaram taxa de prenhez superior em receptoras que receberam embriões PIV no estágio de BX quando comparadas a receptoras que receberam embriões em estágios anteriores de desenvolvimento.

Um possível fator que pode ter influenciado na maior taxa de prenhez observada em receptoras que receberam embrião no estágio de BL no presente estudo é a maior sincronia entre o estágio de desenvolvimento do embrião e o momento do ciclo estral das receptoras de embriões. Grande parte das receptoras utilizadas no experimento 1 havia apresentado sinais de estro 8 dias antes da inovulação (D8; 34,2% - 63/184), período no qual é observada uma grande porcentagem de embriões em estágio de BL em fêmeas inseminadas ou cobertas (KUNKEL & STRICKLIN, 1978; RIZOS et al., 2002). E segundo Donaldson (1985), Sreenan et al., (1987), Hasler (2001) e Spell et al., (2001) receptoras inovuladas com embriões produzidos *in vivo* que apresentam assíncronia em relação a doadora menor que 24 horas apresentam maiores taxas de prenhez quando comparadas a receptoras que apresentam assíncronia maior. Além disso, Donaldson (1985) observou que receptoras no D7 que foram inovuladas com embriões produzidos *in vivo* no estágio de BI apresentaram maiores taxas de prenhez que o restante das receptoras que receberam um embrião no mesmo estágio de desenvolvimento. O autor também relatou que receptoras que apresentaram estro após as doadoras de embriões (D6) tiveram taxas de prenhez mais altas quando receberam embriões no estágio de mórula inicial.

Portanto, talvez essa maior sincronia entre os embriões no estágio de BL e a maioria das receptoras de embriões utilizadas no experimento 1 seja um fator que tenha influenciado positivamente na maior taxa de prenhez observada nas receptoras do grupo controle que receberam um embrião no estágio de BL.

O fato de não ter sido observada diferença significativa na taxa de prenhez entre os animais que foram transferidos com embriões em diferentes estágios de desenvolvimento e foram submetidos a uma aplicação de FM no momento da inovulação sugere que possivelmente o FM seja capaz de diminuir os efeitos deletérios da assíncronia entre a receptora e o embrião. Embriões transferidos com assíncronia maior que 24 horas em relação ao momento do ciclo estral da receptora, freqüentemente não encontram condições uterinas ideais para manterem seu desenvolvimento após a inovulação, e devido a esse fato, possivelmente sejam mais susceptíveis aos efeitos deletérios da $\text{PGF}_{2\alpha}$ em relação aos embriões que se desenvolvem em ambiente uterino mais favorável. Portanto, é provável que a administração de FM no momento da inovulação exerça efeito positivo sobre a taxa de prenhez mais acentuado em receptoras que apresentam maior assíncronia em relação ao estágio de desenvolvimento embrionário.

A taxa de perda embrionária/fetal total entre aproximadamente 30 e 60 dias de gestação foi de 3,9% (3/78), não havendo diferença significativa entre os grupos e os diferentes estágios de desenvolvimento embrionário (tabela 2).

Tabela 2 – Taxa de perda embrionária entre aproximadamente 30 e 60 dias de gestação de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro* em diferentes estágios de desenvolvimento. Grupo 1 = grupo controle; Grupo 2 = grupo de receptoras tratadas com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no momento da inovulação do embriões.

Grupos	Perda embrionária entre aproximadamente 30 e 60 dias (%)			
	Blastocisto inicial	Blastocisto	Blastocisto expandido	Total
Grupo 1	0,0% (0/8) ^a	0,0% (0/18) ^a	9,1% (1/11) ^a	2,7% (1/37)
Grupo 2	14,3% (1/7) ^b	5,6% (1/18) ^b	0,0% (0/16) ^b	4,9% (2/41)
Total	6,7% (1/15) ^c	2,8% (1/36) ^c	3,7% (1/27) ^c	3,9% (3/78)

^{a, b, c} Valores na mesma linha não diferem significativamente ($p > 0,05$)

A taxa de perda gestacional entre 30 e 60 dias observada no presente estudo foi inferior às taxas comumente relatadas para receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*, que variam entre 10 e 20% (REICHENBACH et al., 1992; HASLER et al., 1995; HASLER, 2000; REIS et al., 2004). Novamente um dos fatores que pode ter influenciado na baixa taxa de perda embrionária/fetal observada no presente estudo foi o fato de somente embriões grau 1 de qualidade serem utilizados no estudo. Farin et al. (1995) observaram que as perdas embrionárias e fetais nos primeiros 215 dias de gestação em receptoras que foram inovuladas com embriões classificados como grau 1 de qualidade (alta qualidade) produzidos *in vitro* foram muito semelhantes às perdas observadas em receptoras inovuladas com embriões produzidos *in vivo*. Já as receptoras inovuladas com embriões produzidos *in vitro* grau 2 (média qualidade) apresentaram taxa de perda gestacional no mesmo período muito superior à taxa observada em receptoras que receberam um embrião produzido *in vivo* grau 1 ou 2 e embriões produzidos *in vitro* grau 1.

5.2. Experimento 2 - Efeito do flunixin meglumine sobre as características da fase luteal de fêmeas bovinas

5.2.1. Taxa de sincronização

Após duas aplicações de cloprostenol sódico com intervalo de 11 dias entre as aplicações, 25 das 33 fêmeas bovinas apresentaram sinais de estro durante o período de 2 a 5 dias após a segunda aplicação, representando 75,76% do total de animais. Fernandes et al. (2006) obtiveram sincronização semelhante em receptoras de embriões cruzadas (82,9% - 199/240) que foram submetidas a uma aplicação de cloprostenol entre os dias 6 e 17 do ciclo estral. De forma semelhante, Hardin et al. (1980) e Ávila Pires et al. (2003) obtiveram sincronizações de estro variando entre 70 e 85% após duas aplicações de cloprostenol com intervalo de 11 a 14 dias entre as aplicações em fêmeas zebuínas.

5.2.2. Manipulação do trato reprodutivo

Do total de 22 manipulações realizadas para o posicionamento do inovulador no terço final do corno uterino, 10 (45,4%) foram classificadas com

escore 1 de dificuldade (procedimento facilmente realizado), 8 (36,4%) foram classificadas com escore 2 (dificuldade média) e 4 (18,2%) manipulações foram classificadas com escore 3 (grande dificuldade).

5.2.3. Volume do CL

Os resultados referentes ao volume dos corpos lúteos durante o período do D7 a D18 da fase luteal observados durante os exames ultrassonográficos estão apresentados na tabela 3 e figura 2 abaixo.

Tabela 3 – Volume médio do corpo lúteo (cm³) durante a fase luteal (D7 a D18) dos animais dos diferentes grupos experimentais (Grupo 1 – animais controle; Grupo 2 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo no D7; Grupo 3 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo e tratados com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no D7) (média ± desvio padrão).

Grupos	N	Volume do corpo lúteo (cm ³)								
		D7	D9	D11	D13	D14	D15	D16	D17	D18
G1 - Controle	7	2,04 ± 0,53 ^a	2,07 ± 0,47 ^a	1,98 ± 0,44 ^a	1,93 ± 0,33 ^a	1,95 ± 0,43 ^a	1,84 ± 0,51 ^{ab}	1,77 ± 0,38 ^{ab}	1,65 ± 0,29 ^b	1,51 ± 0,22 ^b
G2 - Manipulação	8	2,14 ± 0,37 ^c	2,16 ± 0,39 ^c	1,93 ± 0,33 ^c	1,98 ± 0,33 ^c	1,83 ± 0,39 ^{cd}	1,72 ± 0,43 ^{cd}	1,74 ± 0,41 ^{cd}	1,62 ± 0,36 ^d	1,43 ± 0,20 ^d
G3 - Manip. + FM	7	2,21 ± 0,58 ^e	2,03 ± 0,40 ^e	1,89 ± 0,37 ^e	1,82 ± 0,36 ^e	1,77 ± 0,37 ^{ef}	1,69 ± 0,32 ^{ef}	1,57 ± 0,28 ^f	1,48 ± 0,31 ^f	1,33 ± 0,39 ^f

^{a b c d e f} Valores com diferentes sobrescritos na mesma linha diferem significativamente (p < 0,05).

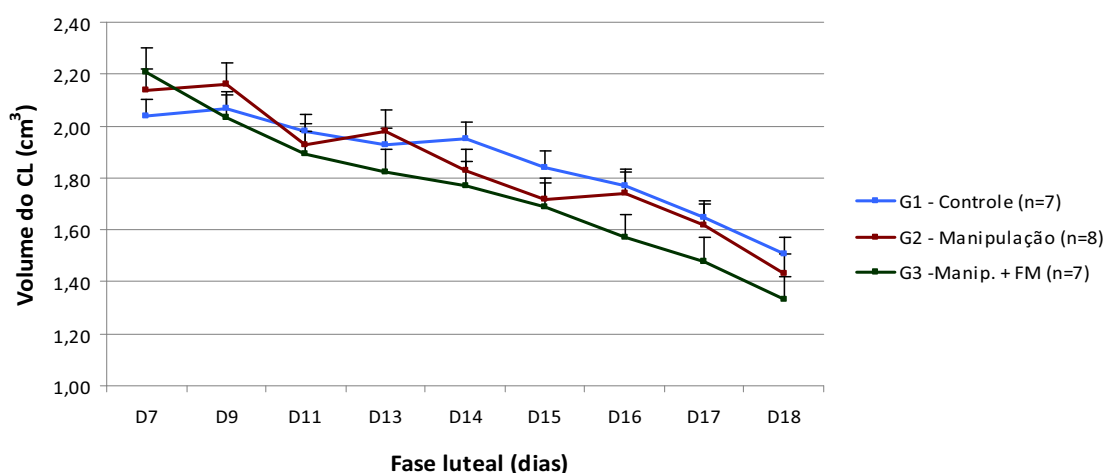


Figura 2 – Volume do corpo lúteo (cm³) durante a fase luteal (D7 a D18) dos animais dos diferentes grupos experimentais (Grupo 1 – animais controle; Grupo 2 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo no D7; Grupo 3 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo e tratados com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no D7) (p > 0,05).

Não foi observada diferença estatística entre as médias do volume dos corpos lúteos dos diferentes grupos experimentais ao longo da fase luteal (D7 a D18) ($p > 0,05$). Em torno do sétimo dia (D7) ao nono dia (D9) do ciclo estral foi observado em todos os grupos experimentais o maior volume médio dos corpos lúteos sendo que, a partir desse período foi observada diminuição gradativa do volume dos corpos lúteos durante o restante da fase luteal. Além disso, em todos os grupos foi observada diferença estatística na média do volume dos corpos lúteos no D7 em relação à média do volume dos corpos lúteos no D17 e D18 ($p < 0,05$).

Diversos estudos relataram aumento gradativo do volume do CL até aproximadamente o 6º e 9º dias após a ovulação (KASTELIC et al., 1990; GRYGAR et al., 1997; VIANA et al., 2000; ACOSTA et al., 2003; BORGES et al., 2003; SARTORI et al., 2004a). Esse aumento ocorre devido ao desenvolvimento normal do CL, apresentando atividade angiogênica intensa, sendo que, durante esse período ocorre aumento significativo na capacidade do CL em secretar P_4 . Além disso, Kastelic et al. (1990) e Grygar et al. (1997) também observaram diminuição gradativa no volume do CL no período final do ciclo estral, sendo que, Kastelic et al. (1990) observaram diminuição significativa no volume do CL de novilhas holandesas a partir do intervalo entre o 14º e o 16º dia do ciclo estral. Porém, Sartori et al. (2004a) somente observaram uma queda acentuada no volume do CL de 14 vacas holandesas em lactação em torno de 24 horas antes do momento da luteólise (D 19). Já em 27 novilhas holandesas essa diminuição no volume do CL somente foi observada a partir do momento da luteólise funcional do CL (D 18,5).

5.2.4. Concentração plasmática de progesterona

Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores médios para as concentrações plasmáticas de P_4 durante o período correspondente ao D7 até o final da fase luteal (D7 a D19) entre o grupo controle (G1) e o grupo de animais que foram submetidos à manipulação do trato reprodutivo no D7 (G2), sendo que, o último apresentou valor médio durante o período significativamente menor ($p = 0,018$). Já o valor médio das concentrações plasmáticas de P_4 dos animais do grupo 3 (manipulação + FM) não diferiu do

valor médio de P₄ observado no grupo controle durante o mesmo período (G1) ($p > 0,05$). Porém quando comparado ao grupo 2 (manipulação), o grupo 3 (manipulação + FM) assim como o grupo controle (G1), também apresentou valor médio para as concentrações plasmáticas de P₄ durante o intervalo entre D7 a D19 significativamente maior ($p = 0,015$). Os resultados referentes às concentrações plasmáticas de P₄ durante o período do D7 a D19 da fase luteal entre os diferentes grupos experimentais estão apresentados na tabela 4 e figura 3 abaixo.

Tabela 4 – Valores médios para as concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) ao decorrer da fase luteal (D7 a D18) dos animais dos diferentes grupos experimentais (Grupo 1 – animais controle; Grupo 2 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo no D7; Grupo 3 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo e tratados com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no D7) (média $\pm$ erro padrão).

Dias	Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL)		
	G1: Controle (n=7)	G2: Manipulação (n=8)	G3: Manip. +FM (n=7)
D7	4,09 $\pm$ 0,40 ^a	4,37 $\pm$ 0,36 ^a	3,98 $\pm$ 0,23 ^a
D9	4,24 $\pm$ 0,30 ^b	4,34 $\pm$ 0,35 ^b	4,11 $\pm$ 0,15 ^b
D11	4,34 $\pm$ 0,33 ^c	3,85 $\pm$ 0,60 ^c	4,42 $\pm$ 0,38 ^c
D13	4,98 $\pm$ 0,37 ^d	3,91 $\pm$ 0,78 ^e	4,65 $\pm$ 0,61 ^d
D14	5,85 $\pm$ 0,38 ^f	4,11 $\pm$ 0,89 ^g	5,26 $\pm$ 1,03 ^f
D15	5,14 $\pm$ 0,22 ^h	4,03 $\pm$ 0,82 ⁱ	5,41 $\pm$ 0,74 ^h
D16	4,70 $\pm$ 0,32 ^j	3,64 $\pm$ 0,76 ^k	5,23 $\pm$ 0,68 ^j
D17	3,60 $\pm$ 0,56 ^l	2,74 $\pm$ 0,57 ^m	3,83 $\pm$ 0,59 ^l
D18	1,81 $\pm$ 0,50 ⁿ	1,61 $\pm$ 0,38 ⁿ	2,12 $\pm$ 0,41 ⁿ
D19	0,83 $\pm$ 0,17 ^o	0,64 $\pm$ 0,16 ^o	0,90 $\pm$ 0,17 ^o

a b c d e f g h i j k l m n o
Valores com diferentes sobrescritos na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).

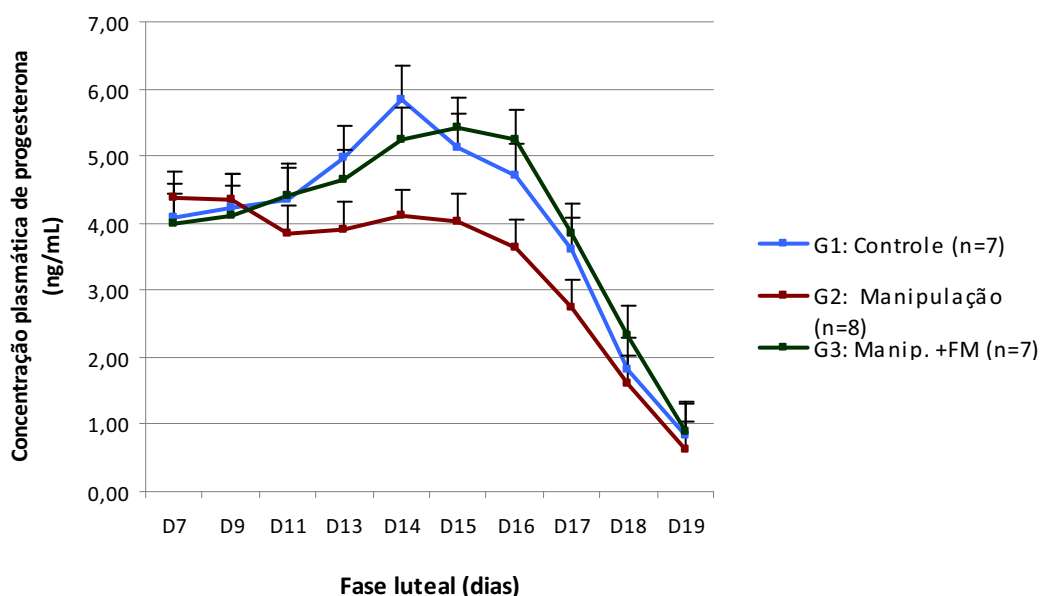


Figura 3 – Valores médios para as concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) ao longo do ciclo estral (D7 a D19) entre os diferentes grupos experimentais (Grupo 1 – animais controle; Grupo 2 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo no D7; Grupo 3 – animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo e tratados com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no D7) ($p < 0,05$).

Quando os valores médios para as concentrações plasmáticas de P_4 dos diferentes grupos experimentais são comparados diariamente, é observada diferença entre os grupos 1 e 3 (controle e manipulação + FM) em relação ao grupo 2 (manipulação) nos dias 13, 14, 15, 16 e 17 do ciclo estral (D13, D14, D15, D16 e D17), sendo que, os valores médios para as concentrações plasmáticas de P_4 do grupo 1 e 3 são maiores durante esses dias quando comparados aos valores médios do grupo 2 ($G1 = G3 > G2$) (Tabela 4; $p < 0,05$).

Estudos avaliaram o efeito da manipulação do trato reprodutivo sobre a liberação de $PGF_{2\alpha}$, seja através das concentrações de PGFM (WANN & RANDEL, 1990), seja por meio da avaliação direta de $PGF_{2\alpha}$ através da canulação da veia safena e coletas sucessivas de sangue (SCENNA et al., 2005). Em ambos os estudos foi identificado que a manipulação do trato reprodutivo de fêmeas bovinas resulta em liberação de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio. Além disso, Scenna et al. (2005) identificaram um padrão pulsátil de liberação de $PGF_{2\alpha}$ após a manipulação, de forma muito similar ao padrão de liberação de $PGF_{2\alpha}$ no momento da luteólise.

Seals et al. (1998) observaram que vacas que apresentavam CL e foram submetidas a aplicações de análogos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a partir do 5º dia do ciclo estral tiveram concentrações de PGFM superiores aos animais que receberam a mesma quantidade de $\text{PGF}_{2\alpha}$, porém, previamente haviam sido submetidos à remoção mecânica do CL. Assim os autores sugeriram que a administração de pequenas quantidades de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode desencadear liberação de OT pelo CL que por sua vez, estimularia maior liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio. Ou mesmo, segundo relatado por Diaz et al. (2002), essa maior concentração de PGFM em animais que apresentam CL quando expostos a administração de análogos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode ser devido a própria secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelas células luteais.

Portanto, apesar de não ter sido quantificada no presente estudo, é provável que tenha ocorrido uma liberação significativa de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio dos animais que foram submetidos à manipulação do trato reprodutivo no experimento 2. Diversos fatores dão sustentação a essa hipótese, tais como: a falta de experiência do inovulador, alta incidência de animais que apresentaram escore de dificuldade de inovulação 2 e 3 (dificuldade média e dificuldade alta, respectivamente; 54,6% - 12/22) e a inexistência de seleção prévia dos animais em relação a anatomia da cervix e útero. Portanto, de forma contrária à observada no experimento 1, diversos fatores sugerem que tenha ocorrido liberação mais acentuada de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio dos animais submetidos a manipulação do trato reprodutivo no experimento 2.

Os animais do grupo controle (G1) apresentaram o maior valor médio para as concentrações plasmáticas de P_4 durante o ciclo estral no dia 14 do ciclo (5,85 mg/mL), sendo que no intervalo entre o D7 e o D14 houve aumento gradativo nos valores médios de P_4 e, a partir do dia 14 houve diminuição diária nos valores médios de P_4 até atingirem seu menor valor no D19 (0,83 mg/mL). As curvas das concentrações plasmáticas de P_4 de cada animal do grupo controle (G1) estão apresentadas na figura 4 abaixo.

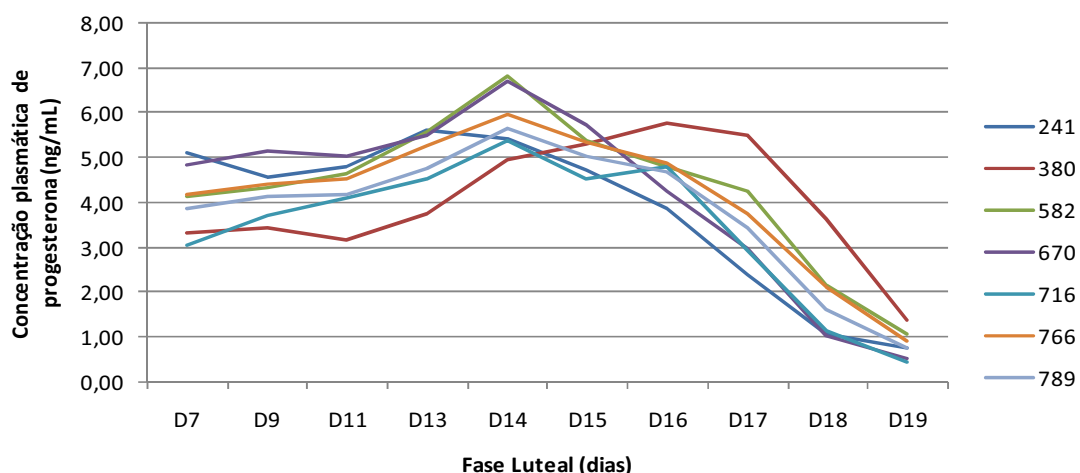


Figura 4 – Valores individuais das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) ao longo do ciclo estral (D7 a D19) das fêmeas bovinas pertencentes ao grupo controle (Grupo 1).

No grupo submetido à manipulação do trato reprodutivo similar a inovulação de embrião no D7 (Grupo 2) o maior valor médio para as concentrações plasmáticas de P_4 durante o ciclo estral foi observado no próprio D7 do ciclo estral, sendo que a partir do D9 do ciclo os valores médios de P_4 diminuem até o 11º dia do ciclo estral. A partir do 13º dia há discreto aumento nos valores médios de P_4 até o 14º dia e a partir de então ocorre uma queda diária nos valores médios de P_4 até o 19º dia do ciclo. Avaliando individualmente os animais do grupo 2, quatro fêmeas (329, 655, 783 e 792) apresentaram perfil plasmático de P_4 muito similar ao observado nos animais do grupo controle (G1), porém, quatro fêmeas (448, 478, 762 e 788) apresentaram queda nas concentrações plasmáticas de P_4 no período que sucedeu a manipulação do D7, sendo que 3 dessas fêmeas (448, 478 e 788) apresentaram leve aumento nas concentrações de P_4 posteriormente e uma fêmea (762) apresentou queda diária nas concentrações de P_4 atingindo níveis plasmáticos inferiores a 1ng/mL no 16º dia do ciclo estral. As concentrações plasmáticas de P_4 de cada animal do grupo submetido a manipulação do trato reprodutivo (G2) estão apresentadas na figura 5 abaixo.

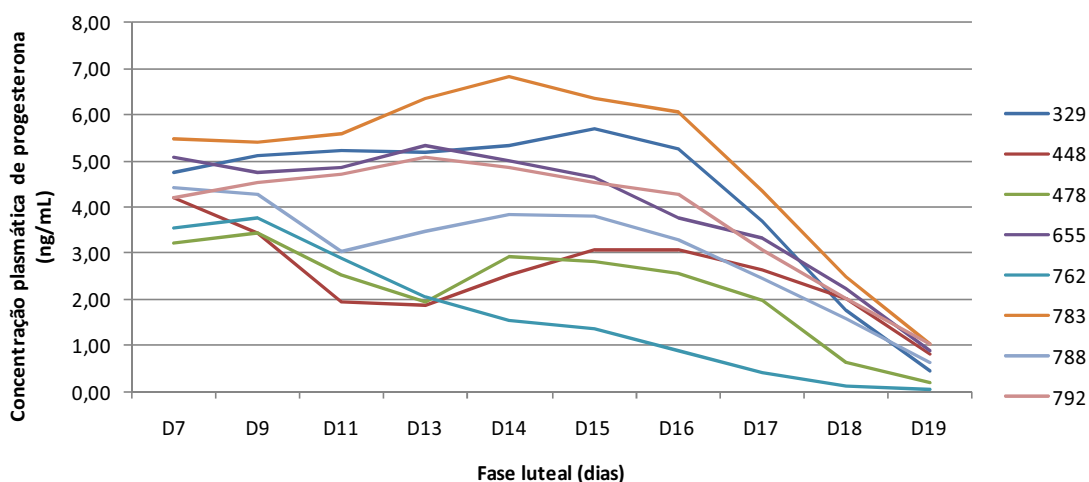


Figura 5 – Valores individuais das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) ao longo do ciclo estral (D7 a D19) dos animais pertencentes ao grupo de animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo no D7 do ciclo estral (Grupo 2).

Schramm et al. (1983) avaliaram o efeito da administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em diferentes frequências e concentrações sobre a funcionalidade do CL em ovelhas. Os autores observaram que eram necessários pelo menos cinco pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em um período de 25 horas ou menos para que ocorresse luteólise permanente na maior parte dos animais, porém, os autores relataram que alguns animais que foram submetidos a um menor número de pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ apresentaram regressão permanente do CL. Além disso, ao avaliar o efeito de somente um pulso diário de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre a funcionalidade do CL, os autores notaram que de forma semelhante ao observado no presente estudo, ocorreu queda significativa nas concentrações plasmáticas de P_4 , que foi seguida posteriormente por retomada no perfil de secreção de P_4 . Assim, os autores concluíram que um único pulso diário de $\text{PGF}_{2\alpha}$ não foi capaz de induzir a regressão do CL, porém interferiu significativamente no perfil plasmático de P_4 .

Portanto, é provável que a manipulação uterina realizada nas fêmeas bovinas do grupo 2 tenha desencadeado liberação pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio, que por sua vez, acarretou em queda temporária na capacidade do CL em produzir P_4 em três animais (37,5%), e estimulou um processo de regressão prematura do CL em uma fêmea (12,5%).

O grupo 3, constituído de animais que foram submetidos à manipulação do trato reprodutivo e uma administração de FM no D7 do ciclo estral, apresentou o maior valor médio para as concentrações plasmáticas de P_4 durante o ciclo estral no 15º dia do ciclo (5,41ng/ mL). Os valores médios para as concentrações plasmáticas de P_4 do grupo 3 apresentaram similaridade ao longo do ciclo estral em relação aos valores médios observados no grupo controle (grupo1) como pode ser observado na figura 3. Individualmente, cinco fêmeas (274, 542, 688, 864 e 872) do grupo 3 apresentaram perfil de liberação de P_4 durante o ciclo estral muito semelhante ao observado nos animais do grupo controle, porém, dois animais (438 e 886) apresentaram concentrações plasmáticas de P_4 muito inferiores quando comparadas aos valores médios do grupo (figura 6).

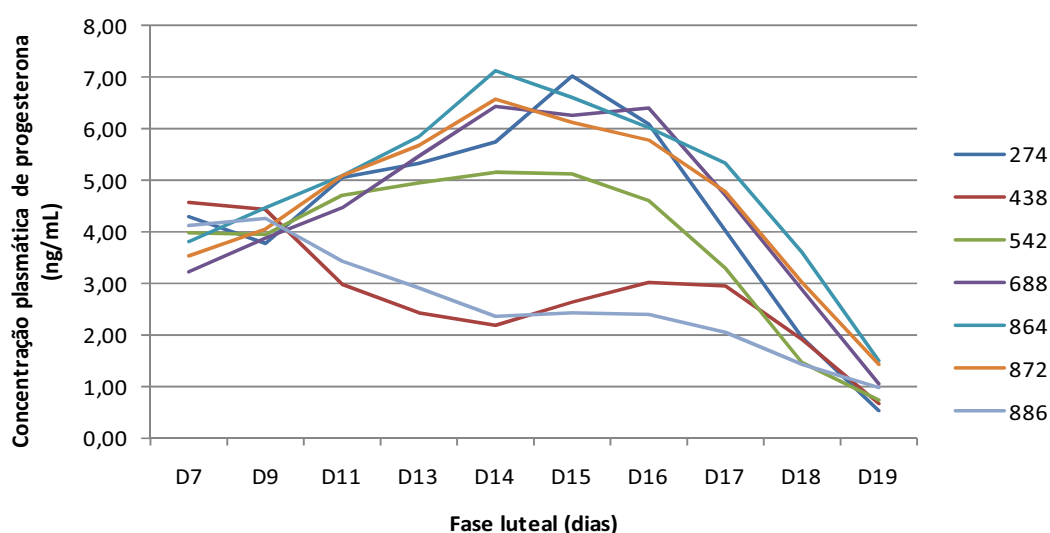


Figura 6 – Valores individuais das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) ao longo do ciclo estral (D7 a D19) dos animais pertencentes ao grupo de animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo e tratados com 1,1 mg/kg de flunixin meglumine no D7 do ciclo estral (Grupo 3).

Assim como relatado em diversos estudos citados no presente trabalho (ELLI et al., 2001; SCHRICK et al., 2001; PUGH et al., 2004; SCENNA et al., 2005) a administração de AINEs foi parcialmente efetiva em bloquear a síntese de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio de fêmeas bovinas causada pela manipulação do trato reprodutivo no momento da transferência do embrião. No entanto, duas fêmeas apresentaram queda nos valores das concentrações plasmáticas de P_4

após a manipulação, de forma similar a observada em alguns animais do grupo 2, indicando que por alguma razão específica a administração de FM não foi efetiva em bloquear a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio nesses animais.

Embora a $\text{PGF}_{2\alpha}$ não tenha sido quantificada no presente estudo, o fato dos animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo terem apresentado valores médios das concentrações plasmáticas de P_4 inferiores aos valores observados nos animais do grupo controle e, os animais submetidos à manipulação do trato reprodutivo associada à administração de FM não apresentarem valores médios para as concentrações de P_4 diferentes estatisticamente dos valores observados no grupo controle sugere que nas condições em que foi realizado o experimento 2 a manipulação do trato reprodutivo das fêmeas bovinas estimulou à liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio desses animais e que, a administração do FM no momento da manipulação foi efetiva em bloquear essa síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ na maior parte dos animais.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e nas condições nas quais foram realizados os experimentos pode-se concluir que:

Experimento 1 – Efeito do flunixin meglumine sobre a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos

- A administração de flunixin meglumine no momento da inovulação de embriões produzidos *in vitro* não foi efetiva em aumentar a taxa de prenhez de receptoras bovinas.

Experimento 2 - Efeito do flunixin meglumine sobre as características da fase luteal de fêmeas bovinas

- A manipulação do trato reprodutivo de fêmeas bovinas no momento da transferência de embriões não alterou a duração do ciclo estral desses animais, porém, diminuiu as concentrações plasmáticas de P_4 ao longo da fase luteal.
- A administração de flunixin meglumine no momento da manipulação do trato reprodutivo foi efetiva em inibir esse efeito deletério da manipulação sobre as concentrações plasmáticas de P_4 .

Considerações Finais

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme citado na revisão de literatura do presente trabalho, foi identificado que durante a manipulação do trato reprodutivo de receptoras bovinas no momento da inovulação de embriões ocorre uma liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode potencialmente comprometer a taxa de prenhez desses animais afetando diretamente o desenvolvimento embrionário ou mesmo por comprometer a funcionalidade do CL, assim como foi observado no experimento 2 onde foi demonstrado um efeito negativo da manipulação sobre o perfil plasmático de progesterona.

No entanto, na literatura são encontrados diversos estudos avaliando o efeito de inibidores da síntese de prostaglandina sobre a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos onde foram relatados resultados muito distintos. Portanto, provavelmente alguns fatores são determinantes para o sucesso dessa estratégia que visa utilizar esses inibidores para aumentar a taxa de prenhez de receptoras.

A partir dos dados obtidos no presente estudo e de estudos disponíveis na literatura pode-se concluir que provavelmente a utilização de AINEs terá um maior potencial em aumentar a taxa de prenhez de receptoras bovinas em situações onde ocorra uma maior liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio, como por exemplo, na falta de experiência do técnico que realiza as inovulações e na inexistência de uma seleção prévia dos animais, ou então em situações onde os embriões utilizados são mais suscetíveis aos efeitos deletérios da $\text{PGF}_{2\alpha}$, como por exemplo, na utilização de embriões de baixa qualidade ou embriões submetidos ao processo de criopreservação. No entanto, é necessário o desenvolvimento de novos estudos que visem avaliar a real influência de cada um desses fatores sobre a eficácia dessa estratégia.

Assim, futuramente será possível direcionar o tratamento de receptoras de embriões bovinos com AINEs para as situações onde haja uma maior probabilidade de sucesso.

Referências

8. REFERÊNCIAS

ACOSTA, T.J.; HAYASHI, K.G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*, v. 125, p. 759-767, 2003.

ADAMS, G. P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 54, p. 17-32, 1999.

AMBROSE, J.D.; PIRES, M.F.A.; MOREIRA, F.; DIAZ, T.; BINELLI, M.; THATCHER, W.W. Influence of Deslorelin (GnRH-agonist) implant on plasma progesterone, first wave dominant follicle and pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, v. 50, p. 1157-1170, 1998.

ARNOLD, D.R.; BINELLI, M.; VONK, J.; ALEXENKO, A.P.; DROST, M.; WILCOX, C.J.; THATCHER, W.W. Intracellular regulation of endometrial PGF_{2α} and PGE₂ production in dairy cows during early pregnancy and following treatment with recombinant interferon-τ. *Domestic Animals Endocrinology*, v. 18, p.199-216, 2000.

AROSH, J.A.; PARENT, J.; CHAPDELAINE, P.; SIROIS, J.; FORTIER, M.A.; Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 161-169, 2002.

AROSH, J. A.; BANU, S.K.; CHAPDELAINE, P.; MADORE, E.; SIROIS, J.; FORTIER, M.A. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: A basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology*, v. 145, p. 2551-2560, 2004.

ÁVILA PIRES, M.F.; ALVES, N.G.; SILVA FILHO, J.M.; CAMARGO, L.S.A.; VERNEQUE, R.S. Comportamento de vacas raça Gir (*Bos taurus indicus*) em estro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, p. 187-196, 2003.

BARTOL, F.F.; ROBERTS, R.M.; BAZER, F.W.; LEWIS, G.S.; GODKIN, J.D.; THATCHER, W.W. Characterization of proteins produced in vitro by

periattachment bovine conceptuses. *Biology of Reproduction*, v. 32, p. 681-693, 1985.

BEAL, W.E.; HINSHAW, R.H.; WHITMAN, S.S. Evaluating embryo freezing method and the site of embryo deposition on pregnancy rate in bovine embryo transfer. *Theriogenology*, v. 49, p. 241, 1998.

BERTAN, C.M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E.H.; TRALDI, A.S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação de corpo lúteo e na luteólise – revisão de literatura. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 43, p. 824-840, 2006.

BINELLI, M.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; ARNOLD, D.R.; SIROIS, J.; HANSEN, T.R.; THATCHER, W.W. Interferon- τ modulates phorbol ester-induced production of prostaglandin and expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase A2 from bovine endometrial cells. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 417 (abstract), 2000.

BINELLI, M.; THATCHER, W.W.; MATOS, R.; BARUSELLI, P.S.; Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*, v. 52, p. 1451-1463, 2001.

BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; JÚNIOR, V.R.R.; CARVALHO, G.R.; FONSECA, J.F.; MARCATTI NETO, A.; ASSIS, A.J. Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, p. 85-92, 2003.

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, v. 27, p. 147-158, 1982.

BREUEL, K. F.; FUKUDA, A.; SCHRICK, F.N. Effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on development of 8-cell rat embryos in vitro. *Biology of Reproduction*, v. 48, p. 173 (abstract), 1993.

BULMAN, D.C.; LAMMING, G.E. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factory influencing acyclicity in dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 54, p. 447-458, 1978.

CARROLL, D.J.; JERRED, M.J.; GRUMMER, R.R.; COMBS, D.K.; PEIRSON, R.A., HAUSER, E.R. Effects of fat supplementation and immature alfalfa to concentrate ratio on plasma progesterone, energy balance and reproductive traits of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 2855-2863, 1990.

CERRI, R.L.A.; BRUNO, R.; CHEBEL, R.C.; GALVÃO, K.N.; RUTGLIANO, H.; THATCHER, W.W.; LUCHINI, D.; SANTOS, J.E.P. Effect of source of fatty acids on fertilization rate and embryo quality in early postpartum high producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 297 (Abstract), 2004.

Committee on Bovine Reproductive Nomenclature, Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell Veterinary*, v. 62, p. 216-237, 1972.

COYNE, G.S.; KENNY, D.A.; CHILDS, S.; SREENAN, J.M.; WATERS, S.M. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids alter the expression of genes involved in prostaglandin biosynthesis in the bovine uterus. *Theriogenology*, v. 70, p. 772-782, 2008.

DIAZ, F.J.; ANDERSON, L.E., WU, Y.L.; RABOT, A.; TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C. Regulation of progesterone and prostaglandin F_{2α} production in the CL. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 191, p. 65-80, 2002.

DINCHUCK, J.E.; CAR, B.D.; FOCHT, R.J. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase-2. *Nature*, v. 378, p. 406-410, 1995.

DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *Journal Reproduction and Fertility*, v. 59, p. 463-68, 1980.

DISKIN, M.G.; MURPHY, J.J.; SREENAN, J.M.; Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal Reproduction Science*, v. 96, p. 297-311, 2006.

DONALDSON, L.E. Matching of embryo stages and grades with recipient oestrus synchrony in bovine embryo transfer. *Veterinary Records*, v. 117, p. 489 (Abstract), 1985.

DUBY, R.T.; HILL, J.L.; O'CALLAGHAN, D.; OVERSTROM, E.W.; BOLAND, M.P. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology*, v. 47, p. 332 (abstract), 1997.

DUNNE, L.D.; DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Embryo and fetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Animal Reproduction Science*, v. 58, p. 39-44, 2000.

DURAS, M.; MLYNARCZUK, J.; KOTWICA, J. Non-genomic effect of steroids on ocitocin-stimulated intracellular mobilization of calcium and on prostaglandin $F_{2\alpha}$ and E_2 secretion from bovine endometrium cells. *Prostaglandins & other Lipidis Mediators*, v. 76, p. 105-116, 2005.

ELLI, M.; GAFFURI, B.; FRIGERIO, A.; ZANARDELLI, M.; COVINI, D.; CANDIANI, M.; VIGNALI, M. Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. *Reproduction*, v. 121, p. 151-154, 2001.

FARIN, P.W.; CROSIER, A.E.; FARIN, C.E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, v. 55, p. 151-170, 2001.

FERGUSON, J. K. W. A study of the motility of intact uterus at term. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, v. 73, p. 359-366, 1941.

FERNANDES, C.A.C.; FIGUEIREDO, A.C.S.; OLIVEIRA, E.R.; VASCONCELOS, T.D.; ALVES, B.F.L.; GIOSO, M.M.; VIANA, J.H.M.; OBA, E. Eficiência de detecção de estros em receptoras de embrião sincronizadas com cloprostenol. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p. 494 (resumo), 2006.

GODKIN, J.D.; BAZER, F.W.; ROBERTS, R.M. Ovine trophoblast protein-1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein synthesis. *Endocrinology*, v. 114, p. 120-130, 1984.

GRYGAR, I.; KUDLÁČ, E.; DOLEZEL, R.; NEDBÁLKOVÁ, J. Volume of luteal tissue and concentration of serum progesterone in cows bearing homogenous corpus luteum or corpus luteum with cavity. *Animal Reproduction Science*, v.49, p. 77-82, 1997.

HACKETT, A.J.; DURNFORD, R.; MAPLETOFT, R.J.; MARCUS, G.J. Location and status of embryos in the genital tract of superovulated cows 4 to 6 days after superovulation. *Theriogenology*, v.40, p.1147-1153, 1993.

HARDIN, D.R.; WARNICK, A.C.; FIELDS, M.J. Artificial insemination of subtropical commercial beef cattle following synchronization with cloprostenol: Estrous response. *Theriogenology*, v.14, p. 259 (abstract), 1980.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, v. 43, p. 141-152, 1995.

HASLER, J.F. In vitro culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 81-91, 2000.

HASLER, J.F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, v. 56, p. 1401–1415, 2001.

HAWK, H.W.; TANABE, T.Y. Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single-ovulating cattle. *Journal of Animal Science*, v. 63, p. 551-560, 1986.

HAWKINS, D.E.; NISWENDER, K.D.; OSS, G.M.; MOELLER, C.L.; ODDE, K.G.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters disappearance rate of progesterone in cows. *Journal of Animal Science*, v. 73, p. 541-545, 1995.

HELMER, S.D.; HANSEN, P.J.; THATCHER, W.W.; JOHNSON, J.W.; BAZER, F.W. Intrauterine infusion of highly enriched bovine trophoblast protein-1 complex exerts an antiluteolytic effect to extend corpus luteum lifespan in cyclic cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 87, p. 89-101, 1989.

HIXON, J.E.; HANSEL, W. Preferential transfer of prostaglandin $F_{2\alpha}$ to the ipsilateral ovarian artery following intrauterine administration in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 11, p. 543-552, 1974.

HIXON, J.E.; FLINT, A.P.F. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F-2alpha secretion in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 79, p. 457-467, 1987.

HOCKET, M.E.; ROHRBACH, N.R.; SCHRICK, F.N. Alterations in embryo development in progestogen-supplemented cows administered prostaglandin F_{2α}. *Prostaglandins and other Lipid Mediators*, v. 73, p. 227-236, 2004.

HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*, v. 59, p. 675-685, 2003.

HOUGHTON, P.L.; LEMENAGER, R.P.; HENDRIX, K.S.; MOSS, G.E.; STEWART, T.S. Effects of body composition, pre and postpartum energy intake and stage of production on energy utilization by beef cows. *Journal of Animal Science*, v. 68, p.1447-1456, 1990.

HOWARD, J.M.; MANZO, R.; DALTON, J.C.; FRAGO, F.; AHMADZADEH, A. Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 95, p. 224-233, 2006.

IMAKAWA, K.; ANTHONY, R.V.; KAZEMI, M.; MAROTTI, K.R.; POLITES, H.G.; ROBERTS, R.M. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoderm. *Nature*, v. 330, p. 377-379, 1987.

JENNER, L.J., PARKINSON, T.J., LAMMING, G.E. Uterine oxytocin receptors in cyclic and pregnant cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 91, p. 49-58, 1991.

KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, v. 33, p.1269-1278, 1990.

KASTELIC, J.P.; AMBROSE, J.D. 2004. Effects of modified OvSynch protocols, including presynchronization, and/or post-breeding pLH or hCG, on pregnancy rates in dairy cows. *In: Abstracts of the 15th International Congress on Animal Reproduction*, Porto Seguro, BA, Brazil. Porto Seguro, BA: ICAR. p. 334. (abstract), 2004.

KNICKERBOCKER, J.J.; THATCHER, W.W.; BAZER, F.W.; DROST, M.; BARRON, D.H.; FINCHER, K.B.; ROBERTS, R.M. Proteins secreted by day 16 to 18 bovine conceptuses extend corpus luteum function in cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 77, p. 381-391, 1986.

KUNKEL, R.N.; STRICKLIN, W.R. Donor-recipient asynchrony, stage of embryo development and the post-transfer survival of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 9, p. 96 (abstract), 1978.

KUNZ, T.L.; GAMBARINI, M.L.; OLIVEIRA-FILHO, B.D.; GALINDO, A.D.S. Mortalidade embrionária em bovinos: inter-relações embrião-patógenos. *Revista CFMV*, v. 8, p. 27-36, 2002.

LAFRANCE, M.; GOFF, A.K. Effects of progesterone and oestradiol-17 β on oxytocin-induced release of prostaglandin F_{2 α} . *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 82, p. 429-436, 1988.

LAMMING, G.E.; DARWASH, A.O.; BLACK, H.L. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 37, p. 245-252, 1989.

LAMMING, G.E.; WHATES, D.C.; FLINT, A.P.F.; PAYNE, J.H.; STEVENSON, K.R.; VALLET, J.L. Local actions of trophoblast interferons in suppression of the development of oxytocin and oestradiol receptors in ovine endometrium. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 105, p. 165-175, 1995.

LAMMING, G.E.; MANN, G.E. A dual role for progesterone in the control of cyclicity in domestic ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 49, p. 561-566, 1995.

LEAMAN, D.W.; ROBERTS, R.M. Genes for the trophoblast interferons in sheep, goat and musk ox, and distribution of related genes among mammals. *J Interferon Res*, v.12, p.1-11, 1994.

L'HARIDON, R.M.; HUYNH, L.; ASSAL, N.E.; MARTAL, J. A single intrauterine infusion of sustained recombinant ovine interferon-tau extends corpus luteum lifespan in cyclic ewes. *Theriogenology*, v. 43, p. 1031-1045, 1995.

LI, J.; ROBERTS, R.M. Interferon- τ and interferon- α interact with the same receptors in uterine endometrium: use of readily iodinated form of recombinant interferon- τ for binding studies. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 13544-13550, 1994.

MACHADO, R. A remoção farmacológica do folículo dominante como estratégia anti-luteolítica em bovinos. *Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo*, São Paulo, 198f, 2005.

MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M.A.C.M.; BARBOSA, R.T.; OLIVEIRA, C.A.; BINELLI, M. Ovarian function in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows after post-ovulation hormone treatments. *Theriogenology*, v. 69, p. 798-804, 2008.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Use of repeated biopsies to monitor endometrial oxytocin receptors in the cow. *Veterinary Records*, v. 135, p. 403-405, 1994.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E.; ROBINSON, R.S.; WATHES, D.C. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 54, p. 317-328, 1999.

MANN, G.E. Conception rates during experimentation in dairy cows. *The Veterinary Journal*, v.161, p. 301-305, 2001.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Relationship between the maternal endocrine environment, early embryo development and the inhibition of the luteolytic mechanisms in the cow. *Reproduction*, v. 121, p. 175-180, 2001.

MARQUES, M.O. Ultrasonografia ovariana, concentração plasmática de progesterona e taxa de concepção em novilhas receptoras de embrião Submetidas a Diferentes Tratamentos no Dia 7 do Ciclo Estral. São Paulo, SP: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. *Dissertação (mestrado)*, 2002.

MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; OLIVEIRA, C.A.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Ovarian ultrasonography and plasma progesterone concentration in *Bos taurus* X *Bos indicus* heifers administered different treatments on day 7 of the estrous cycle. *Theriogenology*, v. 57, p. 548 (abstract), 2002.

MARQUES, V.B.; BERTAN, C.M.; ALMEIDA, A.B.; MEIRELLES, F.V.; PAPA, P.C.; BINELLI, M. Interferon-tau e o reconhecimento materno da gestação em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 479-488, 2007.

MARTAL, J., LACROIX, M.C.; LOUDES, C.; SAUNIER, M.; WINTENBERGER-TORRES, S. Trophoblastin, an anti-luteolytic protein present in early pregnancy in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 56, p. 63-73, 1979.

MARTIN, I.; COSTA, I.B.; MACHADO, M.F.; CASTILHO, A.C.S.; VETORATTO, L.F.; BURATINI JR., J.; OBA, E.; FERREIRA, J.C.P. Expressão gênica do receptor de ocitocina no endométrio de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o ciclo estral. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p. 329 (resumo), 2006.

MATTOS, R.; STAPLES, C.R.; WILLIAMS, J.; AMOROCHO, A.; MCGUIRE, M.A.; THATCHER, W.W. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of Menhaden fish meal. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 755-764, 2002.

MAURER, P. R.; BEIER, H.M. Uterine proteins and development in vitro of rabbit preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 48, p. 33-41, 1976.

MCCRACKEN, J. A.; BARCIKOWSKI, B.; CARLSON, J.C.; GREEN, K.; SAMUELSSON, B. The physiological role of prostaglandin F_{2α} in corpus luteum regression. *Advances in the biosciences*, v. 9, p. 599 (abstract) 1973.

MCCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews*, v. 79, p. 263-323, 1999.

MEYER, M.D.; HANSEN, P.J.; THATCHER, W.W.; DROST, M.; BADINGA, L.; ROBERTS, R.M.; LI, J.; OTT, T.L.; BAZER, F.W. Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin F_{2α} of cows in response to recombinant interferon-tau. *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 1921-1931, 1995.

MIHM, M.; CURRAN, N.; HYTELL, P.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F.; Resumption of meiosis in cattle oocytes from pre-ovulatory follicles with a short

and long duration of dominance. *Journal of Reproduction and Fertility*, Abstr Ser n. 36, p.13-14, 1994.

MILVAE, R.A.; HINCKLEY, S.T.; CARLSON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, v. 45, p. 1327-1349, 1996.

MONSON, R.; NORTHEY, D.L.; GOTTFREDSON, R.; PESCHEL, D.R.; RUTLEDGE, J.J.; SCHAEFER, D.M. Pregnancy rates of *in vitro* produced bovine embryos following nonsurgical transfer. *Theriogenology*, v. 37, p. 261 (abstract), 1992.

MOOR, R.M.; ROWSON, L.E.A. Influence of the embryo and uterus on luteal function in the sheep. *Nature*, v. 210, p. 522-523, 1964.

MOOR, R.M.; ROWSON, L.E.A. The corpus luteum of the sheep: functional relationship between the embryo and the corpus luteum. *Journal of Endocrinology*, v. 34, p. 233 (abstract), 1966.

MOURA, M.T.; MARQUES, M.O.; FRARE, J.; MADUREIRA, E.H.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Sincronização com Crestar e CIDR para inovulação de embriões bovinos em tempo fixo. 4º Simpósio Internacional de Reprodução Animal, 269 (resumo), 2001.

NEUVIANS, T.P.; PFAFFL, M.W.; BERISHA, B.; SCHAMS, D. The mRNA expression of the members of the IGF-system in bovine corpus luteum during induced luteolysis. *Domestical Animal Endocrinology*, v. 25, p. 359-372, 2003.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYSON, M.K.; MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, v. 80, p. 1-29, 2000.

ODENSVIK, K.; GUSTAFSSON, H.; KINDAHL, H. The effect on luteolysis by intensive oral administration of flunixin granules in heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 50, p. 35-44, 1998.

OLDICK, B. S.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W.; GYAWU, P. Abomasal infusions of glucose and fat effect on digestion, production, and ovarian and uterine functions of cows. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p.1315-1328, 1997.

OTT, T.L.; VAN HEEKE, G.; HOSTETLER, C.E.; SCHALUE, T.K.; OLMSTED, J.J.; JOHNSON, H.M.; BAZER, F.W. Intrauterine injection of recombinant ovine interferon-tau extends the interestrous interval in sheep. *Theriogenology*, v. 4, p. 757-769, 1993.

PETERS, A.R. Embryo mortality in the cow. *Animal Breeding Abstracts*, v. 64, p. 587-598, 1996.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonography for detection on pregnancy and study of embryonic development in heifers. *Theriogenology*, v. 22, p. 225-233, 1984.

PUGH, M.L.; MOREIRA, M.B.; GILBERT, G.R.; YOUNGS, C.R. Influence of prostaglandin F_{2α} synthesis inhibitors on pregnancy rate of embryo transfer recipients heifers. *Anais do 15th International Congress on Animal Reproduction*, Porto Seguro, Brasil, p. 399 (resumo), 2004.

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, p. 867–878, 2005.

REESE, J.; BROWN, N.; PARIA, B.C.; MORROW, J.; DAY, S.K. COX-2 compensation in the uterus of COX-1 deficient mice during the pre-implantation period. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 150, p. 23-31, 1999.

REICHENBACH, H.D.; LIEBRICH, J.; BERG, U.; BREM, G. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 95, p. 363-370, 1992.

REIS, E.L.; NASSER, L.F.; NICHI, M.; BARUSELLI, P.S. Embryonic mortality in recipients (Bos indicus x Bos taurus) superovulated with eCG. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32, p. 198 (Abstract), 2004.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and

blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, p. 234-248, 2002.

ROBERTS, R.M.; LEAMAN, D.W.; CROSS, J.C. Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants. *Proceedings Soc Exp Biol Med*, v. 200, p. 7-18, 1992.

ROBINSON, R.S.; MANM, G.E.; LAMMING, G.E.; WHATES, D.C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*, v.122, p. 965-979, 2001.

ROWE, R.F.; DEL CAMPO, M.R.; CRISTER, J.K.; GINTHER, O.J. Embryo transfer in cattle: non-surgical transfer. *American Journal of Veterinary Research*, v. 41, p. 1024-1028, 1980.

RYAN, D.P.; PRICHARD, J.F.; KOPEL, E.; GODKE, R.A. Comparing early embryo mortality in dairy-cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology*, v. 39, p. 719-737, 1993.

SAACKE, R.G.; DEJARNETTE, J.M.; BAME, J.H.; KARABINUS, D.S.; WHITMAN, S.S. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? *Theriogenology*, v. 50, p. 117-128, 1998.

SANGSRITAVONG, S.; COMB, D.K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.E.; WILTBANK, M.C. High Feed Intake Increases Liver Blood Flow and Metabolism of Progesterone and Estradiol-17 β in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 2831-2842, 2002.

SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W.; POOL, L.; OVERTON, M.W. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance on high producing lactating Holstein cows. *Journal of Animal Science*, v. 79, p. 2881- 2894, 2001.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S.A.; GUENTHER, J.N.; PARRISH, J.J.; WILTBANK, M.C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 2803-2812, 2002.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 905-920, 2004a.

SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D.; GEIGER, L.N.; SCHENK, J.L.; WILTBANK, M.C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Animal Reproduction*, v.1, p. 86-90, 2004b.

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. 8, p. 38-45, 2005.

SCHALLENBERGER, E.; SCHAMS, D.; MEYER, H.H.D. Sequences of pituitary, ovarian, and uterine hormone secretion during the first 5 weeks of pregnancy in dairy cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 37, p. 277-286, 1989.

SCHMIDT M. Perinatal death associated with ET, IVP and cloning in cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 49, p.13, 2007.

SCHRAMM, W.; BOVAIRD, L.; GLEW, M.E.; SCHRAMM, G.; MCCracken, J.A. Corpus luteum regression induced by ultra-low pulses of prostaglandin F₂ alpha. *Prostaglandins*, v. 26, p. 347-364 (abstract), 1983.

SCHRICK, F. N.; HOCKETT, M.E.; TOWNS, T.M.; SAXTON, A.M.; WERT, N.E.; WEHRMAN, M.E. Administration of a prostaglandin inhibitor immediately prior to embryo transfer improves pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, v. 55, p. 370, 2001.

SCHRICK, F. N.; SCENNA, F.N.; EDWARDS, J.L.; HOCKETT, M.E.; SAXTON, A.M. More evidence for a direct interaction between prostaglandin F₂ α and development of bovine embryos. In: *Proceedings of Canadian Embryo transfer association and American Embryo Transfer Association Joint Annual Conference*, p. 43-52, Calgary, Alberta, 2003.

SEALS, R.C., LEMASTER, J.W., HOPKINS, F.M., SCHRICK, F.N. Effects of elevated concentration of prostaglandin F_{2α} on pregnancy rates in progestogen supplemented cattle. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, v. 56, p. 377-389, 1998.

SEN, G.C.; LENGYEL, P. The interferon system: a bird's eye view of biochemistry. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 5017-5020, 1992.

SILVIA, W.J.; LEWIS, G.S.; MCCracken, J.A.; THATCHER, W.W.; WILSON, L.JR. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F_{2α} during luteolysis in ruminants. *Biology of Reproduction*, v. 45, p. 655-663, 1991.

SPELL, A.R.; BEAL, W.E.; CORAH, L.R.; LAMB, G.C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, v.56, p. 287-297, 2001.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*, v.2, p. 49 (abstract), 2004.

SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. *Theriogenology*, v. 27, p. 99-113, 1987.

SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.; MORRIS, D.G. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. In: Fertility in the high producing dairy cow. 26 Occasional Publication Br Soc Anim Sci; 93-104, 2001.

STARBUCK, G.R.; DARWASH, A.O.; MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The detection and treatment of post insemination progesterone insufficiency in dairy cows. In: DISKIN, M.G., Fertility in the High Producing Dairy Cow. *BSAS Occasional Publication*, v.26, p.447-450, 2001.

STEVENSON, J.S.; PORTALUPPI, M.A.; TENHOUSE, D.E.; LLOYD, A.; EBORN, D.R.; KAKUBA, S.; DEJARNETTE, J.M. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropic-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 331- 340, 2007.

STEWART, W.E. The interferon system. New York: Springer-Verlag, 1979.

STRONGE, A.J.H.; SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.; MEE, J.F.; KENNY, D.A.; MORRIS, D.G. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*, v. 64, p. 1212-1224, 2005.

SUZUKI, T.; YAMAMOTO, M.; OOE, M.; NISHIKATA, Y.; OKAMOTO, K.; TSUKIHARA, K. Effect of media on fertilization and development rates of in vitro fertilized embryos, and of age and freezing of embryos on pregnancy rates. *Theriogenology*, v. 35, p. 278 (abstract), 1991.

THATCHER, W.W.; HANSEN, P.J. Systems to alter embryo survival. Large dairy herd management. *American Dairy Sciences Association*, p.16-30, 1992.

THATCHER, W. W.; STAPLES, C.R.; DANET-DESNOYERS, G.; OLDICK, B.; SCHMITT, E.P. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *Journal of Animal Science*, v. 72, p. 16-30, 1994.

THATCHER, W. W.; BINELLI, M.; BURKE, J.; STAPLES, C.R.; AMBROSE, J.D.; COELHO, S. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Theriogenology*, v. 47, p. 131-140, 1997.

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T.R.; PRU, J.K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology*, v. 56, p. 1435-1450, 2001.

VAN DER WIEDEN, R.M.; VERDIJK, R.M.; POELMANN, R.E.; HELMERHORST, F.M.; KEIRSE, M.J. The influence of indomethacin on the hatching of mouse blastocysts. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids*, v. 49, p. 683-686, 1993.

VANROOSE, G.; KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 131-143, 2000.

VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Bovine embryonic development after in vivo and in vitro fertilization. *Reproduction Domestic Animals*, v. 31, p. 261-265, 1998.

VAN WAGTENDONK, D.E.; LEEUW, A.M.; MULLAART, E.; DE ROOS, A.P.; MERTON, J.S.; DEN DAAS, J.H.; KEMP, B.; DE RUIGH, L. Effects of different

reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*, v. 53, p. 575-597, 2000.

VASCONCELOS, J.L.M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H.N.; GUENTHER, J.G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, v. 56, p. 307-314, 2001.

VASCONCELOS, J. L. M.; SANGSRITAVONG, S.; TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology*, v. 60, p. 795-807, 2003.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F. Follicular dynamics in Zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, p. 2501-2509, 2000.

XIAO, C.; GOFF, A.K. Hormonal regulation of estrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.115, p.101-109, 1999.

WANN, R. A.; RANDEL., R.D. Effect of uterine manipulation 35 days after parturition on plasma concentrations of 13, 14-dihydro-15-keto prostaglandin F2a in multiparous and primiparous Brahman cows. *Journal of Animal Science*, v. 68, p. 1389-1394, 1990.

WILTBANK, M.C., GUTHRIE, P.B., MATTSON, M.P., KATER, S.B., NISWANDER, G.D. Hormonal regulation of the free intracellular calcium concentrations in small and large ovine luteal cells. *Biology of Reproduction*, v. 41, p. 771-777, 1989.

Trabalhos Científicos

Resumo publicado em: II International Symposium on Animal Biology of Reproduction, São Paulo, Brazil. *Animal Reproduction*, vol. 6, p. 294, 2008.

Influence of flunixin meglumine at the time of embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows

R.C. Cardoso¹, E. Oba¹, B.L. Cardoso¹, B.F.L. Alves², E.R. Oliveira², C.A.C. Fernandes²⁻³

¹Department of Animal Reproduction and Radiology, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil. ²Biotran LTDA, Alfenas, MG, Brazil. ³University of Alfenas, MG, Brazil.

Introduction

The usage of advanced techniques such as artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) programs results in extraordinary improvement in genetic merit of dairy and beef cows. However, pregnancy rates associated with ET are generally lower than those using AI. The manipulation of the cow reproductive tract, during embryo transfer, has been shown to increase release of prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) into the uterine lumen (1, 2). Several studies have shown negative effects of $PGF_{2\alpha}$ on embryonic survival in beef cows (3, 4). Moreover, addition of $PGF_{2\alpha}$ to the culture medium has been shown to inhibit in vitro development of bovine embryos (5). The objective of this study was to determine whether administration of the prostaglandin inhibitor, flunixin meglumine (FM), immediately prior to embryo transfer would increase pregnancy rates in recipient cows.

Materials and Methods

Estrus (day = 0) was synchronized in crossbred cows ($n = 184$) by giving one injection of $PGF_{2\alpha}$ (500 μ g of cloprostenol, i.m.; Ciosin[®], Schering-Plough, Brazil) and a single in vitro produced embryo was transferred 6 to 8 days after estrus (day = 6-8). At the time of embryo transfer, animals were randomly assigned to receive either 1.1 mg/Kg of flunixin meglumine (i.m.; Flunixin Injetável[®], Chemitec Agro-Veterinária, Brazil) (FM; $n = 92$) or remain untreated (control; $n = 92$). Data collected at transfer included stage of embryo development, embryo quality and ease of transfer score (1-3; 1 = gun easily manipulated to the site of transfer, 3 = difficult). Pregnancy results were obtained 30 and 60 days following transfer by ultrasonography. The logistics procedures and chi-square analysis of SAS were used for data analysis.

Results and Discussion

Overall pregnancy rates did not differ ($P > 0.05$) between recipients receiving flunixin meglumine (44.6 %; 41/92) versus control recipients (40.2 %; 37/92). Stage of embryo development, embryo quality or ease of transfer score did not present any effect on pregnancy rates following embryo transfer ($P > 0.05$). Although not monitored in this study, there are preliminary evidences supporting the idea that manipulation of the cervix and uterus when performing embryo transfer does induce the release of $PGF_{2\alpha}$ from the uterus (1, 2). It is possible that cervical and uterine manipulation in these recipient cows did not result in significant production or release of $PGF_{2\alpha}$ from the

reproductive tract since the vast majority of the embryos were reported as being very easily transferred into the upper third of the uterine horn. In conclusion, administration of flunixin meglumine, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthesis inhibitor, at the time of embryo transfer did not increase the rate of pregnancy establishment in recipient cows under the conditions utilized in this experiment. Therefore, administration of flunixin meglumine to embryo recipient cows at the moment of embryo transfer may not be recommended.

References

(1) Wann RA, Randel RD. 1990. J Anim Sci, 68:1389–94. (2) Velez JS, Randel RD, Neuendorff DA. 1991. Theriogenology, 36:987–97. (3) Schrick FN, Inskeep EK, Butcher RL. 1993. Biol Reprod, 49:617–21. (4) Buford WI, Ahmad N, Schrick FN, Butcher RL, Lewis PE, Inskeep EK. 1996. Biol Reprod, 54:531–7. (5) Scenna FN, Edwards JL, Rohrbach NR, Hockett ME, Saxton AM, Schrick FN. 2004. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 73:215–26.

Acknowledgments: Chemitec Agro-Veterinária and Biotran LTDA.

Financial support: CAPES

E-mail: rodolfo.card@uol.com.br

Trabalho enviado para a revista: *Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB)*, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF.

Taxa de prenhez e características da fase luteal de receptoras de embriões bovinos tratadas com flunixin meglumine

Rodolfo de Carvalho Cardoso⁽¹⁾, Eunice Oba⁽¹⁾, Wolff Camargo Marques Filho⁽¹⁾, Caroline Junko Fujihara⁽¹⁾ e Carlos Antônio de Carvalho Fernandes⁽²⁾

⁽¹⁾ Universidade Estadual Paulista, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia, CEP: 18618-000, Botucatu, SP. E-mail: rodolfo.card@uol.com.br, euniceoba@fmvz.unesp.br, wolffcmf@yahoo.com.br, cajuahara@yahoo.com.br ⁽²⁾ Biotran LTDA, CEP: 37130-000, Alfenas, MG. E-mail: cacf@biotran.com.br

Resumo - O presente estudo objetivou avaliar o efeito do flunixin meglumine administrado no momento da inovulação de embriões sobre a taxa de prenhez e sobre as características da fase luteal de receptoras bovinas. No experimento 1, foram utilizadas 184 fêmeas inovuladas com embriões produzidos *in vitro* e divididas nos grupos: controle; e tratado onde as receptoras foram tratadas com 1,1 mg/Kg de flunixin meglumine. No experimento 2, foram utilizadas 22 fêmeas divididas em: grupo controle; grupo 2 onde os animais no 7º dia após o estro foram submetidos à manipulação do trato reprodutivo similar à inovulação de embrião; e grupo 3, onde as fêmeas foram submetidas à manipulação e tratadas com flunixin meglumine (1,1 mg/Kg). No experimento 1 não houve diferença na taxa de prenhez entre os animais controle e tratados (40,2% e 44,6%, respectivamente; $p=0,55$). No experimento 2 não houve diferença na duração da fase luteal entre os grupos, porém o grupo 2 apresentou concentrações plasmáticas de progesterona inferiores ao grupo controle e grupo 3. Portanto, concluímos que a administração de flunixin meglumine no momento da inovulação bloqueou uma redução nas concentrações plasmáticas de progesterona, porém, não foi efetiva em aumentar a taxa de prenhez de receptoras bovinas.

Termos para indexação: *Bos taurus*, flunixin meglumine, corpo lúteo, progesterona.

Pregnancy rates and luteal phase characteristics of bovine embryo recipients treated with flunixin meglumine

Abstract - The aim of this study was to evaluate the effects of an administration of flunixin meglumine at the moment of bovine embryo transfer on recipient's pregnancy rates and luteal phase characteristics. In experiment 1, 184 females were transferred with an *in vitro* produced embryo and divided in: control; and treated group in which recipients were treated with flunixin meglumine (1.1 mg/Kg). In experiment 2, 22 females were divided in: control group; group 2 in which animals were submitted to a reproductive tract manipulation (similar to an embryo transfer) on the 7th day after estrous; and group 3 in which females were submitted to a manipulation and treated with flunixin meglumine (1.1 mg/Kg). In experiment 1 no difference was observed on the pregnancy rates of control and treated groups (40.2% and 44.6%, respectively). In experiment 2 no difference was observed on the length of the luteal phase between groups, however, animals of group 2 presented lower plasma progesterone concentrations than control group and group 3. Therefore, we concluded that an

administration of flunixin meglumine at the moment of embryo transfer inhibited a reduction on plasma progesterone concentrations, however, was not effective in increasing pregnancy rates of bovine recipients.

Index terms: *Bos taurus*, flunixin meglumine, corpus luteum, progesterone.

Introdução

O melhoramento genético dos rebanhos bovinos é certamente o principal meio pelo qual se pode melhorar a eficiência produtiva e a lucratividade dos sistemas de criação nacionais. Dentre diversas ferramentas de melhoramento genético pode-se destacar a transferência de embriões e a produção *in vitro* de embriões como as ferramentas que melhor possibilitam o aproveitamento do material genético proveniente de fêmeas bovinas. Apesar do grande avanço no número de embriões bovinos transferidos durante os últimos anos, o estabelecimento da prenhez em receptoras de embriões permanece com alta taxa de variação, sendo que, em grande parte dos casos a taxa de prenhez desses animais está muito abaixo da taxa esperada. Essa grande variação nas taxas de prenhez observadas pode ser resultado de fatores embrionários, maternos, ambientais ou mesmo de uma combinação entre eles.

Foi identificado que a manipulação do trato reprodutivo da receptora no momento da inovulação do embrião resulta na liberação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) pelo endométrio (Schallenberger et al., 1989; Wann & Randel, 1990; Scenna et al., 2005). Esse aumento na liberação de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio pode comprometer a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos através de uma ação prejudicial ao desenvolvimento embrionário afetando diretamente na qualidade do embrião ou mesmo através do comprometimento na função luteal dessas receptoras o que, indiretamente, pode afetar o desenvolvimento do embrião (Wiltbank et al., 1989; Schrick et al., 2003; Hockett et al., 2004).

Avaliando os efeitos negativos da liberação de $PGF_{2\alpha}$ no momento da transferência do embrião, pode-se presumir que estratégias que objetivem a inibição específica de enzimas que participem da síntese de prostaglandina devem aumentar a taxa de prenhez em receptoras de embriões bovinos, seja pela inibição dos efeitos prejudiciais diretos da prostaglandina sobre o desenvolvimento embrionário, seja pelo bloqueio dos efeitos negativos da liberação de prostaglandina pelo endométrio sobre a funcionalidade do corpo lúteo (CL). Elli et al. (2001) administraram lisinato de ibuprofeno (antiinflamatório não esteroide que inibe a atividade da enzima ciclooxigenase-2) uma hora antes da transferência de embriões e obtiveram taxas de prenhez superiores no grupo tratado quando comparado ao grupo controle (82 vs. 56%). Pugh et al. (2004) trataram vacas com aspirina, outro inibidor da ciclooxigenase-2, e obtiveram aumento significativo de 18% na taxa de prenhez em comparação as vacas do grupo controle.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência do flunixin meglumine (FM), um inibidor da síntese de prostaglandina, sobre a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro* e também de avaliar sua influência sobre as concentrações plasmáticas de progesterona (P_4) e sobre a duração da fase luteal em fêmeas bovinas.

Material e Métodos

Experimento 1 – Efeito do flunixin meglumine sobre a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos

O experimento foi realizado entre janeiro e março de 2008, foram utilizadas 184 receptoras de embriões bovinos, cruzadas, adultas (primíparas e múltíparas), com escore de condição corporal igual ou superior a 3 (escala de 0 a 5), apresentando atividade ovariana cíclica e período pós-parto superior a 60 dias, provenientes de centrais de receptoras de embriões localizadas na região de Alfenas, MG. Foram utilizados 184 embriões produzidos *in vitro* pelo laboratório de fecundação *in vitro* Bioembryo®, localizado no município de Bauru, SP. Os oócitos utilizados foram originados de aspirações foliculares de matrizes zebuínas (Nelore e Guzerá). Foram utilizados embriões na fase de desenvolvimento de blastocisto inicial (BI; n= 40), blastocisto (BL; n= 68) e blastocisto expandido (BX; n= 76), sendo que todos apresentavam grau 1 de qualidade (alta qualidade).

As receptoras foram sincronizadas com uma aplicação de 500 µg de cloprostenol intramuscular (Ciosin®, Schering-Plough, São Paulo, SP). No período entre 2 a 5 dias após a aplicação os animais foram observados para detecção de cio duas vezes ao dia. Foram utilizadas receptoras entre o 6º e o 9º dia após a observação do estro. No dia da inovulação, as receptoras foram selecionadas através da palpação retal e exame ultrassonográfico do trato reprodutivo. As receptoras que apresentavam tônus e diâmetro uterino adequado à fase luteal do ciclo estral, e presença de CL foram selecionadas para receberem os embriões. Todas as inovulações foram classificadas conforme a dificuldade para realização do procedimento, sendo determinadas como escore 1 as inovulações que não apresentaram dificuldade em transpassar a cérvix e posicionar o inovulador no terço final do corno uterino. Nas inovulações de escore 2 houve uma dificuldade moderada para a realização do procedimento e nas inovulações de escore 3 houve uma grande dificuldade para realização do procedimento.

Após as inovulações as receptoras foram divididas em dois grupos: grupo 1 (controle) e grupo 2 (experimental), sendo que foi feita uma divisão casualizada em blocos dos embriões entre os dois grupos de forma que ambos recebessem o mesmo número de BI, BL e BX. Os animais do grupo 1 foram liberados imediatamente após o procedimento de inovulação e, os animais do grupo 2 receberam uma aplicação de FM, intramuscular, na dose de 1,1mg/kg (Flunixin Injetável®, Chemitec Agro-Veterinária, São Paulo, SP) logo após a inovulação.

O diagnóstico de gestação foi realizado através de exames ultrassonográficos trans-retais aos 30 e 60 dias de gestação, com a utilização do aparelho de ultra-som Esaote® (Pie Medical Equipment B.V., Maastricht, Holanda), modelo Aquila ProVet, com transdutor bifrequencial (6-8 MHz).

Os dados das taxas de prenhez foram analisados estatisticamente por meio do teste de Qui-quadrado, a um nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Para tanto, foi utilizado o procedimento FREQ do programa SAS System for Windows® (2001).

Experimento 2 - Efeito do flunixin meglumine sobre as características da fase luteal de receptoras de embriões bovinos

O experimento foi realizado em novembro e dezembro de 2008. Foram utilizadas 33 fêmeas bovinas da raça Nelore, adultas (primíparas e múltíparas), com escore de condição corporal igual ou superior a 3 (escala de 0 a 5), apresentando atividade ovariana cíclica e período pós-parto superior a 90 dias, provenientes da fazenda Experimental Edgárdia da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Botucatu. Os animais foram sincronizados através da administração de duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico intramuscular (Sincrocio®, Ouro Fino Saúde Animal, Ribeirão Preto, SP), com intervalo de 11 dias entre as aplicações. No período entre 2 a 5

dias após a segunda aplicação os animais foram observados para detecção de cio duas vezes ao dia.

No sétimo dia (D7) após a detecção do estro, as 25 fêmeas que haviam manifestado cio foram submetidas à avaliação ultrassonográfica do trato reprodutivo para determinação das características do CL e também para a avaliação uterina. No mesmo momento também foi realizada colheita de sangue para posterior dosagem da concentração plasmática de P_4 . Nessa etapa um animal foi descartado do experimento por apresentar conteúdo líquido no lúmen uterino, uma fêmea foi descartada por não apresentar imagem nítida de um CL durante o exame ultrassonográfico e outro animal foi descartado posteriormente por apresentar concentração plasmática de P_4 abaixo de 1 ng/ml no dia da manipulação (D7).

Os 22 animais restantes foram divididos aleatoriamente entre os grupos: grupo 1 (controle, $n=7$), grupo 2 (manipulação, $n=8$) e grupo 3 (manipulação + FM, $n=7$).

As 7 fêmeas do grupo 1 não foram submetidas a nenhum tipo de manipulação do trato reprodutivo além do exame ultrassonográfico dos ovários e do útero, e também não receberam nenhum fármaco durante o D7 ou posteriormente durante o experimento. Os animais do grupo 1 foram submetidos a exames ultrassonográficos e dosagens hormonais entre o D7 e o final da fase luteal (D7, D9, D11, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D19 e D20) para determinação do perfil de concentração plasmática de P_4 e duração funcional do CL.

As 8 fêmeas do grupo 2 foram submetidas à manipulação do trato reprodutivo no D7, semelhante à inováção de um embrião, logo após a avaliação ultrassonográfica e a colheita de sangue. Assim como no experimento 1, as manipulações foram classificadas com escore de dificuldade de 1 a 3. Os animais do grupo 2 foram submetidos a exames ultrassonográficos e colheitas de sangue entre o D7 e o final da fase luteal, da mesma forma realizada no grupo 1.

As 7 fêmeas do grupo 3 foram submetidas à manipulação do trato reprodutivo no D7 logo após a avaliação ultrassonográfica e a colheita de sangue, de forma idêntica à realizada nos animais do grupo 2. Porém, ao final da manipulação os animais receberam uma aplicação de 1,1 mg/kg de FM intramuscular (Flunixin Injetável®, Chemitec Agro-Veterinária, São Paulo, SP). Os animais do grupo 3, assim como os animais dos outros grupos, foram submetidos a exames ultrassonográficos e colheitas de sangue entre o D7 e o final da fase luteal para determinação das concentrações plasmáticas de P_4 e duração funcional do CL.

Os exames ultrassonográficos trans-retais foram realizados com a utilização do aparelho de ultra-som Aloka® (Aloka Co. Ltda, Tokio, Japão), modelo SSD 500, com transdutor de frequência 5 MHz. O volume do tecido luteal e da cavidade luteal foram calculados pela fórmula matemática: $V = 4/3 P.a/2. (b/2)^2$, em que a = eixo longitudinal e b = eixo transversal.

As amostras de sangue foram colhidas logo após os exames ultrassonográficos (D7, D9, D11, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D19 e D20) por venopunção dos vasos coccígeos com agulhas 21GX1 (Vacutainer® BD, São Paulo, SP) e depositadas em tubos de colheita de sangue (Vacutainer® BD, São Paulo, SP) a vácuo heparinizados. Os tubos foram mantidos em caixas térmicas refrigeradas até o momento da centrifugação realizada a 2500 x g por 15 minutos. O plasma obtido foi acondicionado em tubos plásticos identificados e armazenados em freezer a -70°C até o momento das dosagens hormonais.

As dosagens plasmáticas de P_4 foram determinadas através da utilização de kits comerciais em fase sólida (Coat-A-Count, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los

Angeles, EUA), com leitura por sistema de radioimunoensaio (Packard Cobra II Auto Gamma, GMI Incorporation, Ramsey, EUA). O processamento das amostras foi realizado em 2 ensaios, sendo o coeficiente de variação intra-ensaio de 1,87%, o coeficiente de variação inter-ensaio de 3,75% e a sensibilidade dos ensaios de 0,02 ng/mL.

Para a análise estatística das características avaliadas foi empregado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS, System for Windows, 2001). As variáveis concentração plasmática de P_4 e volume do CL foram comparadas nos diferentes momentos por meio do procedimento GLM do SAS (General Linear Model Procedure – PROC GLM), utilizando-se o teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Para comparar a concentração plasmática de P_4 entre os diferentes grupos foi realizada análise de variância e regressão, tendo como fonte de variação os dias das amostragens. Para a comparação entre as médias foi utilizado o teste t de Student, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$). As variáveis dependentes foram a concentração plasmática de P_4 e o volume do CL, e as independentes foram os dias das colheitas e as vacas.

Resultados e Discussão

Experimento 1 – Efeito do flunixin meglumine sobre a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos

Do total de 184 inovulações de embriões, 148 (80,4%) foram classificadas com escore 1 de dificuldade, 30 (16,3%) foram classificadas com escore 2 e apenas 6 (3,3%) inovulações foram classificadas com escore 3.

A taxa de prenhez geral aos 30 dias de gestação das 184 receptoras de embriões foi de 42,39% (78/184). Não houve diferença significativa entre a taxa de prenhez dos animais do grupo 1 (40,22% - 37/92) em relação ao grupo 2 (44,57% - 41/92) ($p=0,55$). Da mesma forma, não houve diferença nas taxas de prenhez entre diferentes grupos experimentais considerando os diferentes estágios de desenvolvimento embrionário (BI, BL e BX) ($p>0,05$).

De forma oposta, diversos estudos demonstraram efeitos positivos da utilização de inibidores da síntese de prostaglandina sobre a taxa de prenhez desses animais (Elli et al., 2001; Pugh et al., 2004; Scenna et al., 2005). Provavelmente um possível fator que justifique essa discordância entre os resultados obtidos nos trabalhos acima citados e o presente estudo é a diferença na quantidade de $PGF_{2\alpha}$ liberada pelo endométrio no momento da inovulação. Embora não mensurada no atual estudo, é esperado que tenha ocorrido discreta liberação de $PGF_{2\alpha}$ durante as inovulações dos embriões, uma vez que a grande maioria dessas inovulações (80,4% - 148/184) foi classificada com escore de inovulação 1 (cervix facilmente transpassada e posicionamento do inovulador no terço final do corno uterino exigindo mínima manipulação), fato ocorrido provavelmente devido ao criterioso descarte de receptoras que anteriormente apresentaram cervix difícil de serem transpassadas no momento da inovulação.

Rowe et al. (1980) já haviam relatado correlação inversa entre o tempo e a dificuldade encontrada para realização das inovulações com as taxas de prenhez de receptoras de embriões bovinos. De forma semelhante, Schrick et al. (2003) relataram que conforme a dificuldade para a inovulação do embrião aumentava, a taxa de prenhez diminuía significativamente. Portanto, provavelmente as baixas quantidades de $PGF_{2\alpha}$ liberadas pelo endométrio das receptoras do grupo controle no atual estudo não foram suficientes para afetar o desenvolvimento embrionário ou mesmo para exercer algum efeito deletério sobre a funcionalidade CL, justificando assim a inexistência de diferença entre as taxas de prenhez das receptoras do grupo controle e do grupo tratado.

Outro fator que pode ter influenciado para a inexistência de efeito positivo da administração de FM sobre a taxa de prenhez de receptoras bovinas foi o grau de qualidade dos embriões. Scenna et al. (2005) não observaram aumento significativo na taxa de prenhez de receptoras, que receberam embriões produzidos *in vivo* frescos e congelados classificados como grau 1 de qualidade, que foram submetidas a uma aplicação de FM no momento da inovulação quando comparadas as receptoras controle. Porém, já os animais que receberam um embrião grau 2 e foram submetidos a uma aplicação de FM apresentaram taxa de prenhez 11% maior que o grupo controle. De forma semelhante, Purcell et al. (2005) relataram efeito benéfico da administração de FM sobre a taxa de prenhez de receptoras que receberam embriões produzidos *in vivo* frescos e congelados grau 2 e 3 de qualidade.

Portanto, o fato de somente terem sido utilizados embriões de grau 1 de qualidade no atual trabalho pode ser um fator que tenha contribuído para a inexistência de diferença entre as taxas de prenhez dos diferentes grupos experimentais.

A taxa de perda embrionária/fetal total entre aproximadamente 30 e 60 dias de gestação foi de 3,85% (3/78), não havendo diferença significativa entre os grupos e os diferentes estágios de desenvolvimento embrionário.

Experimento 2 - Efeito do flunixin meglumine sobre as características da fase luteal de receptoras de embriões bovinos

Após duas aplicações de cloprostenol sódico com intervalo de 11 dias entre as aplicações, 25 das 33 fêmeas bovinas apresentaram sinais de estro durante o período de observação, representando 75,76% do total de animais. Fernandes et al. (2006) obtiveram sincronização semelhante em receptoras de embriões cruzadas (82,9% - 199/240) que foram submetidas a uma aplicação de cloprostenol entre os dias 6 e 17 do ciclo estral. De forma semelhante, Ávila Pires et al. (2003) obtiveram sincronizações de estro variando entre 70 e 85% após duas aplicações de cloprostenol com intervalo de 11 a 14 dias entre as aplicações em fêmeas zebuínas.

Do total de 22 manipulações realizadas para o posicionamento do inovulador no terço final do corno uterino, 10 (45,4%) foram classificadas com escore 1 de dificuldade, 8 (36,4%) foram classificadas com escore 2 e 4 (18,2%) foram classificadas com escore 3.

Não foi observada diferença entre as médias do volume dos corpos lúteos dos diferentes grupos ao longo da fase luteal ($p>0,05$; figura 1). Em torno do sétimo dia (D7) ao nono dia (D9) do ciclo estral foi observado em todos os grupos experimentais o maior volume dos CLs sendo que, a partir desse período foi observada uma diminuição gradativa do volume dos CLs durante o restante da fase luteal. Dados similares foram observados em outros estudos (Viana et al., 2000; Acosta et al., 2003; Borges et al., 2003).

Foi observada diferença ($p<0,05$) nos valores médios para as concentrações plasmáticas de P_4 durante o período correspondente ao D7 até o final da fase luteal (D7 a D19) entre o grupo controle (G1) e o grupo de animais que foram submetidos à manipulação do trato reprodutivo no D7 (G2), sendo que, o último apresentou valor médio menor durante o período ($p= 0,018$; figura 2). Já o valor médio das concentrações plasmáticas de P_4 dos animais do grupo 3 (manipulação + FM) não diferiu do valor observado no grupo controle durante o mesmo período (G1) ($p>0,05$). Porém quando comparado ao grupo 2 (manipulação) o grupo 3 (manipulação + FM) assim como o grupo controle (G1), também apresentou maiores concentrações plasmáticas de P_4 durante o mesmo intervalo.

Os animais do grupo controle (grupo 1) apresentaram o maior valor médio para as concentrações plasmáticas de P_4 durante o ciclo estral no dia 14 do ciclo (5,85 mg/mL), sendo que no intervalo entre o D7 e o D14 houve aumento gradativo nos valores médios de P_4 e, a partir do dia 14 houve diminuição diária nos valores médios de P_4 (figura 3).

Estudos avaliaram o efeito da manipulação do trato reprodutivo sobre a liberação de $PGF_{2\alpha}$, seja através das concentrações de metabólitos de prostaglandina (Wann & Randel, 1990), seja por meio da avaliação direta de $PGF_{2\alpha}$ através da canulação da veia safena (Scenna et al., 2005). Em ambos os estudos foi identificado que a manipulação do trato reprodutivo de fêmeas bovinas resulta em liberação de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio. Além disso, Scenna et al. (2005) identificaram um padrão pulsátil de liberação de $PGF_{2\alpha}$ após a manipulação, de forma muito similar ao padrão de liberação de $PGF_{2\alpha}$ no momento da luteólise.

Portanto, apesar de não ter sido quantificada no presente estudo, é provável que tenha ocorrido uma liberação significativa de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio dos animais que foram submetidos à manipulação do trato reprodutivo no experimento 2. Alguns fatores dão sustentação a essa hipótese, tais como: a alta incidência de inovulações que foram classificadas com escore de dificuldade 2 e 3 (dificuldade média e dificuldade alta, respectivamente; 54,6% - 12/22) e a inexistência de seleção prévia dos animais em relação a anatomia da cervix e útero uma vez que essas fêmeas nunca haviam sido submetidas a uma inovulação anteriormente. Portanto, de forma contrária a observada no experimento 1, diversos fatores sugerem que tenha ocorrido liberação mais acentuada de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio dos animais submetidos a manipulação do trato reprodutivo no experimento 2.

Schramm et al., (1983) avaliaram o efeito da administração de $PGF_{2\alpha}$ em diferentes freqüências e concentrações sobre a funcionalidade do CL em ovelhas. Os autores observaram que eram necessários pelo menos 5 pulsos de $PGF_{2\alpha}$ em um período de 25 horas para que ocorresse luteólise permanente na maior parte dos animais, porém, ao avaliarem o efeito de somente um pulso diário de $PGF_{2\alpha}$ sobre a funcionalidade do CL, os autores notaram que de forma semelhante ao observado no presente estudo, ocorreu queda significativa na taxa de secreção de P_4 , que foi seguida posteriormente por retomada no perfil de secreção de P_4 .

Portanto, é provável que a manipulação uterina realizada nas fêmeas do grupo 2 tenha desencadeado liberação de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio, que por sua vez, acarretou em queda temporária na capacidade do CL em secretar P_4 em 3 animais (37,5%), e estimulou um processo de regressão precoce do CL em um animal (12,5%; figura 4).

A administração de FM aparentemente foi efetiva em 5 fêmeas em bloquear a síntese de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio causada pela manipulação do trato reprodutivo, porém, duas fêmeas apresentaram queda nos valores das concentrações plasmáticas de P_4 após a manipulação, indicando que por alguma razão específica a administração de FM não foi efetiva em bloquear a síntese de $PGF_{2\alpha}$ nesses animais (figura 5).

Conclusões

1. A manipulação do trato reprodutivo de fêmeas bovinas no momento da transferência de embriões não alterou a duração da fase luteal, porém, diminuiu as concentrações plasmáticas de progesterona desses animais.
2. A administração de flunixin meglumine no momento da manipulação do trato reprodutivo de fêmeas bovinas foi efetiva em inibir uma diminuição nas concentrações plasmáticas de progesterona desses animais.

3. A administração de flunixin meglumine no momento da inovulação de embriões produzidos *in vitro* não foi efetiva em aumentar a taxa de prenhez de receptoras bovinas.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida. À Chemitec Agro-veterinária pelo fornecimento dos medicamentos e a Biotran Ltda. pelo auxílio na realização das atividades práticas.

Referências

ACOSTA, T.J.; HAYASHI, K.G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v. 125, p. 759-767, 2003.

ÁVILA PIRES, M.F.; ALVES, N.G.; SILVA FILHO, J.M.; CAMARGO, L.S.A.; VERNEQUE, R.S. Comportamento de vacas raça Gir (*Bos taurus indicus*) em estro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 187-196, 2003.

BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; JÚNIOR, V.R.R.; CARVALHO, G.R.; FONSECA, J.F.; MARCATTI NETO, A.; ASSIS, A.J. Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 85-92, 2003.

ELLI, M.; GAFFURI, B.; FRIGERIO, A.; ZANARDELLI, M.; COVINI, D.; CANDIANI, M.; VIGNALI, M. Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. **Reproduction**, v. 121, p. 151-154, 2001.

FERNANDES, C.A.C.; FIGUEIREDO, A.C.S.; OLIVEIRA, E.R.; VASCONCELOS, T.D.; ALVES, B.F.L.; GIOSO, M.M.; VIANA, J.H.M.; OBA, E. Eficiência de detecção de estros em receptoras de embrião sincronizadas com cloprostenol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 494 (resumo), 2006.

HOCKETT, M.E.; ROHRBACH, N.R.; SCHRICK, F.N. Alterations in embryo development in progestogen-supplemented cows administered prostaglandin F_{2α}. **Prostaglandins and other Lipid Mediators**, v. 73, p. 227-236, 2004.

PUGH, M.L.; MOREIRA, M.B.; GILBERT, G.R.; YOUNGS, C.R. Influence of prostaglandin F_{2α} synthesis inhibitors on pregnancy rate of embryo transfer recipients heifers. In: 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro. **Anais**. Porto Seguro, p. 399 (resumo), 2004.

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, p. 867-878, 2005.

ROWE, R.F.; DEL CAMPO, M.R.; CRISTER, J.K.; GINTHER, O.J. Embryo transfer in cattle: non-surgical transfer. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 1024-1028, 1980.

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. 8, p. 38-45, 2005.

SCHALLENBERGER, E.; SCHAMS, D.; MEYER, H.H.D. Sequences of pituitary, ovarian, and uterine hormone secretion during the first 5 weeks of pregnancy in dairy cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, p. 277-286, 1989.

SCHRAMM, W.; BOVAIRD, L.; GLEW, M.E.; SCHRAMM, G.; MCCracken, J.A. Corpus luteum regression induced by ultra-low pulses of prostaglandin F2 alpha. **Prostaglandins**, v. 26, p. 347-364, 1983.

SCHRICK, F. N.; SCENNA, F.N.; EDWARDS, J.L.; HOCKETT, M.E.; SAXTON, A.M. More evidence for a direct interaction between prostaglandin F2 α and development of bovine embryos. In: Proceedings of Canadian Embryo transfer association and American Embryo Transfer Association Joint Annual Conference, Calgary, Alberta, 2003. **Anais**. p. 43-52, 2003.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F. Follicular dynamics in Zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2501-2509, 2000.

WANN, R. A.; RANDEL, R.D. Effect of uterine manipulation 35 days after parturition on plasma concentrations of 13, 14-dihydro-15-keto prostaglandin F2a in multiparous and primiparous Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 1389-1394, 1990.

WILTBANK, M.C., GUTHRIE, P.B., MATTSON, M.P., KATER, S.B., NISWANDER, G.D. Hormonal regulation of the free intracellular calcium concentrations in small and large ovine luteal cells. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 771-777, 1989.

Figuras

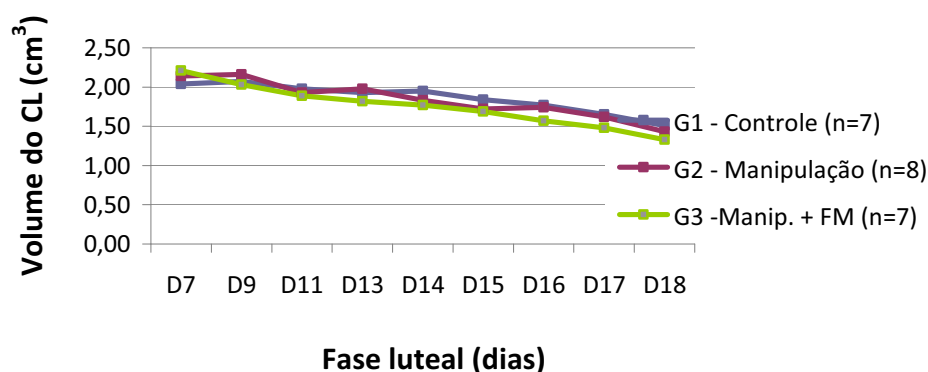


Figura 1. Volume do corpo lúteo (cm³) durante a fase luteal (D7 a D18) dos animais dos diferentes grupos experimentais (Grupo 1 – controle; Grupo 2 – manipulação do trato reprodutivo; Grupo 3 – manipulação do trato reprodutivo + flunixin meglumine) ($p > 0,05$).

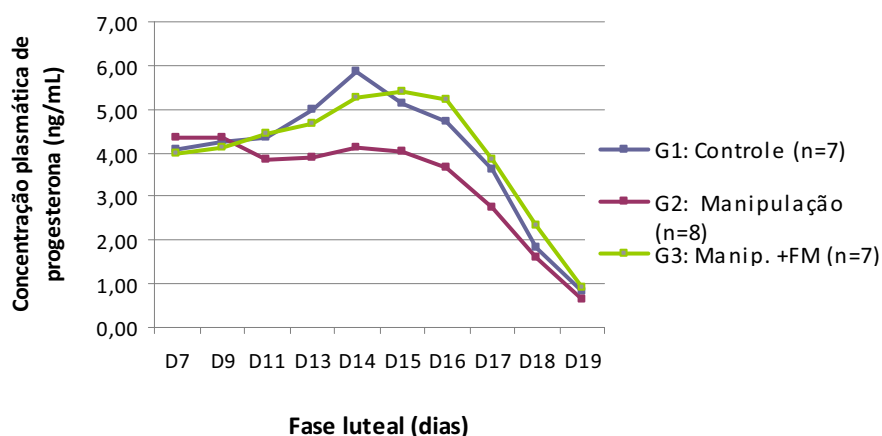


Figura 2. Valores médios para as concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) ao longo do ciclo estral (D7 a D19) entre os diferentes grupos experimentais. (Grupo 1 – controle; Grupo 2 – manipulação do trato reprodutivo; Grupo 3 – manipulação do trato reprodutivo + flunixin meglumine).

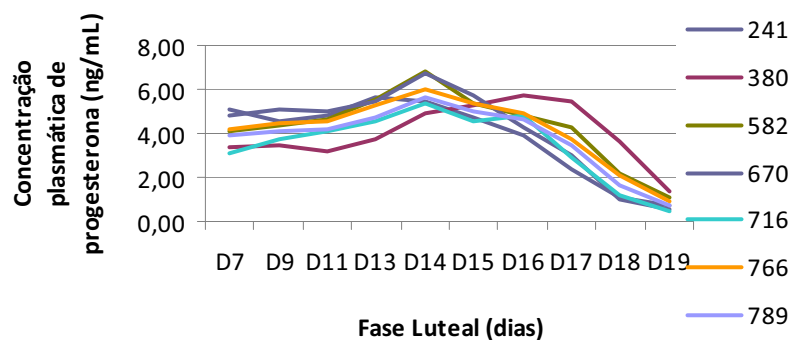


Figura 3. Valores individuais das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) ao longo do ciclo estral (D7 a D19) dos animais pertencentes ao grupo controle (grupo 1).

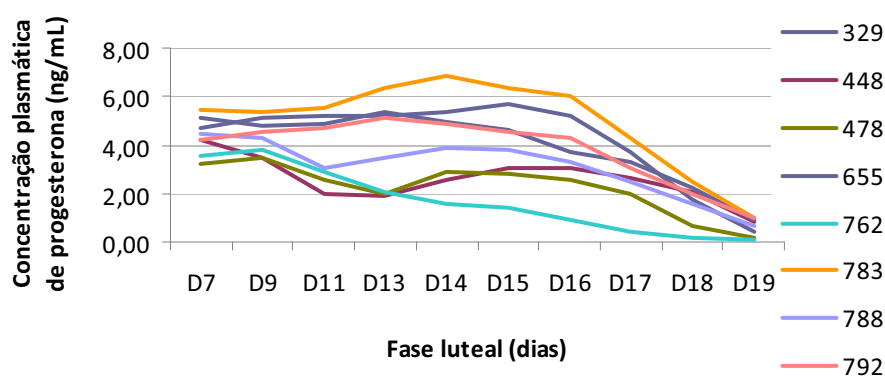


Figura 4. Valores individuais das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) ao longo do ciclo estral (D7 a D19) dos animais pertencentes ao grupo de animais submetidos a uma manipulação do trato reprodutivo no D7 do ciclo estral (grupo 2).

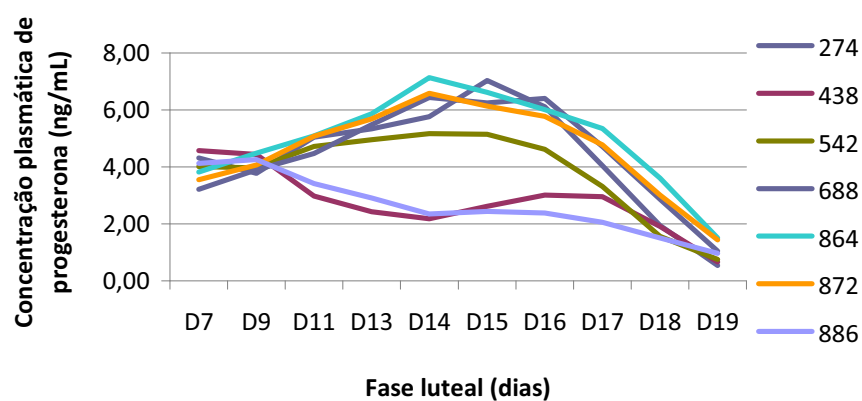


Figura 5. Valores individuais das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) ao longo do ciclo estral (D7 a D19) dos animais pertencentes ao grupo de animais submetidos a uma manipulação do trato reprodutivo e tratados com flunixin meglumine no D7 do ciclo estral (grupo 3).