

KAREN REGINA PERES

Emprego tóxico de prostaglandina da família E ou de análogo com o intuito de acelerar a migração de embriões eqüinos para o útero e imunolocalização dos respectivos receptores

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

São Paulo
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

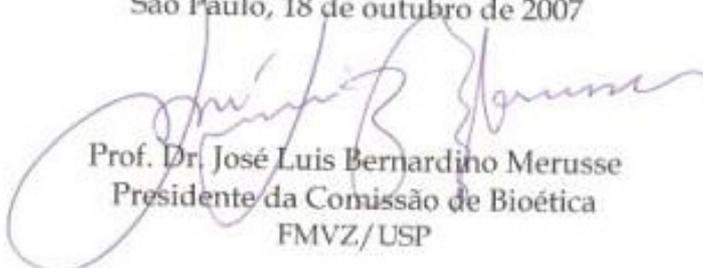
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção de receptores de prostanóides do subtipo EP na tuba uterina e útero de fêmeas eqüinas e estudo da função das prostaglandinas da série E (PGE) no deslocamento de embriões para o útero de éguas superestimuladas com EPE", protocolado sob o nº1177/2007, utilizando 10 (dez) cavalos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/07.

We certify that the Research "Detection of receptors subtype EP prostanoids in the uterine tube and uterus of equine females and function study of type E prostaglandins (PGE) in the embryos displacement for superstimulated mares uterus with EPE", protocol number 1177/2007, utilizing 10 (ten) horses, under the responsibility Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/07.

São Paulo, 18 de outubro de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PERES, Karen Regina

Título: Emprego tópico de prostaglandina da família E ou de análogo com o intuito de acelerar a migração de embriões eqüinos para o útero e imunolocalização dos respectivos receptores

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico aos meus pais Antonio e Geni

Dedico ao meu noivo Adriano

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof.º Rubens Paes de Arruda (VRA-FMVZ-USP) pela amizade, disponibilização do Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) e conhecimentos transmitidos durante os últimos quatro anos que me proporcionaram a conquista do título de doutora;

Ao Departamento de Reprodução Animal – FMVZ-USP pela oportunidade da realização do curso de doutorado;

Ao Prof.º Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães (Coordenador do Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal) pela amizade e apoio durante a realização do doutorado;

Aos professores do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA-VRA-FMVZ-USP) pela amizade e convivência;

Aos amigos e colegas de pós-graduação do Departamento de Reprodução Animal pela ajuda e amizade durante estes anos;

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA-VRA-FMVZ-USP, Pirassununga, SP) pela convivência e colaboração durante os experimentos;

Aos funcionários da cavalaria (Pirassununga, SP) pela convivência e ajuda durante os experimentos;

Aos estagiários e alunos do VRA-FMVZ-USP;

Ao Abatedouro de Equinos Belo Vale (Campo Belo, MG) pela doação dos sistemas genitais;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico Ltda., São Paulo-SP, pela doação da PGE₁ e pela manipulação das drogas do experimento II;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio à pesquisa;

À Farmaco – Farmácia de Manipulação Ltda., São Caetano do Sul-SP, pelo apoio técnico e formulação do gel do experimento I;

À Ferrari Medical pelo empréstimo do vídeo-laparoscópio;

Às professoras e amigas Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga e Claudia Barbosa Fernandes pela colaboração na obtenção dos sistemas genitais das éguas;

A Hebron Farmacêutica Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica pela doação do misoprostol;

À Prof^a. Cláudia Lima Verde e ao técnico de laboratório Nilton (Laboratório de Citologia – FZEA/USP) pelo auxílio e disponibilização do laboratório;

Ao Prof. Ed Hoffman Madureira (VRA-FMVZ/USP) pela amizade, doação da PGE₁ e pelos conhecimentos técnicos;

Ao Prof. Francisco J. Hernandez Blazquez (VCI-FMVZ/USP) pela contribuição técnica e disponibilização do Laboratório de Anatomia Microscópica e Imuno-histoquímica;

Ao Prof. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva (VCI-FMVZ/USP) pelo apoio e colaboração durante o experimento I;

Ao Prof. Manuel Ayres (Belém, Pará) pela concessão do programa Bioestat e contribuição durante as análises estatísticas;

Ao Prof. Marco Antonio Alvarenga (UNESP-Botucatu) pela doação do EPE;

Ao Prof. Osvaldo Albuquerque Cavalcanti (Dep. Farmácia e Farmacologia-UEM) pela atenção e conhecimentos farmacológicos;

Ao Prof. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr. (Dep. Fisiologia- Instituto de Ciências Básicas da Saúde-UFRGS) pela grande atenção dispensada e pela contribuição técnica;

À Harumi Doi Shiraishi pela amizade, competência e ajuda durante a realização do doutorado;

À bibliotecária Elza Faquim pela colaboração na normalização da tese;

Aos alunos de pós-graduação, alunos de iniciação científica e ao técnico Diogo do Laboratório de Microscopia e Imuno-histoquímica do VCI-FMVZ-USP pela ajuda e convivência;

Aos animais que tanto amo;

Enfim, o meu muito obrigada a todos.

“Dar menos que seu melhor é sacrificar o dom que você recebeu”

Steve Prefontaine

RESUMO

PERES, K. R. **Emprego tópico de prostaglandina da família E ou de análogo com o intuito de acelerar a migração de embriões eqüinos para o útero e imunolocalização dos respectivos receptores.** [Topic application of prostaglandin E family or analogous aiming the acceleration of the migration of equine embryos to the uterus and immunolocalization of the respective receptors]. 2008. 90 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Ao contrário de outras espécies de animais domésticos, na égua os embriões descem tardiamente para o útero, creditando-se isto a uma dependência da PGE₂. Conseqüentemente, são recuperados embriões que já estão em fases mais avançadas de desenvolvimento (blastocisto e blastocisto expandido) e com um tamanho que normalmente ultrapassa os 300 micrômetros quando a colheita é realizada após o 6º dia. Isto reflete em um insucesso nos protocolos de criopreservação embrionária. Em razão deste problema, testou-se a eficácia da aplicação da PGE₂ por dois métodos (experimento I) e a eficácia da PGE₁ e do análogo misoprostol (experimento II) na promoção da recuperação antecipada de embriões. Os dois experimentos foram realizados em éguas superestimuladas com Extrato de Pituitária Eqüina. No primeiro experimento, no 4º dia após a ovulação (D4), duas éguas foram submetidas à laparoscopia pela fossa paralombar para a deposição de 0,2 mg de PGE₂ em gel sobre a tuba uterina e em outras três éguas a PGE₂ foi administrada topicamente sobre a junção útero-tubárica (JUT) com auxílio de uma pipeta flexível (método não-cirúrgico). Vinte e quatro horas após a deposição do gel (D5), para ambos os métodos, foi realizada uma primeira tentativa de recuperação embrionária sendo que não foram recuperados embriões. Uma nova tentativa foi realizada entre o D6-6,5, sendo que desta vez, foram recuperados dois embriões das cinco éguas (40%), um de cada grupo. No segundo experimento, duas aplicações de 0,2 mg de PGE₁ 100% (n=5) ou de misoprostol 1% (n=5) diluídos em gel foram realizadas na região da JUT, no D4, pelo método não-cirúrgico. Não foram recuperados embriões no D5 das éguas que receberam PGE₁ (0/5) e apenas de uma delas foram recuperados dois embriões no D6-6,5. Do grupo que recebeu misoprostol recuperaram-se três embriões de diferentes éguas no D5 (3/5), sendo uma mórula e dois embriões de sete dias provenientes de ovulações não-sincrônicas. No D6, entretanto, foram recuperados oito embriões de todas as éguas (5/5) que receberam misoprostol, resultado que é significativamente superior (P=0,048) ao do grupo que recebeu PGE₁ (1/5). Apesar do pequeno número de animais, foram recuperados 11

embriões das 12 ovulações que ocorreram nas éguas do grupo misoprostol, todos com diâmetro igual ou inferior a 300 micrômetros. No último experimento detectou-se qualitativamente por imuno-histoquímica os diferentes subtipos de receptores (EP₁ a EP₄) para as PGE no útero, na JUT e nos diferentes segmentos da tuba uterina das éguas, em todas as fases do ciclo estral e durante dois períodos da gestação, porém, há uma menor quantidade (P< 0,0001) de receptores do subtipo EP₁ em comparação aos demais subtipos. Os resultados obtidos por imuno-histoquímica indicam que realmente parece ser efetiva a administração tópica de PGE na JUT pelo método não-cirúrgico e os resultados obtidos nos dois primeiros experimentos demonstram que apesar de não antecipar a descida do embrião equino para o útero, o protocolo utilizando misoprostol 1% em éguas superovuladas mostrou-se eficaz em aumentar de maneira significativa a recuperação de embriões de seis dias com características desejáveis para a criopreservação.

Palavras-chave: Égua. Transporte embrionário. Prostaglandinas E. Receptores. Sistema genital.

ABSTRACT

PERES, K. R. **Topic application of prostaglandin E family or analogous aiming the acceleration of the migration of equine embryos to the uterus and immunolocalization of the respective receptors.** [Emprego tópico de prostaglandina da família E ou de análogo com o intuito de acelerar a migração de embriões eqüinos para o útero e imunolocalização dos respectivos receptores]. 2008. 90 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Differently of any other ways of occurrence among the domestic animals, concerning mares, their embryos migrate in a delayed lapse of time to their uterus due to a correlation to the PGE₂. Consequently, one extracts embryos which are already into some more advanced phase of their development (blastocyst and expanded blastocyst) normally exceeding 300 micrometers when their extraction is performed after the 6th day. This fact results into a failure concerning the protocols of embryonic cryopreservation. Regarding this problem, the effectiveness of applying PGE₂ using two different methods (experiment I) and the effectiveness of PGE₁ and the analogous misoprostol (experiment II) for promoting the anticipated extraction of the embryos, were evaluated. Both experiments were carried on some superstimulated mares using Equine Pituitary Extract. Experiment I: after the 4th day after the ovulation (D4), two mares were submitted to laparoscopy through the flank for depositing 0.2mg of PGE₂ gel on the oviduct; to three other mares PGE₂ was topically applied on the uterus-tube junction (UTJ) with the aid of a flexible pipette (not-surgical method). Twenty and four hours after the gel disposal (D5) regarding both methods, a first attempt for extracting the embryos was unsuccessfully performed. Another attempt was performed between the D6-6.5, and this time two embryos were extracted from the five mares (40%), one of each group. Experiment II: two applications of 0.2mg of PGE₁ gel 100% (n=5) or misoprostol gel 1% (n=5) were accomplished on the UTJ region, at D4, through the not-surgical method. There weren't any extracted embryos at D5 from the mares which had received PGE₁ (0/5) and there were just two embryos extracted from a mare at D6-6.5. From the group which had received misoprostol three embryos from different mares were extracted at D5 (3/5), being a morula and two embryos aged seven days, from not-synchronous ovulations. However, at D6, eight embryos were extracted from all of the mares (5/5) which have received misoprostol, a significantly superior result (P=0.0048) comparing to the group which received PGE₁ (1/5). Although the small number of animals, there were extracted

eleven embryos from the twelve ovulations into the group which received misoprostol, all of them with a diameter ≤ 300 micrometers. In the last experiment it was qualitatively detected by immunohistochemistry the different receptor subtypes (EP_1 to EP_4) for the PGEs in the uterus, on the UTJ and in the different segments of the oviduct, in all stages of the estrous cycle and during two periods of gestation; however, there is a smaller amount ($P < 0.0001$) of the receptor subtype EP_1 in comparison to the other subtypes. The obtained results by immunohistochemistry genuinely indicate that the topical application of PGE on the UTJ through a not-surgical method seems effective and the obtained results in the first two experiments show that even though it doesn't anticipate the embryo's migration to the uterus, the protocol using misoprostol 1% in superstimulated mares was significantly effective for increasing the extraction of embryos aged six days with desirable characteristics for the cryopreservation.

Key-words: Mare. Embryonic migration. Prostaglandin E. Receptors. Genital System.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Protocolo para superestimulação ovariana de éguas utilizando baixa dose de EPE e aplicação de PGE ₂ para a recuperação antecipada de embriões - Pirassununga - 2006	34
Figura 2- Ilustração representativa da aplicação tópica de PGE ₂ na tuba uterina por vídeo-laparoscopia - Pirassununga - 2006	36
Figura 3 - Ilustração representativa da deposição local de PGE ₂ na junção útero-tubárica pela via intra-uterina - Pirassununga - 2006	37
Figura 4 - Administração tópica de PGE ₂ na tuba uterina por vídeo-laparoscopia (a) e posterior vasodilatação (b) - Pirassununga - 2006.....	40
Figura 5 - Protocolo de superestimulação ovariana de éguas com EPE e aplicação de PGE ₁ ou Misoprostol 1% para a recuperação antecipada de embriões - Pirassununga - 2007	44
Figura 6 – Imagens representativas da imunomarcção do receptor EP ₁ na região da mucosa do corno uterino, da junção útero-tubárica e das diferentes porções da tuba uterina de éguas nas fases de diestro, estro e anestro (100x) - São Paulo - 2008	59
Figura 7 - Imagens representativas da imunomarcção do receptor EP ₂ na região da mucosa do corno uterino, da junção útero-tubárica e das diferentes porções da tuba uterina de éguas nas fases de diestro, estro e anestro (100x) - São Paulo - 2008	61
Figura 8 - Imagens representativas da imunomarcção do receptor EP ₃ na região da mucosa do corno uterino, da junção útero-tubárica e das diferentes porções da tuba uterina de éguas nas fases de diestro, estro e anestro (100x) - São Paulo - 2008	63
Figura 9 - Imagens representativas da imunomarcção do receptor EP ₄ na região da mucosa do corno uterino, da junção útero-tubárica e das diferentes porções da tuba uterina de éguas nas fases de diestro, estro e anestro (100x) - São Paulo - 2008	65
Figura 10 – Imagens representativas da imunomarcção dos receptores EP ₁ , EP ₂ , EP ₃ e EP ₄ no miométrio de éguas em diferentes fases do ciclo estral e durante diferentes períodos gestacionais - São Paulo - 2008	66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Taxa de recuperação embrionária, no 5º e 6-6,5º dia após a ovulação, de éguas que foram tratadas com PGE₂ pelo método não-cirúrgico ou por vídeo-laparoscopia - Pirassununga - 200641
- Tabela 2 - Número de ovulações, taxa de éguas que produziram embriões e taxa de recuperação embrionária no D6-6,5 de éguas superestimuladas com EPE e tratadas com PGE₁ ou Misoprostol 1% - Pirassununga - 200746
- Tabela 3 - Resultado geral da análise imuno-histoquímica de receptores de prostaglandina E no epitélio do trato genital de éguas em diferentes fases do ciclo ou em estado gestacional (1=fraca, 2=fraca a moderada, 3=moderada, 4=moderada a forte, 5=forte) - São Paulo - 2008.....67

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Relação de embriões recuperados de éguas superestimuladas com EPE e tratadas com PGE₁ ou com Misoprostol 1% - Pirassununga - 200747
- Quadro 2 - Expressão do receptor do subtipo EP₁ (+: positivo; -: negativo) nas células epiteliais de diferentes porções do trato reprodutivo de éguas e em diferentes fases do ciclo ou período gestacional evidenciadas por imuno-histoquímica - São Paulo - 2008.....58
- Quadro 3 - Expressão do receptor do subtipo EP₂ (+: positivo; -: negativo) nas células epiteliais de diferentes porções do trato reprodutivo de éguas e em diferentes fases do ciclo ou período gestacional, evidenciadas por imuno-histoquímica - São Paulo - 200860
- Quadro 4 - Expressão do receptor do subtipo EP₃ (+: positivo; -: negativo) nas células epiteliais de diferentes porções do trato reprodutivo de éguas e em diferentes fases do ciclo ou período gestacional, evidenciadas por imuno-histoquímica - São Paulo - 200862
- Quadro 5 - Expressão do receptor do subtipo EP₄ (+: positivo; -: negativo) nas células epiteliais de diferentes porções do trato reprodutivo de éguas e em diferentes fases do ciclo ou período gestacional, evidenciadas por imuno-histoquímica - São Paulo - 200864

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice A - Dados individuais sobre o tratamento superestimulatório com EPE (6mg, IM, 1x ao dia), resposta superovulatória e recuperação embrionária no 5º dia e 6-6,5º dia após a ovulação de éguas tratadas com PGE₂ administrada por método cirúrgico (C) ou não-cirúrgico (NC) - Pirassununga, 2006..... 87
- Apêndice B - Dados individuais sobre o tratamento superestimulatório com EPE (12,5 mg, IM, 2x ao dia), resposta superovulatória e recuperação embrionária no 5º dia e 6-6,5º dia após a ovulação de éguas tratadas com PGE₁ ou Misoprostol 1% - Pirassununga, 2007 88

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Tampão Citrato (pH = 6.0).....	89
Anexo B - PBS-1: tampão fosfato salino (pH 7.4)	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	micrograma (10^{-3}g)
μm	micrômetro (10^{-6}m)
AMPC	Adenosina Monofosfato cíclica
Bi	Blastocisto inicial
B1	Blastocisto
BSA	Albumina sérica bovina
Bx	Blastocisto expandido
Ca^{2+}	Cálcio
CBRA	Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal
cm	centímetro (10^{-2}m)
CO_2	Dióxido de carbono (gás carbônico)
COX	ciclooxigenases
D_2	segundo dia do diestro
D5	5º dia após detecção da ovulação
D6	6º dia após detecção da ovulação
D6,5	seis dias e meio após ovulação
D7	7º dia após detecção da ovulação
DMPBS	solução salina fosfatada tamponada modificada de Dulbecco
DP	desvio padrão
eFSH	Hormônio Folículo Estimulante eqüino
EPE	Extrato de Pituitária Eqüina
et al.	do latim et alii (e outros)
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
h	hora
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio (água oxigenada)
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
IA	Inseminação Artificial
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões “International Embryo Transfer Society”
IM	intramuscular
IV	intravenoso

Kg	quilograma (10^3 g)
LH	Hormônio Luteinizante
Mc	mórula compacta
mg	miligrama (10^{-3} g)
MG	Minas Gerais
MHz	Mega-Hertz
ml	mililitro (10^{-3} l)
mm	milímetro (10^{-3} m)
Mo	mórula
PBS	solução salina fosfatada tamponada
PCAPS	Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga
pg	picograma (10^{-12} g)
PGD	prostaglandina D
PGD ₂	prostaglandina D ₂
PGE	prostaglandina E
PGE ₁	prostaglandina E ₁
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGF	prostaglandina F
PGF _{2α}	prostaglandina F _{2α}
PGG ₂	prostaglandina G ₂
PGH ₂	prostaglandina H ₂
PGI	prostaglandina I
PGI ₂	prostaglandina I ₂ (prostaciclina)
PLA ₂	fosfolipase A ₂
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
SP	São Paulo
TE	Transferência de Embriões
TXA ₂	tromboxana
UI	Unidades Internacionais
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
®	marca registrada
≤	menor ou igual
+	mais / positivo
°C	graus Celsius
>	maior
<	menor
=	igual
α	alfa
β	beta
-	negativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
Capítulo 1 – Eficácia da aplicação tópica de prostaglandinas da série E (PGE) no deslocamento de embriões para o útero de éguas	27
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 HIPÓTESE – Experimento I	30
2.2 OBJETIVOS - Experimento I	31
2.3 MATERIAL E MÉTODOS – Experimento I	31
2.4 RESULTADOS – Experimento I	39
2.5 HIPÓTESE – Experimento II	41
2.6 OBJETIVOS – Experimento II	41
2.7 MATERIAL E MÉTODOS – Experimento II	42
2.8 RESULTADOS – Experimento II	45
Capítulo 2 - Detecção de receptores de prostanóides do subtipo EP na tuba uterina e útero de fêmeas eqüinas	48
3 REVISÃO DE LITERATURA	48
3.1 HIPÓTESE	52
3.2 OBJETIVOS	52
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.4 RESULTADOS	57
4 DISCUSSÃO	68
5 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES	87
ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

Resguardadas as dificuldades relativas ao levantamento de dados precisos, das mais de 24 mil colheitas e 13 mil transferências de embrião (TE) eqüino realizadas no mundo no ano de 2005, segundo o último levantamento da “*International Embryo Transfer Society*” (IETS), o Brasil contribuiu com aproximadamente 40% deste total. Além disso, é importante ressaltar que, em 2005 foram realizadas cerca de 2500 transferências a mais do que no ano de 2004, representando um aumento de 21,7% no mundo e de 3,6% no Brasil. Estes dados são mais representativos se forem comparados em relação ao ano de 2003, sendo que a técnica cresceu 56,2% no país. Isto significa que a transferência de embriões na espécie eqüina ainda é uma técnica importante e em expansão, tanto em nível nacional como mundial.

Entretanto, de todos os embriões transferidos em 2005, não mais do que 3,5% (500) destes foram congelados, sendo que isto se deve principalmente às características intrínsecas ao próprio embrião eqüino, que dificultam o sucesso das técnicas de criopreservação.

É importante ressaltarmos que a criopreservação tem como princípio manter a vitalidade embrionária durante um longo período em estado de letargia, sendo que este deve ser um processo reversível, onde o embrião possa ser transferido para o útero de uma receptora após a descongelação. Isto permite a preservação de material genético de espécies e raças de animais que apresentem características desejáveis.

A criopreservação embrionária também simplifica o transporte, o que favorece a comercialização, tanto em nível nacional como internacional. Além disso, esta biotecnologia é de suma importância porque facilita o manejo de receptoras, diminuindo os custos com a sincronização dentro dos programas de TE, e possibilita a transferência de embriões até fora da estação reprodutiva.

Diante de tantas vantagens, porque tão poucos embriões eqüinos são criopreservados?

As principais restrições ao uso da criopreservação para embriões eqüinos devem-se às características inerentes ao próprio embrião. Embriões menores que 250-300 micrômetros (μm) e nos estágios iniciais de desenvolvimento, ou seja, mórula (Mo) e blastocisto inicial (Bi) sobrevivem melhor à criopreservação do que os embriões grandes ou em estágios mais avançados, tanto pelas técnicas convencionais de congelamento lento (MACLELLAN et al., 2002, 2003; MEIRA et al., 1993; POITRAS et al., 1994; SEIDEL et al., 1989; SLADE et al., 1985; SQUIRES; SEIDEL; McKINNON, 1989; SQUIRES; McCUE; VANDERWALL, 1999; YAMAMOTO et al., 1982) como pelas técnicas de vitrificação (HOCHI et al., 1994;

HOCHI; FUJIMOTO; OGURI, 1995; YOUNG; SQUIRES; SEIDEL JR., 1997; YOUNG et al., 1997; CARNEVALE et al., 2004). As hipóteses mais citadas para a baixa sobrevivência de embriões eqüinos mais “velhos”, ou seja, blastocistos expandidos (Bx) são: 1) desidratação insuficiente da blastocele; 2) menor permeabilidade ao crioprotetor devido a pequena relação superfície/volume e pela presença da cápsula acelular de natureza glicoprotéica, que começa a ser formada assim que o embrião entra no ambiente uterino; 3) devido a toxicidade dos crioprotetores (BRUYAS et al., 1993; HOCHI et al., 1994; HOCHI; FUJIMOTO; OGURI, 1995; YOUNG et al., 1997; LEGRAND et al., 2000, 2002; MACLELLAN et al., 2002, 2003).

Há poucos anos, também podíamos colocar como limitação o fato da égua disponibilizar um pequeno número de embriões, por se tratar de uma espécie monovulatória e poliéstrica estacional (salvo algumas raças que não raramente apresentam duplas ou triplas ovulações, como o Puro Sangue Inglês e aquelas com aptidão para a prática do hipismo). Este é um fator limitador às pesquisas por tornar os resultados mais demorados, em relação a outras espécies, e pouco confiáveis pelo pequeno número de embriões utilizados. No entanto, nos últimos anos, esta dificuldade vem sendo superada graças aos resultados promissores alcançados com os protocolos de superovulação testados principalmente por pesquisadores da Universidade do Colorado e da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu, utilizando o Extrato de Pituitária Eqüina (EPE) e o Hormônio Folículo Estimulante de origem eqüina (eFSH) (ALVARENGA et al., 2001, 2003; SCOGGIN et al., 2002; CARMO, 2003; MACHADO et al., 2003, 2004; PERES, 2004; SQUIRES, 2004; PERES et al. 2007).

O foco do problema então continua a ser a aquisição de embriões eqüinos jovens (Mo e Bi). Em virtude disto, até o momento, torna-se necessária que a recuperação embrionária seja realizada tão logo o embrião adentre o útero, ou seja, no 6º dia (D6) após a detecção da ovulação. Entretanto, alguns autores relatam que as taxas de recuperação são menores nesta data (SLADE et al., 1985; MEIRA et al., 1993; FERREIRA et al., 1997), possivelmente porque o embrião ainda esteja na tuba uterina na hora da colheita e/ou também pela dificuldade do técnico em identificar o embrião. Não bastasse isso, com esta idade (D6), alguns embriões já ultrapassaram o tamanho adequado para a criopreservação (OGURI; TSUTSUMI, 1974; SQUIRES, 1993; POITRAS et al., 1994; HOCHI; FUJIMOTO; OGURI, 1995; VANDERWALL, 1996). Fazendo uma comparação com embriões bovinos percebemos uma larga diferença, pois enquanto estes possuem de 140 a 170 μm de diâmetro no 6º e 7º dia (D6 e D7) e estão no estágio de Mo e Bi, respectivamente, os embriões eqüinos podem ter de 132 a 756 μm no D6 (SQUIRES, 1993; VANDERWALL, 1996) e se desenvolvem

rapidamente podendo alcançar até 1460 μm (VANDERWALL, 1996) em 24 horas (D7), alcançando o estágio de Bx.

Estes problemas são explicados, pelo menos parcialmente, pelo tempo que o embrião eqüino leva para ser transportado através da tuba uterina e entrar no útero. Este período é mais longo na égua do que em fêmeas de outras espécies, durando de 130 (5,5 dias) a 144 horas (6,0 dias) (BETTERIDGE et al., 1982; FREEMAN et al., 1991), ou ainda, de 144 a 156 horas (6,5 dias), segundo estudos mais recentes (BATTUT et al., 1998, 2000). Sendo que este transporte é controlado pelo próprio embrião eqüino pela produção de prostanóides, mais especificamente pela produção da prostaglandina E_2 (PGE_2).

Acredita-se que a PGE_2 atue relaxando a musculatura lisa e circular da região do istmo da tuba uterina, permitindo que o embrião entre no lúmen uterino (WEBER; WOODS; LICHTENWALNER, 1995). Alguns experimentos parecem comprovar o fundamental papel da PGE_2 sobre o transporte embrionário (WEBER et al., 1991a; ROBINSON; NEAL; ALLEN, 1998, 2000), com o aceleração deste após a aplicação da prostaglandina sobre a tuba.

Apesar da ocorrência de recuperação antecipada de embriões relatada por Weber et al. (1991a) e Robinson, Neal e Allen (1998, 2000) estes trabalhos não mais foram repetidos, e tão pouco, foi estabelecida a importância destes resultados para o sucesso das técnicas de criopreservação para a espécie. Isto impulsionou a realização do nosso primeiro experimento.

Contudo, logo no início da pesquisa nos deparamos com a nossa primeira dificuldade, que foi em relação à aquisição da droga. Como as prostaglandinas da série E não estão disponíveis no país, são de uso restrito a hospitais e são lembradas por seu alto risco de abortamento, a importação do produto comercial tornou-se difícil e os altos custos tornaram a tentativa impraticável. Nossa alternativa foi utilizar uma PGE_2 liofilizada para uso laboratorial e tentar reproduzir, de alguma forma, os produtos comerciais disponíveis no mercado internacional.

Com a orientação de um farmacêutico incorporamos a droga a um gel de composição semelhante aos utilizados nos produtos disponíveis comercialmente e, além da forma de aplicação tópica por vídeo-laparoscopia já descrita na literatura, testamos uma maneira nunca documentada de deposição tópica sobre a junção útero-tubárica. Adicionalmente, o experimento foi realizado utilizando éguas superestimuladas com EPE para fornecer um maior número de embriões. Os resultados não foram animadores, mas o pequeno número de animais utilizados e a grande instabilidade da droga provavelmente prejudicaram os resultados.

Em busca de novas alternativas, descobrimos estar disponível no país a prostaglandina da série 1 (PGE_1) e um análogo desta (misoprostol), que são drogas de ação semelhante a PGE_2 na tuba uterina humana (SANDBERG; INGELMAN-SUNDBERG; RYDEN, 1964), mais estáveis e de custo mais acessível em comparação à PGE_2 , entretanto, nunca antes utilizadas com a intenção de antecipar a recuperação embrionária em espécie alguma. Atualmente no país a PGE_1 é utilizada pelo Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico, localizado em São Paulo-SP, para a elaboração de um produto, de uso local, contra a disfunção erétil humana e o análogo misoprostol é utilizado pela Hebron Farmacêutica Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica, com sede em Caruaru, PE, como produto ativo do “Prostokos[®]”, um agente de maturação do colo uterino e indutor do trabalho de parto. A PGE_1 e o misoprostol foram gentilmente doados para o nosso experimento e as matérias primas estavam nas concentrações de 100 e 1%, respectivamente, sendo as mesmas utilizadas nos produtos por eles desenvolvidos.

No segundo experimento, optamos por efetuar apenas a aplicação tópica sobre a junção útero-tubárica, com acesso pela via intra-uterina, pela maior facilidade do procedimento em comparação a vídeo-laparoscopia, como constatado no experimento 1, e realizamos duas aplicações, ao invés de uma, visando manter o estímulo sobre a tuba uterina. Outra mudança em relação ao primeiro experimento foi a utilização de uma dosagem maior de EPE para a superestimulação ovariana das éguas, o que foi possível graças a doação do produto. Apesar de não conseguirmos antecipar a descida do embrião para o útero utilizando as duas drogas, o resultado utilizando o misoprostol, em relação à recuperação embrionária no D6, foi muito satisfatório e superior ao descrito até hoje na literatura.

Estes dois experimentos, apesar de muito conturbados e cheio de detalhes que provavelmente influenciaram os resultados, alimentaram nossas esperanças em relação a recuperação de embriões com características favoráveis à criopreservação. Entretanto, tivemos de admitir que ainda assim estes resultados poderiam ter sido um acaso, devido ao número de animais utilizados e por não termos maior embasamento na literatura. Diante deste quadro precisávamos promover um retrocesso nas pesquisas e comprovar que realmente as prostaglandinas da série E tem ação sobre a tuba uterina eqüina. Isto seria possível através da detecção dos diferentes subtipos de receptores de prostanóides envolvidos e a sua localização nos diferentes segmentos da tuba uterina e no útero de fêmeas eqüinas. Assim nasceu o terceiro e último experimento.

No terceiro experimento, por termos um pequeno número de tratos reprodutivos disponíveis, conseguimos por enquanto apenas fazer um estudo qualitativo dos receptores,

mas o conhecimento da localização destes receptores no trato genital feminino nos forneceu embasamento para os primeiros experimentos realizados e isto pode auxiliar de maneira inigualável o entendimento dos fatores envolvidos na migração do embrião eqüino pela tuba uterina, do mecanismo de interação materno-embrionária durante o período de reconhecimento materno e de outras informações relacionadas ao ambiente tubárico.

Em suma, a detecção inédita dos receptores das prostaglandinas da série E e o conhecimento do papel das prostaglandinas no deslocamento do embrião eqüino para o útero, nos permite pensar agora no aprimoramento do nosso protocolo, permitindo a recuperação antecipada de embriões que, por serem mais jovens e, conseqüentemente menores, apresentarão grande potencial de sobrevivência à criopreservação. Além disso, com os avanços e resultados atuais obtidos com as técnicas de superestimulação ovariana, vimos que é interessante e viável a utilização simultânea desta biotécnica com este inédito protocolo de estimulação da tuba uterina para recuperação de embriões mais jovens.

Capítulo 1 – Eficácia da aplicação tópica de prostaglandinas da série E (PGE) no deslocamento de embriões para o útero de éguas

2 REVISÃO DE LITERATURA

As prostaglandinas são membros da família dos eicosanóides e são produzidas por quase todas as células do corpo. Elas são sintetizadas principalmente a partir do ácido araquidônico, presente na membrana celular. Ativada por algum estímulo fisiológico, patológico ou farmacológico a fosfolipase A₂ (PLA₂) libera o ácido araquidônico da membrana celular através de uma reação de hidrólise. O ácido araquidônico é então oxigenado pela ação de enzimas ciclooxigenases (COX) para formar a PGG₂ e subsequente reduzida pela mesma COX para produzir um intermediário instável, a PGH₂. A PGH₂ então serve como substrato para várias enzimas específicas que produzem prostanóides estáveis, que incluem a PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF_{2α} e TXA₂ (PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006). O mecanismo que converte a PGH₂ em um produto ou em outro não é bem conhecido (PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006).

Em relação ao sistema genital, a vesícula seminal é um órgão conhecido por conter altas concentrações de PGE₂, sendo que a primeira reportagem de isolamento foi realizada em 1977 por Ogino et al. em vesículas seminais bovinas. A próstata, testículos, placenta, glândula mamária e bexiga também são órgãos onde já foram mostrados níveis de PGE (PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006).

Nas tubas uterinas, as PGE parecem ter um papel muito especial principalmente para a espécie equina, como abordaremos neste primeiro capítulo, entretanto, com muito ainda a ser decifrado.

Embora as tubas uterinas de outras espécies de animais domésticos transportem ovócitos fecundados e não fecundados para o útero, as tubas de éguas transportam apenas ovócitos fecundados e retém os não-fecundados por vários meses até que estes degeneram (VAN NIEKERK; GERNEKE, 1966; BETTERIDGE; MITCHELL, 1974, 1975; DAVID, 1975; ONUMA; OHNAMI, 1975). Outra característica peculiar é que enquanto os embriões de suínos entram no útero entre 24 e 54 horas após a ovulação (OXENREIDER; DAY, 1965), os de bovino entre 57-86 horas (CRISMAN; MCDONALD; WALLACE, 1980) e os de ovino entre 60-66 horas (HOLST, 1974), o tempo de transporte do embrião equino pela tuba é

relativamente mais longo: de 130 (5,5 dias) a 144 horas (6,0 dias) (BETTERIDGE et al., 1982; FREEMAN et al., 1991) ou ainda, de 144 (6,0 dias) a 156 horas (6,5 dias) (BATTUT et al., 1998, 2000). Baseado neste dado, Battut et al. (2000) propõem que quando a ovulação é checada uma ou duas vezes por dia é preferível realizar a colheita do embrião equino apenas a partir de 156 horas após a primeira observação do corpo lúteo.

O transporte pela tuba uterina parece ser iniciado por uma característica do embrião equino, visto que embriões de seis dias (D6) quando colocados na tuba uterina de éguas que estavam no segundo dia do diestro (D2) foram transportados para o útero antes do tempo previsto (FREEMAN et al., 1992). A prostaglandina E_2 (PGE_2) é a responsável pelo início deste transporte (GANDOLFI et al., 1992), pois começa a ser secretada pelo embrião equino exatamente antes do momento esperado para o transporte, ou seja, a partir do 5º dia após a ovulação (D5) (WEBER et al., 1991b; WEBER; WOODS, 1993). Weber e Woods (1993) observaram que embriões equinos de seis dias incubados “*in vitro*” secretaram quantidades mínimas de proteínas, esteróides e $PGF_{2\alpha}$, entretanto, secretaram quantidades relativamente altas de PGE_2 , $42 \pm 11,5$ pg (10^{-12} g) por embrião. Essa secreção embrionária não foi detectada no 3º e 4º dia, mas, no 5º dia, já se detectou uma quantidade de $5,7 \pm 1,0$ pg de PGE_2 por embrião. E esta produção de PGE_2 aumenta de forma positiva e linear com o aumento da idade do embrião (WEBER et al., 1992a).

Mesmo após chegar ao útero os embriões equinos continuam a secretar PGE_2 e outras prostaglandinas como a $PGF_{2\alpha}$ e a PGI_2 (WATSON; SERTICH, 1989). Assim, além da secreção de quantidades apreciáveis de PGE_2 , a liberação significativa de $PGF_{2\alpha}$, principalmente entre os dias 10 e 18 após a ovulação, pode evidenciar que as duas prostaglandinas são necessárias para estimular as contrações e o relaxamento miométrial indispensáveis para propulir o embrião através do lúmen uterino e distribuir o sinal anti-luteolítico (STOUT; ALLEN, 2002).

A PGE_2 parece atuar relaxando a musculatura lisa e circular do esfíncter do istmo (WEBER; WOODS; LICHTENWALNER, 1995), apesar da PGE_2 apresentar *in vitro* uma significativa maior ligação na região da ampola do que no istmo, tanto no 2º como no 5º dia após a ovulação (WEBER et al., 1992b). Isto pode estar relacionado com o fato de que todos os embriões equinos ficam retidos perto da junção istmo-ampolar até o 5º dia (WEBER; WOODS; AGUILAR, 1996b). A PGE_2 também se liga ao tecido endometrial equino durante o período de mobilidade do embrião (VANDERWALL; WOODS; WEBER, 1993), promovendo um aumento da contratilidade e do tônus uterino (GASTAL et al., 1998;

STOUT; ALLEN, 2001). Entretanto, a inserção de vesículas embrionárias simuladas que liberavam baixas doses de PGE₂ no útero, não tiveram alteração do seu transporte dentro do útero em comparação a vesículas falsas que não liberavam PGE₂ (VANDERWALL et al., 1993).

Estudos demonstram que formas sintéticas da PGE₂ são capazes de induzir o relaxamento cervical no pré-parto não apenas de mulheres (GRANSTRÖM; EKMAN; ULMSTEN, 1990), mas, também em novilhas (DUCHENS et al., 1993), porcas (VAJE et al., 1980), ovelhas (BARRY et al., 1990) e éguas (RIGBY et al., 1998; VOLKMANN; BERTSCHINGER; SCHULMAN, 1995).

Além disso, a PGE₂ também parece estar envolvida na manutenção inicial do corpo lúteo de éguas (VANDERWALL et al., 1994) de vacas (THIBODEAUX et al., 1992) e de ovelhas (PRATT; BUTCHER; INSKEEP, 1977).

Na espécie humana, as prostaglandinas, destacando-se as do grupo E, têm um importante papel na maturação do colo uterino e na indução do trabalho de parto. Inicialmente, utilizou a PGE₂ e seus análogos, mas, como a droga tem alto custo e não está disponível no Brasil, atualmente o misoprostol, um análogo sintético da PGE₁, tem recebido maior atenção, tendo as vantagens de maior estabilidade farmacodinâmica em relação às demais prostaglandinas (estável à temperatura ambiente), menor custo, facilidade de conservação e estocagem, e boa via de administração (oral, vaginal ou endocervical) (WING et al., 1995; BUSER; MORA; ARIAS, 1997). O misoprostol também já foi testado com sucesso em ovelhas para promover o relaxamento cervical necessário para a inseminação artificial (LEETHONGDEE et al., 2007).

Devido ao fato das prostaglandinas da série E serem importantes na indução do parto em mulheres, podem ser estrategicamente utilizadas na recuperação de embriões eqüinos mais jovens e com maiores chances de suportar os processos de criopreservação. Como já foi salientada na introdução, a criopreservação de embriões eqüinos é mais bem sucedida se aplicada em embriões em estágios de mórula ou blastocisto inicial, mas a taxa de recuperação não-cirúrgica para embriões neste estágio de desenvolvimento é baixa, por isso a manipulação farmacológica do transporte pela tuba uterina pode ser uma alternativa para o problema.

Diversos pesquisadores já tentaram manipular o transporte embrionário no intuito de recuperar embriões eqüinos mais precocemente. Weber et al. (1991a) não obtiveram sucesso após um estudo preliminar em que a PGE₂ foi administrada via intramuscular, intra-uterina ou intraperitoneal no 3º dia após a ovulação, entretanto, eles recuperaram 6 de 11 embriões (55%) no 4º dia, após uma contínua infusão de PGE₂ por minibombas implantadas cirurgicamente

dentro da tuba uterina. Robinson, Neal e Allen (1998, 2000) também obtiveram sucesso (60% de recuperação no 5º dia) após deposição de 0,2 mg de PGE₂ suspendida em 0,5 ml de gel sobre a superfície externa da tuba uterina através de um procedimento de laparoscopia. No entanto, Arruda et al. (comunicação pessoal) não conseguiram repetir os resultados de Robinson, Neal e Allen (1998, 2000), recuperando apenas um embrião de seis tentativas (17%) no D5.

Outras tentativas de se antecipar à descida de embriões eqüinos para o útero como a dilatação cervical, infusão intra-uterina no D3 (3º dia após a ovulação) de meio de PBS ou de glicogênio (WEBER; WOODS; AGUILAR, 1996a), deposição de embriões de coelho dentro do útero da égua (GEARY; WEBER; WOODS, 1989) e a administração diária de 250 mg de progesterona exógena nos dias que antecederam a colheita (HINRICHS; WATSON, 1991) não foram bem sucedidas.

Apesar do sucesso relatado por Robinson, Neal e Allen (1998, 2000) na descida antecipada do embrião com o uso da PGE₂ (Prostin E₂[®] - Pharmacia), a técnica utilizada por eles (laparoscopia) é muito laboriosa e difícil de ser aplicada em medicina veterinária, fora de um centro de pesquisa. Além disso, este produto é de difícil acesso no Brasil, como já salientado, e a importação, extremamente cara, inviabiliza a sua utilização. Por outro lado, a utilização da PGE₁ ou de um análogo (misoprostol) poderia ser uma alternativa viável, visto que atualmente este produto está disponível no país e que segundo Sandberg, Ingelman-Sundberg e Ryden (1964) o efeito de relaxamento, na parte distal da tuba uterina, e o efeito de contração, na porção inicial, são da mesma ordem para a PGE₁ e PGE₂ em mulheres. Entretanto, não há qualquer relato na literatura sobre o uso da PGE₁ em éguas. Em virtude disto, faz-se necessário também este estudo.

2.1 HIPÓTESE – Experimento I

A aplicação tópica da prostaglandina E₂ (PGE₂), via laparoscopia e intra-uterina, antecipa a descida do embrião eqüino para o útero de éguas.

2.2 OBJETIVOS - Experimento I

- Avaliar a eficácia da prostaglandina E₂ (PGE₂) em acelerar a migração de embriões eqüinos da tuba uterina para o útero, aumentando a taxa de recuperação embrionária no 5º dia após a detecção da ovulação;
- Comparar dois métodos de administração da PGE₂: o cirúrgico, no qual a administração é por via laparoscópica, e o não-cirúrgico, no qual a PGE₂ é depositada na junção útero-tubárica do lado ipsilateral à ovulação;
- Determinar se o uso exógeno da PGE₂ é viável para se recuperar um maior número de embriões eqüinos com grande potencial de sobrevivência à criopreservação (embriões ≤ 250-300 µm).

2.3 MATERIAL E MÉTODOS – Experimento I

Informações relativas ao local de execução, período de desenvolvimento, animais utilizados, protocolo de tratamento superestimulatório, protocolos de administração da PGE₂ e técnica de recuperação embrionária são descritos a seguir.

2.3.1 Local

O experimento foi conduzido no Centro de Biotecnologia de Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, localizado no Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS), Pirassununga, São Paulo. Referências geográficas: latitude 21°50'46'' Sul; longitude 47°25'33'' Oeste; altitude 627 metros.

2.3.2 Período de desenvolvimento

O experimento foi realizado durante os meses de janeiro a março de 2006.

2.3.3 Animais

Foram utilizadas cinco éguas de diferentes raças, de três a 10 anos de idade, com boa condição corporal para a função reprodutiva, escore 4 (1-6) (CARROLL; HUNTINGTON, 1988) e histórico reprodutivo favorável, além de não apresentarem alteração ovariana, cervical e/ou uterina detectada por palpação retal, ultra-sonografia, vaginoscopia e/ou exame citológico. Duas éguas foram utilizadas no grupo cirúrgico e três no grupo não cirúrgico.

Pelo pequeno número de animais disponíveis e pelo forte embasamento da literatura em que os embriões eqüinos não migram para o útero antes de 130 horas após a ovulação (BETTERIDGE et al., 1982; FREEMAN et al., 1991; BATTUT et al., 1998, 2000), optamos por não utilizar um grupo controle (sem administração de PGE₂).

2.3.4 Manejo e instalações

As éguas foram mantidas sob sistema de rotação em piquetes de capim elefante (*Pennisetum purpureum*). Os animais tinham livre acesso a água e a suplementação mineral.

2.3.5 Sêmen

Foi utilizado sêmen fresco proveniente de um único garanhão com fertilidade conhecida. O sêmen foi diluído na proporção 2:1 com extensor a base de leite desnatado¹. As

¹ Botu-Sêmen® - Biotech Botucatu, Botucatu-SP

doses utilizadas na inseminação artificial continham no mínimo um bilhão de espermatozóides móveis (dose utilizada em protocolos de superovulação).

2.3.6 Tratamento superestimulatório

As éguas foram submetidas a um tratamento superestimulatório com Extrato de Pituitária Equina (EPE)² visando uma maior disponibilidade do número de embriões. O tratamento foi iniciado no 5º ou 6º dia do diestro, sendo que as éguas não apresentavam folículos com diâmetro maior que 25 mm e a dose utilizada foi a de seis (6) mg de EPE, via intramuscular, uma vez ao dia. Nos dois primeiros dias de tratamento, uma hora após a administração do EPE, as éguas receberam 5 mg (1 ml) do luteolítico Dinoprost Trometamina³, via intramuscular. A partir do momento em que as éguas apresentaram ao menos um folículo com diâmetro igual ou superior a 35 mm, o tratamento com EPE foi interrompido e a(s) ovulação(ões) foi (foram) induzida(s) com a aplicação endovenosa de 2500 UI de Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)⁴. Neste momento também foi realizada a inseminação artificial pelo método convencional, utilizando uma dose mínima de um bilhão de espermatozóides móveis, em virtude da superovulação (Figura 1). O acompanhamento folicular foi realizado por palpação retal e ultra-som (Aloka, modelo SSD-500 com transdutor linear de 5,0 MHz).

² Lote 004, de 12/2004, produzido pela Central Unicórnio, Brasília

³ Lutalyse® - Pfizer, Paulínia, SP

⁴ Vetecoi® 5000UI - Calier, SP

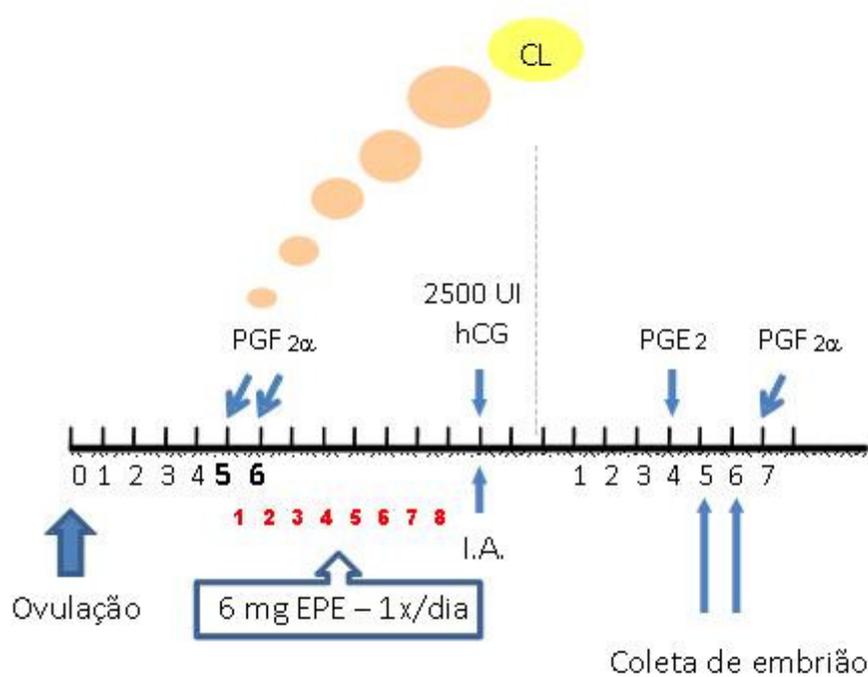


Figura 1 - Protocolo para superestimulação ovariana de éguas utilizando baixa dose de EPE e aplicação de PGE₂ para a recuperação antecipada de embriões - Pirassununga - 2006

2.3.7 PGE₂

Devido à dificuldade de obtenção do produto comercial (dinoprostone – análogo sintético da PGE₂) pronto para o uso⁵, optou-se por utilizar uma prostaglandina E₂ liofilizada⁶ para uso em laboratório. A prostaglandina E₂ foi diluída em gel à base de triacetin (92%) e dióxido de silício coloidal (8%), sob capela de fluxo laminar. A concentração final do produto manipulado foi de 0,4 mg de PGE₂ / ml de gel. O produto foi conservado sob refrigeração até a sua utilização, sendo homogeneizado imediatamente antes de cada uso.

Três éguas foram submetidas ao tratamento não-cirúrgico e duas ao procedimento cirúrgico (vídeo-laparoscopia) para a aplicação da PGE₂, conforme descrito a seguir.

⁵ Prepidil gel® - Pharmacia & Upjohn, USA; Prostin® E₂ Vaginal gel – Pfizer, Austrália

⁶ Cayman Chemical, MI, USA – código 14010

2.3.7.1 Protocolo de aplicação tópica da PGE₂ via vídeo-laparoscopia (2 animais)

As éguas submetidas a este tratamento foram mantidas em jejum alimentar por 24 horas e hídrico por 12 horas antes da realização do procedimento de vídeo-laparoscopia para a administração da PGE₂. O procedimento foi realizado no 4º dia após a detecção da(s) ovulação(ões), no(s) lado(s) ipsilateral(is) à(s) ovulação(ões) e o acesso cirúrgico utilizado foi a fossa paralombar.

As éguas foram contidas em tronco de palpação e o local do campo cirúrgico foi higienizado com água e sabão, sendo utilizada para a anti-sepsia uma solução de iodopovidine.

A seguir os animais foram anestesiados utilizando-se o seguinte protocolo anestésico: Xilazina⁷ (0,7 mg/kg, IV) + Butorfanol⁸ (0,03 mg/kg, IV) três a cinco minutos após a administração da xilazina + anestesia local com cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstritor⁹.

O campo cirúrgico foi delimitado e uma incisão de cerca de um (1) cm foi realizada na pele à aproximadamente 13 cm abaixo do aspecto dorsal da tuberosidade coxal, dorso-cranial ao músculo oblíquo abdominal interno. Para penetrar no flanco foram utilizados trocarer e cânula (11,5 mm) e um laparoscópio rígido¹⁰ com um ângulo de visão de 30º, conectado a um monitor. O abdômen foi distendido com CO₂, até que o ovário ipsilateral, tuba uterina e ponta do corno uterino pudessem ser visualizados. Um segundo trocarer e cânula com ponta fina em bisel (7,5 mm) foram então inseridos ventralmente (aproximadamente 5 cm) ao laparoscópio. Por meio desta segunda cânula o gel contendo a PGE₂ foi injetado e gotejado ao longo da superfície externa da tuba uterina. A dose utilizada foi de 0,2 mg de PGE₂ (0,5 ml de gel) por cada tuba uterina tratada (Figura 2).

⁷ X-JECT E[®], Phoenix Scientific, Inc, St Joseph, MO

⁸ Torbugesic[®], Fort Dodge, Campinas.

⁹ Cloridrato de lidocaína 2%[®] sem vasoconstritor, Hipolabor Farmacêutica Ltda, Sabará, MG.

¹⁰ Ferrari Medical, São Paulo.

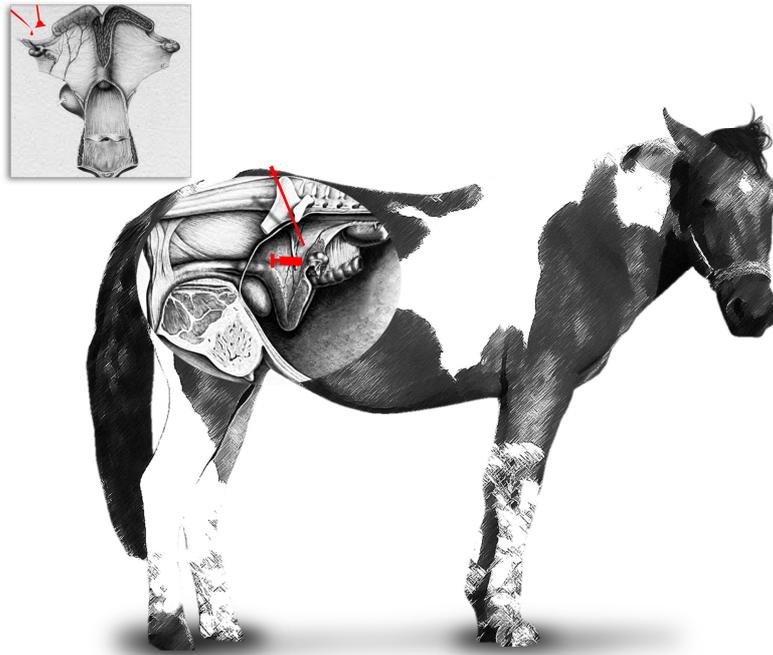


Figura 2- Ilustração representativa da aplicação tópica de PGE₂ na tuba uterina por vídeo-laparoscopia - Pirassununga - 2006

Após a aplicação do gel a cânula foi removida e a síntese cirúrgica foi realizada em plano único utilizando pontos separados do tipo “U”, com fio não-absorvível (Nylon). As éguas receberam suporte pós-cirúrgico com antibiótico de amplo espectro a base de Sulfadoxina e Trimetoprim¹¹ (10 mg/kg, IV) e antiinflamatório a base de Fenilbutazona¹² (4,4 mg/kg, IV).

Vinte e quatro horas após a deposição do gel (D5) foi realizada a primeira tentativa de recuperação embrionária pelo método não-cirúrgico. Nos casos de não haver recuperação embrionária, a colheita foi repetida entre o sexto (D6) e sexto dia e meio (D6,5) após a detecção da(s) ovulação(ões) (Figura 1).

Após a segunda tentativa de colheita de embriões, as éguas foram tratadas com 7,5 mg (1,5 ml) de Dinoprost Trometamina¹³, via intramuscular.

¹¹ Borgal[®], Intervet, São Paulo.

¹² Fenilbutazona[®] - injetável, Ouro Fino Saúde Animal, Ribeirão Preto.

¹³ Lutalyse[®] - Pfizer, Paulínia, SP.

2.3.7.2 Protocolo de aplicação tópica de PGE₂ via intra-uterina (3 animais).

O procedimento foi realizado no 4º dia após a detecção da(s) ovulação(ões) (Figura 1).

As éguas foram contidas em tronco de palpação e a higienização, das regiões vulvar e perivulvar, foi realizada com água e sabão. Uma pipeta de inseminação artificial flexível¹⁴ de 75 cm de comprimento (contendo no seu interior uma palheta de sêmen com 0,5 ml do gel, correspondendo a 0,2 mg de PGE₂) foi introduzida no corno uterino ipsilateral à ovulação. Com uma das mãos introduzida no reto, a bainha foi direcionada até a ponta do corno. Com o auxílio de um aplicador, o gel foi depositado na região da junção útero-tubárica, sendo realizada uma leve massagem na região (Figura 3). No caso de ovulações em ambos os lados, o procedimento foi repetido também no lado contralateral.

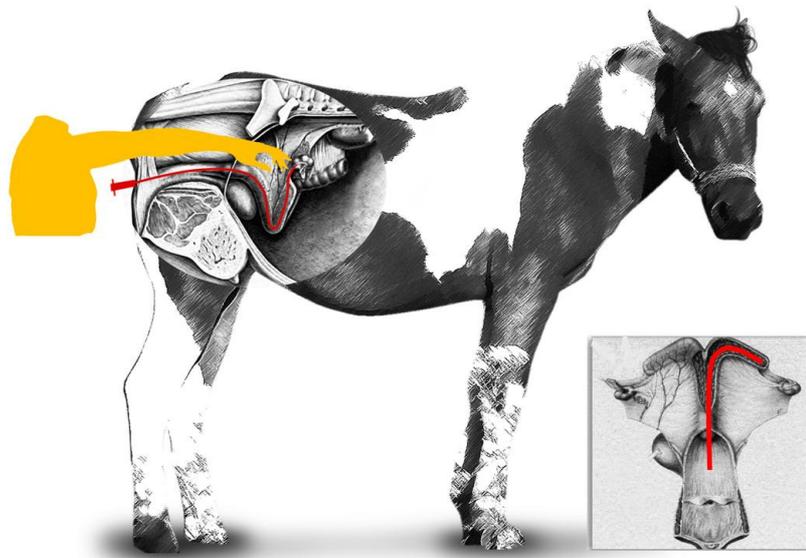


Figura 3 - Ilustração representativa da deposição local de PGE₂ na junção útero-tubárica pela via intra-uterina - Pirassununga – 2006

Após aproximadamente três (3) horas da deposição do gel, o útero das éguas foi examinado por ultra-som para uma possível detecção de acúmulo de líquido intra-uterino.

¹⁴ Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre, RS

Assim como no primeiro protocolo, 24 horas após a deposição do gel (D5) foi realizada uma primeira tentativa de recuperação embrionária pelo método não-cirúrgico, sendo que, na frustração deste, uma nova tentativa foi realizada entre o 6º (D6) e D6,5 dia após a detecção da(s) ovulação(ões) (Figura 1). Após a última tentativa de colheita as éguas receberam 7,5 mg (1,5 ml) de Dinoprost Trometamina¹⁵, via intramuscular.

2.3.8 Colheita, rastreamento e manipulação dos embriões

No dia da colheita do(s) embrião(ões) as éguas foram examinadas por palpação retal, determinando-se as condições de tensão uterina e cervical, e realizou-se exploração ultrassonográfica via transretal do útero e ovários, para avaliar o aspecto do útero e do(s) corpo(s) lúteo(s) e para se detectar a possível presença de folículos de diestro.

Posteriormente, mantendo-se as éguas devidamente contidas em tronco de palpação, a região perineal das mesmas foi higienizada com água e sabão.

Para o procedimento da técnica de colheita dos embriões utilizou-se uma sonda de Foley modelo Bivona^{®16}. Após a introdução via transcervical, com mão enluvada, o balonete (“cuff”) localizado no ápice da sonda foi inflado com 45 ml de ar, de forma a ficar fixado na abertura cervical e impedir o refluxo do meio infundido no útero. Realizou-se a infusão de um litro, por lavado uterino, da solução de Ringer com Lactato de Sódio (ALVARENGA; LANDIM-ALVARENGA; MEIRA, 1993) aquecida a 37° C, a qual foi drenada do útero por gravidade, passando por um filtro de embriões de 75µm. Realizou-se um total de três lavados uterinos por égua.

Após a realização dos lavados o conteúdo do filtro foi substituído por uma solução de manutenção DPBS modificado¹⁷ (solução salina fosfatada tamponada de Dulbecco-modificado). Em seqüência, o conteúdo do filtro foi transferido para uma placa de Petri de 100 x 20 mm com o fundo demarcado e o filtro lavado com 20 ml de DPBS, sob pressão, que foi realizada com auxílio de uma seringa de 20 ml conectada a uma agulha 30 x 10, de modo a remover todo o conteúdo do filtro para dentro da placa.

¹⁵ Lutalyse® - Pfizer, Paulínia, SP.

¹⁶ Bivona Medical Technologies, Gary, IN, EUA.

¹⁷ Nutricell Nutrientes Celulares Ltda, Campinas, S.P.

O rastreamento dos embriões foi realizado com auxílio de um microscópio estereoscópico (lupa) sob aumento de 10 vezes e a classificação embrionária sob aumento de 40 vezes. Os embriões encontrados foram colocados em placa de petri 35 x 10 mm contendo Meio de Manutenção TQC - Holding plus¹⁸, para a realização da identificação do estágio de desenvolvimento, da morfologia e da qualidade (grau 1 = excelente; grau 2 = bom; grau 3= regular; grau 4 = ruim; grau 5 = degenerado) conforme McKinnon e Squires (1988), além da mensuração do diâmetro para o qual foi utilizada uma ocular graduada acoplada ao microscópio estereoscópico.

2.3.9 Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados pelo programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pela análise dos resíduos. Os dados (variáveis dependentes) que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidos à transformação logarítmica [$\text{Log}(X+1)$], pela raiz quadrada [$\text{RQ}(X+1/2)$] e pelo arco-seno [$\text{Arcsin}(\text{RQ } 1)$]. Como mesmo após as transformações dos dados, ainda não respeitaram as premissas, ou seja, não respeitaram a curva Gaussiana, foram analisados por uma análise não-paramétrica. Assim, para a análise foi utilizado o Teste Exato de Fischer, considerando-se como nível de significância o valor de 0,5%.

2.4 RESULTADOS – Experimento I

O tratamento superestimulatório durou em média 5,2 dias (4-7 dias), sendo que 40% das éguas (2/5) tiveram ovulações duplas. Os dados encontram-se sumarizados no apêndice A.

Em relação à administração por vídeo-laparoscopia salientamos que a visualização do ovário e da tuba uterina foi relativamente rápida, mas, que exige extrema habilidade técnica.

¹⁸ Bioniche, USA / Nutricell Nutrientes Celulares Ltda, Campinas, S.P.

Durante a deposição tópica observamos que, devido à temperatura interna da égua, o gel perdeu sua consistência e tornou-se mais fluido, escorrendo pela tuba. Poucos segundos após a administração notamos evidente vaso dilatação da região banhada pela prostaglandina (Figura 4).

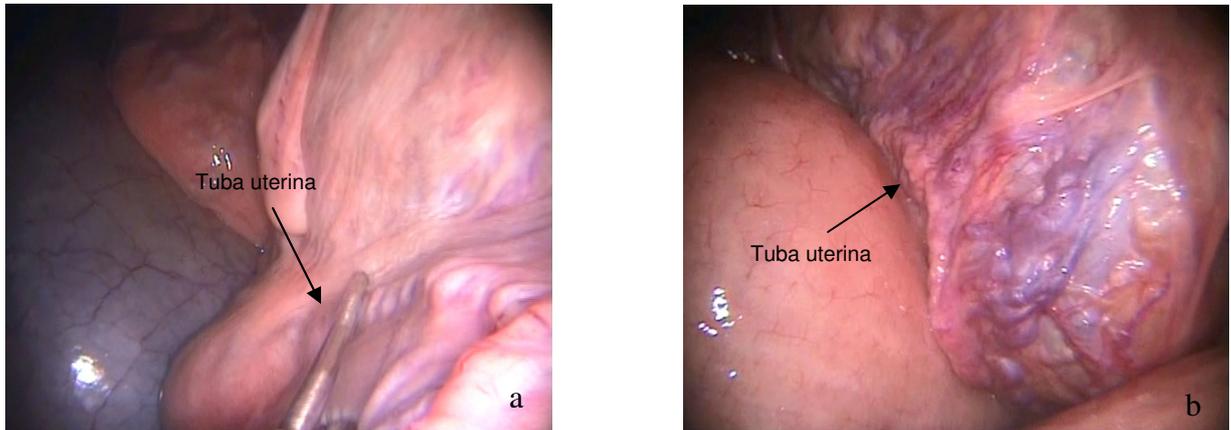


Figura 4 - Administração tópica de PGE₂ na tuba uterina por vídeo-laparoscopia (a) e posterior vasodilatação (b) - Pirassununga - 2006

A administração pela via intra-uterina foi realizada sem muitas dificuldades e intercorrências.

Não houve recuperação de embriões no quinto dia após a ovulação (D5) para ambos os métodos.

Em relação à qualidade dos lavados uterinos, uma das éguas do grupo não-cirúrgico apresentou uma leve turvação do primeiro lavado.

Na segunda tentativa de recuperação embrionária realizada entre o D6-6,5 foram recuperados dois embriões das cinco éguas (40%), sendo um obtido de uma das éguas submetidas a vídeo-laparoscopia e outro de uma égua submetida à técnica não-cirúrgica. A taxa de recuperação embrionária em relação ao número de ovulações foi de apenas 28,57% (2/7) considerando ambos os grupos. Apesar do pequeno número de animais utilizados não foi constatada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos em relação à taxa de recuperação embrionária no D6-6,5 (Tabela 1).

Dos embriões recuperados, um apresentava-se no estágio de Mórula compacta (Mc) com qualidade 1 e aproximadamente 150 μ m de diâmetro, enquanto o outro era um embrião em fase de blastocisto inicial (Bi) com qualidade 1,5 com cerca de 166 μ m de diâmetro.

Tabela 1 - Taxa de recuperação embrionária, no 5° e 6-6,5° dia após a ovulação, de éguas que foram tratadas com PGE₂ pelo método não-cirúrgico ou por vídeo-laparoscopia - Pirassununga - 2006

	Grupo Não-cirúrgico	Grupo cirúrgico	Total
Número de animais	3	2	5
Número de ovulações	4	3	7
Embriões recuperados no D5 (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Embriões recuperados no D6-6,5 (% por ovulação)	1 (25%) ^a	1 (33,33%) ^a	2 (28,57%)

Valores seguidos por letras minúsculas distintas na linha diferem entre si (P<0,05)

2.5 HIPÓTESE – Experimento II

A aplicação exógena de prostaglandina E₁ ou de seu análogo (misoprostol 1%) na região da junção útero-tubárica, ipsilateral a ovulação, de éguas promove a recuperação antecipada de embriões.

2.6 OBJETIVOS – Experimento II

- Desenvolver e avaliar a eficácia de um protocolo para a aplicação exógena de prostaglandina E₁ a 100% ou de seu análogo (misoprostol 1%) na região da junção útero-tubárica de éguas, visando a recuperação antecipada de embriões de éguas superestimuladas com Extrato de Pituitária eqüina;
- Comparar a taxa de recuperação embrionária dos diferentes grupos no 5° (D5) e 6-6,5° (D6-6,5) dia após a detecção da ovulação.

2.7 MATERIAL E MÉTODOS – Experimento II

Informações relativas ao local de execução do experimento, período de desenvolvimento, animais utilizados, manejo, protocolo de tratamento superestimulatório, protocolo de administração da prostaglandina E₁ ou de seu análogo e procedimento para a recuperação embrionária são descritos a seguir.

2.7.1 Local

O experimento foi conduzido no Centro de Biotecnologia de Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, localizado no Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS), Pirassununga, São Paulo. Referências geográficas: latitude 21°50'46'' Sul; longitude 47°25'33'' Oeste; altitude 627 metros.

2.7.2 Período de desenvolvimento

O experimento foi realizado nos meses de janeiro e fevereiro de 2007.

2.7.3 Animais

Foram utilizadas 10 éguas de diferentes raças, de três a 17 anos de idade, com escore de 4 a 5 (1 a 6) (CARROLL; HUNTINGTON, 1988) e histórico reprodutivo favorável, além de não apresentarem alteração ovariana, cervical e/ou uterina detectada por palpação retal, ultra-sonografia, vaginoscopia e/ou exame citológico. Os animais foram divididos de forma aleatória em dois grupos experimentais (PGE₁ e Misoprostol).

Devido o pequeno número de animais disponíveis e pelo forte embasamento da literatura em que os embriões eqüinos não migram para o útero antes de 130 horas após a ovulação (BETTERIDGE et al., 1982; FREEMAN et al., 1991; BATTUT et al., 1998, 2000), optamos por não utilizar um grupo controle.

2.7.4 Manejo e instalações

As éguas foram mantidas sob sistema de rotação em piquetes de capim elefante (*Pennisetum purpureum*). Os animais tinham livre acesso a água e a suplementação mineral.

2.7.5 Sêmen

Foi utilizado sêmen fresco proveniente de um único garanhão com fertilidade conhecida. O sêmen foi diluído na proporção 2:1 com extensor a base de leite desnatado¹⁹. As doses utilizadas continham no mínimo um bilhão de espermatozoides móveis.

2.7.6 Tratamento superestimulatório

As éguas foram submetidas a um tratamento superestimulatório com Extrato de Pituitária Eqüina (EPE)²⁰, visando uma maior disponibilidade do número de embriões. O tratamento foi iniciado no 5º dia do diestro, sendo que as éguas não apresentavam folículos com diâmetro maior que 25 mm e a dose utilizada foi a de 12,5 mg de EPE, via de aplicação intramuscular, duas vezes ao dia. Nos dois primeiros dias de tratamento, uma hora após a administração de EPE, as éguas receberam 5 mg (1 ml) de Dinoprost Trometamina²¹. A partir do momento em que as éguas apresentaram ao menos um folículo com diâmetro igual ou

¹⁹ Botu-sêmen®, Biotech Botucatu, Botucatu, S.P.

²⁰ lotes OT/PR de 12/09/03 e OT/PL de 18/08/06, produzidos na UNESP-Botucatu, S.P.

²¹ Lutalyse® - Pfizer, Paulínia, SP.

superior a 35 mm, o tratamento com EPE foi interrompido e a(s) ovulação (ões) foi (foram) induzida(s) com a aplicação endovenosa de 2500 UI de hCG²². Neste momento também foi realizada a inseminação artificial pelo método convencional, utilizando uma dose mínima de um bilhão de espermatozoides móveis, em virtude da superovulação (Figura 5). O acompanhamento folicular foi realizado através de palpação retal auxiliada por exame ultrassonográfico (ultra-som Aloka, modelo SSD-500 com transdutor linear de 5,0 MHz).

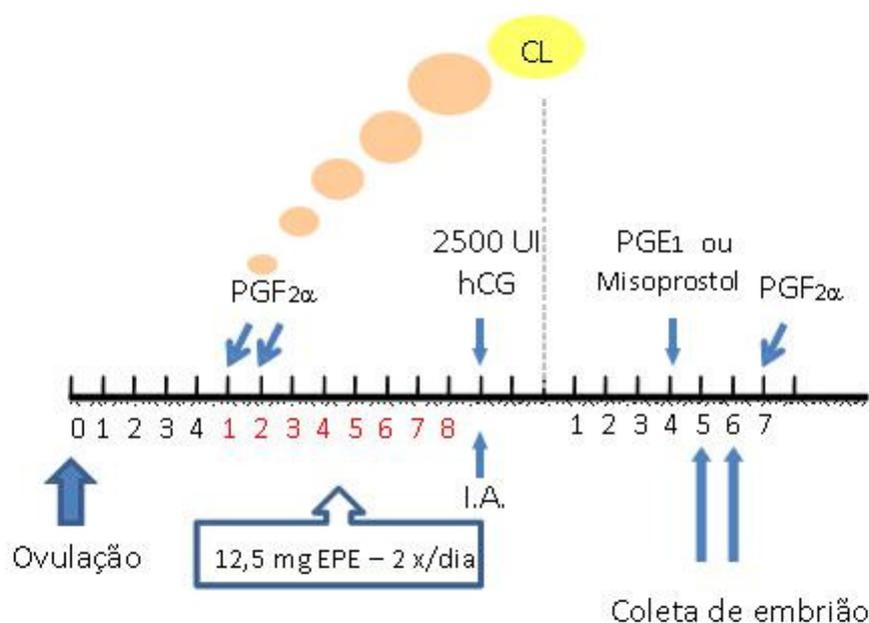


Figura 5 - Protocolo de superestimulação ovariana de éguas com EPE e aplicação de PGE₁ ou Misoprostol 1% para a recuperação antecipada de embriões - Pirassununga - 2007

2.7.7 Tratamento com PGE₁ ou com análogo Misoprostol

No 4º dia após a detecção da última ovulação as éguas foram tratadas com 200 microgramas (µg) de PGE₁ 100%²³ (n=5) ou com o análogo Misoprostol 1% (n=5)²⁴ diluídos em 0,5 ml de gel a base de hidroxipropilmetilcelulose a 8%. O gel contendo a prostaglandina ou o análogo foi depositado na região da junção útero-tubárica do lado ipsilateral a ovulação,

²² Vetecor® 5000 UI - Calier, SP.

²³ Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico Ltda, São Paulo, SP.

²⁴ Hebron Farmacêutica Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Ltda / INFAN – Indústria Química Farmacêutica Nacional Ltda, Caruaru, PE.

com auxílio de uma pipeta de IA flexível²⁵ de 75 cm de comprimento. Uma segunda administração foi realizada aproximadamente quatro horas após a primeira, no intuito de sustentar o estímulo. No 5º (D5) e 6º-6,5º dia (D6-6,5) após a detecção da última ovulação foi realizado um procedimento não-cirúrgico de lavagem uterina visando à recuperação embrionária (Figura 5).

Após a última tentativa de colheita as éguas receberam 7,5 mg (1,5 ml) de Dinoprost Trometamina, via intra-muscular.

2.7.8 Colheita, rastreamento e manipulação dos embriões

Os procedimentos de colheita, rastreamento e manipulação dos embriões foram iguais aos realizados no experimento I (item 2.3.8).

2.7.9 Análises Estatísticas

As análises foram iguais as realizadas no experimento I (item 2.3.9).

2.8 RESULTADOS – Experimento II

O tratamento de estimulação ovariana com EPE durou em média 5,35 dias (3-9,5 dias), resultando em uma média de 2,1 ovulações (1 – 3 ovulações) por égua. A população folicular presente no início do tratamento, os resultados e os dados referentes a cada animal encontram-se condensados no apêndice B. Cinco ovulações ocorreram antes do término do tratamento com EPE (não-sincrônicas).

Durante a primeira tentativa de recuperação embrionária, realizada no 5º dia após a detecção da última ovulação, não foram recuperados embriões do grupo PGE₁, mas foram

²⁵ Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre, RS.

recuperados três embriões do grupo Misoprostol, sendo que um embrião apresentava avançado grau de degeneração (Mo) e dois, com sete dias de idade (Bi e Bl), eram provenientes de ovulações não-sincrônicas. Portanto, considerando apenas os embriões colhidos com cinco dias, não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

Na segunda tentativa, realizada entre o 6º e 6,5º dia após a detecção da última ovulação, foram recuperados embriões de uma das éguas tratadas com PGE_1 (20%) e de todas as éguas (5/5) tratadas com o gel contendo Misoprostol, sendo que, apesar do pequeno número de animais foi detectada uma diferença ($P= 0,048$) entre os dois grupos experimentais (Tabela 2).

Como pode ser observado no apêndice B, das nove ovulações do grupo PGE_1 , apenas dois embriões com 6-6,5 dias, em estágio de Mórula compacta e Blastocisto inicial, foram recuperados, significando uma recuperação de 22,22% do total de ovulações.

No caso do grupo experimental tratado com o Misoprostol foi detectado um total de 12 ovulações, com recuperação de 11 embriões (91,67%). Destes, oito foram embriões de 6-6,5 dias, dois tinham sete dias (D7), ou seja, provenientes de ovulações não-sincrônicas, e um, como já salientado, estava em avançado grau de degeneração, não sendo possível realizar a distinção entre um embrião D5 e um embrião D7 que entrou em degeneração prematuramente ao entrar no ambiente uterino.

Excluindo-se as ovulações não-sincrônicas e os embriões procedentes destas, foram recuperados oito embriões (D6-6,5) de oito ovulações (D6-6,5) das éguas tratadas com Misoprostol 1%, revelando uma taxa significativamente superior ($P=0,007$) àquela do grupo tratado com PGE_1 100% (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de ovulações, taxa de éguas que produziram embriões e taxa de recuperação embrionária no D6-6,5 de éguas superestimuladas com EPE e tratadas com PGE_1 ou Misoprostol 1% - Pirassununga - 2007

	PGE_1	Misoprostol	Total
Nº de éguas	5	5	10
Nº total de ovulações (não-sincrônicas)	9 (1)	12 (4)	21 (5)
Taxa de éguas que produziram embriões no D6-6,5 (n/total)	20,0% (1/5) ^a	100% (5/5) ^b	60,0% (6/10)
Taxa de recuperação embrionária por ovulação no D6-6,5 (n/total)	25,0% (2/8) ^c	100% (8/8) ^d	62,5% (10/16)

Valores com letras distintas na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$)

a,b ($P=0,048$); c,d ($P=0,007$)

Os embriões D6-6,5 recuperados da égua pertencente ao grupo tratado com PGE₁ estavam nos estágios de Mórula compacta (Mc) e Blastocisto inicial (Bi), ambos com grau de qualidade 1 e com diâmetro de 250 e 300µm, respectivamente. Dos oito embriões D6-6,5 colhidos das éguas do grupo Misoprostol, cinco estavam no estágio de Mc, com qualidade 1 a 2,5 e diâmetro variando entre 200 e 250µm; os outros três embriões eram Bi com qualidade 1 a 1,5 e com diâmetro entre 250 e 300µm (Quadro 1).

Grupo	Égua	Idade do embrião (dias)	Estágio*	Qualidade do embrião (1-5) [#]	Diâmetro (µm)
PGE ₁	2	6-6,5	Mc	1	250
PGE ₁	2	6-6,5	Bi	1	300
Misoprostol	3	6-6,5	Mc	1	200-250
Misoprostol	3	6-6,5	Mc	1,5	200-250
Misoprostol	5	7	Bi	1	250-300
Misoprostol	5	6-6,5	Bi	1	300
Misoprostol	6	5 ou 7?	Mo	5	< 200
Misoprostol	6	6-6,5	Mc	2	< 200
Misoprostol	7	6-6,5	Mc	1	200-250
Misoprostol	7	6-6,5	Mc	2,5	200-250
Misoprostol	10	7	Bl	2	300
Misoprostol	10	6-6,5	Bi	1,5	250
Misoprostol	10	6-6,5	Bi	1,5	250

*Bi = Blastocisto inicial; Bl = Blastocisto; Mc = Mórula compacta

[#] 1=excelente; 2=bom; 3=regular; 4=ruim; 5=degenerado

Quadro 1 - Relação de embriões recuperados de éguas superestimuladas com EPE e tratadas com PGE₁ ou com Misoprostol 1% - Pirassununga - 2007

Em relação à qualidade dos lavados uterinos, 80% das éguas (4/5) tratadas com o gel contendo PGE₁ apresentaram lavados turvos, com diferentes graus de turvação, durante a primeira e/ou segunda tentativa de recuperação embrionária, enquanto que, no grupo tratado com o análogo Misoprostol a 1%, apenas uma das cinco éguas (20%), apresentou um lavado levemente turvo na primeira tentativa de colheita embrionária.

Capítulo 2 - Detecção de receptores de prostanóides do subtipo EP na tuba uterina e útero de fêmeas eqüinas

3 REVISÃO DE LITERATURA

Os prostanóides são derivados oxigenados de ácidos graxos poliinsaturados contendo 20 átomos de carbono e um anel ciclopentano, sendo as prostaglandinas e as tromboxanas as suas duas principais classes. As prostaglandinas podem ser consideradas quimicamente como derivadas do ácido prostanóico e são designadas por uma letra (A a J) de acordo com a natureza e a posição dos seus componentes sobre o anel ciclopentano e a presença e posição das ligações duplas dentro do anel. Além disso, são identificadas por um número subscrito (1, 2 ou 3) que indica o número de duplas ligações nas cadeias laterais alquil, sendo as prostaglandinas da série-1 derivadas do ácido 8,11,14-eicosatrienóico, as da série-2 do ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico (ácido araquidônico) e as da série-3 do ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (BENEDETTO et al., 1987; COLEMAN et al., 1990). Na maioria dos mamíferos, o ácido araquidônico é o precursor mais importante, portanto as prostaglandinas da série 2 são as mais abundantes (COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994).

As diferentes prostaglandinas PGD, PGE, PGF e PGI exercem função biológica ao interagirem com o receptor correspondente (DP, EP, FP ou IP) localizados nas membranas, acoplados a proteína G, e que eliciam sua resposta por ativar proteínas reguladoras (COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994; PALERMO-NETO, 1996).

Os receptores DP estão amplamente distribuídos nas plaquetas sanguíneas, músculo liso vascular e tecido nervoso, incluindo o sistema nervoso central. Há também exemplos de receptores DP na musculatura lisa gastrointestinal, uterina e respiratória em algumas espécies animais (COLEMAN et al., 1990).

Já os receptores EP medeiam uma impressionante variedade de atividades biológicas incluindo contração e relaxamento de músculo liso, inibição e intensificação da liberação de neurotransmissores, inibição da lipólise, inibição da liberação de ácido gástrico, de mediadores da inflamação e da expressão de imunoglobulinas, entre outras coisas. E é por causa da diversidade destas ações biológicas que é óbvio que existam mais de um subtipo de receptor EP, sendo que atualmente são aceitos quatro subtipos (EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄) (COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994).

Já foi descrita a presença de receptores EP₁ em músculo liso da traquéia, trato gastrointestinal, útero e bexiga de cobaia, onde medeiam a contração da musculatura lisa. Os receptores do subtipo EP₂ estão mais difundidos e proporcionam respostas mais variadas, estando distribuídos em músculos lisos, onde invariavelmente medeiam um relaxamento; nas células epiteliais onde intervêm na secreção não-ácida; nas células inflamatórias, como nos mastócitos e basófilos, onde eles inibem a liberação de mediadores; e sobre nervos aferentes sensoriais, onde eles medeiam a ativação (COLEMAN et al., 1990). No tecido de camundongos, receptores EP₂ foram expressos em maior quantidade no íleo, seguido do timo, pulmão, baço, coração e útero (HONDA et al., 1993).

Recentemente receptores do subtipo EP₂ foram detectados por imuno-histoquímica na superfície do epitélio, no epitélio glandular, na superfície do estroma, no miométrio e no perimétrio da parede uterina intercaruncular bovina (WEHBRINK et al., 2008). Em galinhas foram amplamente expressos no cérebro, pituitária, pulmão, coração, fígado, rim, intestino, pâncreas, músculo peitoral, baço, ovário, testículo e em todas as partes do oviduto, incluindo infundíbulo, magno, istmo, glândula da casca e vagina (KWOK et al., 2008).

Dos quatro subtipos, os receptores EP₃ parecem ser os mais onipresentes. Eles estão presentes na musculatura lisa gastrointestinal, uterina e vascular, sendo responsáveis pelo estímulo contrátil; em nervos autonômicos inibem a liberação de neurotransmissores; em adipócitos, inibem a lipólise; nas células da mucosa gástrica, impedem a secreção ácida e na medula renal, medeiam a reabsorção de água (COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994). O RNA mensageiro (RNAm) deste subtipo de receptor é muito expresso no rim e no útero, mas sua expressão também é vista no estômago, timo, baço, pulmão e cérebro (SUGIMOTO et al., 1992). Entre os subtipos de receptores EP a expressão de EP₃ é a mais complexa, visto que uniões alternativas do gene resultam em diferentes isoformas. Segundo Namba et al. (1993) pode-se identificar pelo menos quatro isoformas do receptor EP₃ bovino (EP_{3A}, EP_{3B}, EP_{3C}, EP_{3D}). Em humanos já são descritas pelo menos 10 variações de RNAm para oito diferentes isoformas de EP₃ (EP_{3-I}, EP_{3-II}, EP_{3-III}, EP_{3-IV}, EP_{3-V}, EP_{3-VI}, EP_{3-e}, EP_{3-f}) (KOTELEVETS et al., 2007).

Há pouca informação a respeito da distribuição dos receptores EP₄, mas há evidência da sua existência na veia safena de leitões, nas veias jugular e safena de coelho, na traquéia de rato e no útero de hamster (COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994). Em galinhas eles não foram encontrados na maioria dos tecidos, sendo encontrado consistentemente apenas em testículos de diferentes galos (KWOK et al., 2008).

Em relação aos receptores FP, que se ligam especificamente às PGF, tem sido demonstrado que eles existem em uma variedade de tecidos em espécies diferentes, mas eles prevalecem no corpo lúteo, sendo desencadeadores da luteólise (COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994). A presença destes receptores no tecido luteal nos permite utilizar a $\text{PGF}_{2\alpha}$ e seus análogos em protocolos de sincronização de ciclos estrais em diversas espécies animais.

Os receptores de prostanóides do tipo IP já foram identificados em plaquetas, na musculatura lisa vascular e em células nervosas (COLEMAN et al., 1990; COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994). Os receptores TP, onde se ligam as tromboxanas, são vistos como uma contraparte dos receptores IP, sendo que em muitos tecidos estes dois tipos de receptores demonstram uma relação complementar. Assim, os receptores TP também se encontram distribuídos na musculatura lisa dos vasos e nas plaquetas e invariavelmente mediam uma atividade excitatória (COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994).

Pelo menos quatro tipos de receptores de prostanóides parecem estar envolvidos na contração de músculo liso, sendo eles os receptores EP_1 , EP_3 , TP e FP. Visto que a contração do músculo liso é dependente da concentração de cálcio livre no mioplasma, acredita-se que a atividade destes receptores é traduzida via Ca^{2+} intracelular. Ao contrário, os receptores que parecem interceder o relaxamento de músculos lisos são os do tipo EP_2 , DP e IP, sendo que a ação destes parece ser mediada intracelularmente por um aumento no AMP_c (COLEMAN et al., 1990).

Como visto, os prostanóides são potentes agentes de contração e relaxamento da musculatura lisa, inclusive a do sistema reprodutivo de machos e fêmeas, podendo exercer profundo efeito sobre a função reprodutiva. No sistema reprodutivo de fêmeas, por exemplo, existe músculo liso no ovário, nas tubas uterinas, no útero e nas veias sanguíneas associadas (COLEMAN et al., 1990), estando envolvidos na ovulação, na fertilização e na implantação.

Os papéis das prostaglandinas E_1 , E_2 , E_3 e $\text{F}_{2\alpha}$ sobre as tubas uterinas e o útero de mulheres já são conhecidos há algum tempo. A PGE_1 e a PGE_2 promovem um aumento no tônus e na amplitude máxima da musculatura longitudinal da parte proximal da tuba uterina e exercem uma ação inibitória (relaxante) nas outras porções da tuba e no útero, sendo que a ação da PGE_2 sobre a tuba parece ser mais pronunciada durante a fase secretora do ciclo menstrual (SANDBERG; INGELMAN-SUNDBERG; RYDEN, 1963, 1964). Este relaxamento da porção final da tuba (istmo), sob ação da PGE_2 , é aceito como um requerimento para a penetração dos espermatozóides na tuba, visto que o sêmen de homens inférteis contém uma marcada diminuição da concentração das PGE (BYGDEMAN et al.,

1970). Uma significativa inibição da mobilidade tubárica também foi verificada *in vivo* após a administração intravenosa de 100µg de PGE₂ (COUTINHO; MAIA, 1971). A PGE₃, por sua vez, produz um efeito inibitório sobre todos os segmentos da tuba uterina e no útero, tanto na fase proliferativa quanto na secretora (SANDBERG; INGELMAN-SUNDBERG; RYDEN, 1964).

Já a PGF_{2α} promove um efeito estimulatório na tuba uterina tanto se injetada diretamente dentro do lúmen tubárico ou por via endovenosa, provocando também contrações uterinas quando administrada por via endovenosa (COUTINHO; MAIA, 1971).

Huang et al. (2002) também detectaram que o epitélio luminal e a musculatura lisa da tuba uterina humana sintetizam PGI, que atua de uma maneira parácrina, relaxando a musculatura lisa e desempenhando provavelmente um importante papel no transporte dos óvulos fecundados e na clivagem dos embriões.

É conhecido, que em humanos, o transporte embrionário é ajudado pela contração da musculatura lisa circular e relaxamento da musculatura longitudinal da tuba uterina, sendo que esta contratilidade é regulada por nervos β-adrenérgicos, esteróides, óxido nítrico e prostaglandinas, entre outros (HUANG et al., 2002). Entretanto, reconhecer que a PGF_{2α} aumenta a contratilidade da musculatura tubárica e que a PGE₁, PGE₂ e PGI₂ inibem esta atividade, são informações insuficientes para se determinar quais são os receptores prostanóides envolvidos (COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994).

Apenas nos últimos anos tem-se voltado às atenções para se identificar e localizar os receptores de prostaglandinas e de enzimas no trato reprodutivo. Segi et al. (2003) localizaram a expressão de EP₄ e RNAm de COX-1 nas células epiteliais da tuba uterina de camundongos, enquanto que a expressão do RNAm de EP₂ foi localizada no músculo liso. Nos folículos pré-ovulatórios a expressão de EP₂ e EP₄ podem refletir o papel da PGE₂ no processo de ovulação.

Na tuba uterina humana a expressão dos quatro subtipos de receptores EP e de receptores FP foi detectada nas células do epitélio luminal, contudo, os do subtipo EP₁ foram imunomarcados com mais intensidade na região do ístmo do que na ampola e a marcação dos receptores EP₃ foi maior na parte apical das células epiteliais. No epitélio da serosa foram detectados os subtipos EP₁, EP₂ e EP₄ sem distinção entre as partes da tuba uterina (WANGGREN et al., 2006). Estes dados sugerem que tanto o transporte do embrião, quanto a comunicação entre o embrião e a tuba uterina envolvem a ação de prostaglandinas através de

receptores EP e FP, em adição ao efeito das prostaglandinas sobre o sistema vascular e a contratilidade muscular.

Na espécie eqüina, apesar de alguns experimentos de sucesso já terem sido relatados, objetivando a recuperação antecipada dos embriões, como salientado no capítulo anterior, a utilização da PGE₂ e a sua deposição no trato genital de éguas sempre foi realizada de maneira empírica, sem que se conheça verdadeiramente o papel desta prostaglandina nas diferentes partes da tuba uterina e no útero, e onde especificamente ela se liga. Além disto, não basta saber que ela atua na tuba e no útero, é imprescindível saber quais são os receptores envolvidos, e se a sua expressão é afetada pela fase do ciclo estral.

Sumariamente, o conhecimento da localização dos receptores EP na tuba, na junção útero-tubárica e no útero torna-se um pré-requisito para o entendimento do mecanismo fisiológico do transporte embrionário e para a execução incisiva de experimentos que visem a recuperação antecipada de embriões eqüinos. Além disso, os resultados podem auxiliar no entendimento do mecanismo inicial de interação entre o embrião e o ambiente tubárico e uterino, e, na compreensão do processo de reconhecimento materno na égua.

3.1 HIPÓTESE

Existem receptores do subtipo EP na tuba uterina e no útero de fêmeas da espécie eqüina.

3.2 OBJETIVOS

- Detectar e imuno-localizar os subtipos de receptores das prostaglandinas da série E nos diferentes segmentos da tuba uterina (infundíbulo, ampola e istmo), na junção útero-tubárica e no útero de fêmeas eqüinas.
- Detectar se existe alguma diferença qualitativa na expressão dos receptores do subtipo EP em decorrência da porção do sistema genital.
- Detectar se há diferença qualitativa na expressão de receptores do subtipo EP em virtude da fase do ciclo estral ou do estado gestacional.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta do material e das amostras, a fixação, inclusão e emblocagem do material e os procedimentos de imuno-histoquímica são descritos a seguir.

3.3.1 Coleta do material.

Sistemas genitais de fêmeas eqüinas de diferentes idades, raças e procedências foram obtidos no Abatedouro de Eqüinos Belo Vale, no município de Campo Belo, MG. Os órgãos do sistema genital foram colhidos durante o período de estação de monta (05 de março de 2007), no intuito de se obter fêmeas em diferentes fases do ciclo estral (estro, diestro e eventualmente em anestro). Também foram colhidos tratos genitais de fêmeas prenhes que, pelas características fetais e placentárias, estavam entre 40-70 dias e 120-150 dias de gestação.

Após a colheita *in situ*, os órgãos foram imediatamente imersos em meio refrigerado de DMPBS *flush*²⁶, sendo embalados individualmente em sacos plásticos. Os sacos plásticos, por sua vez, foram acondicionados em uma caixa térmica, a qual foi transportada do abatedouro até o Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) do Departamento de Reprodução Animal, FMVZ, USP, Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga-SP.

Já no CBRA, os aparelhos genitais foram identificados e analisados. A detecção de folículos, corpos lúteos e corpos hemorrágicos foi realizada por palpação e visualização dos ovários, ultra-sonografia e/ou visualização das estruturas após a realização de corte sagital em ambos os ovários. A determinação da fase do ciclo estral foi realizada exclusivamente e somente neste momento, não sendo realizadas palpações retais e exame ultra-sonográfico “*ante mortem*” ou mensurações de concentrações hormonais.

Dos 12 sistemas colhidos três foram provenientes de éguas em fase de estro (folículos dominantes com mais de 35 mm de diâmetro), três de éguas em diestro inicial (presença de corpo hemorrágico), dois de éguas em diestro (presença de corpo lúteo totalmente organizado

²⁶ Solução salina fosfatada modificada de Dulbecco – Nutricell, Campinas, SP

e sem folículo dominante), um em anestro (sem folículos ou corpo lúteo evidente), um de fêmea com aproximadamente 120-150 dias de gestação (feto com aproximadamente 30 cm de comprimento e evidência de hipomane) e dois sistemas de fêmeas com gestação entre 40 e 70 dias (embriões com 5-10 cm de comprimento, presença de cálices endometriais, etc).

3.3.2 Colheita, fixação, inclusão e emblocagem das amostras.

Amostras, com aproximadamente cinco milímetros, do útero (compreendendo o endométrio, miométrio e perimétrio), da junção útero-tubárica (papila) e das diferentes porções da tuba uterina (istmo, ampola e infundíbulo) foram colhidas e fixadas em meio Metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético) por aproximadamente 12 horas e em Formol a 10% por aproximadamente 48 horas. Considerou-se como fragmento referente ao istmo a porção imediatamente posterior a papila, e como infundíbulo a porção imediatamente anterior ao ovário. O fragmento alusivo à ampola foi colhido aproximadamente do meio da porção enovelada. A fração recolhida do útero foi da parte final do corno uterino (aproximadamente 5 cm da papila).

Após o procedimento de fixação, o material foi incluído em parafina, seguindo os passos descritos: álcool 70% por 1 hora (1 h.), álcool 95% (1 h.), álcool absoluto I (1 h.), álcool absoluto II (1 h.), álcool-xilol (1 h.), xilol I (1 h.), xilol II (1 h.), parafina I (1 h.), parafina II (1 h.) e parafina para inclusão. As peças foram emblocadas individualmente em parafina e após os blocos esfriarem e solidificarem eles foram armazenados até a realização dos cortes e execução da técnica de imuno-histoquímica. Os procedimentos de fixação, inclusão e emblocagem foram realizados no Laboratório de Citologia e Imuno-histoquímica do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, Campus de Pirassununga, SP.

3.3.3 Técnica de Imuno-Histoquímica

Os procedimentos a seguir foram realizados no Laboratório de Anatomia Microscópica e Imuno-histoquímica do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia da USP, Cidade Universitária, SP. Esta fase foi realizada de setembro de 2007 a janeiro de 2008. Para o estabelecimento do protocolo definitivo foram realizados testes também em amostras de rim de rato (*Rattus norvegicus*) e de equino (*Equus caballus*). Para a detecção dos receptores em animais em diestro inicial, diestro, estro e nas duas fases gestacionais foram utilizados materiais fixados em Metacarn. A detecção dos receptores no sistema genital da égua que se encontrava em fase de anestro foi realizada utilizando-se material fixado em Formol 10%. Foram utilizados os mesmos blocos de parafina para a detecção dos quatro subtipos.

Cortes histológicos de material incluído em parafina com espessura de cinco micrômetros foram realizados em micrótomo e estes, foram montados sobre lâminas de vidro previamente silanizadas²⁷. Imediatamente após deixar as lâminas em estufa a 60°C por 2 horas o processo de desparafinização foi realizado com banhos de xilol I (por 15 minutos, em estufa a 60°C), xilol II (por 15 minutos, em estufa a 60°C), xilol + álcool 1:1 (por 5 minutos, em estufa a 60°C), álcool 100% I (por 5 minutos, em temperatura ambiente), álcool 100% II (por 5 minutos, em temperatura ambiente), álcool 90% (por 5 minutos, em temperatura ambiente), álcool 70% (por 5 minutos, em temperatura ambiente) e água destilada (por 5 minutos, em temperatura ambiente).

Imediatamente após o processo de desparafinização em xilóis e alcoóis foi realizado um processo de desmascaramento (para recuperação dos antígenos) em tampão citrato com pH 6.0 (Anexo A), com fervura das lâminas em microondas por 15 minutos. Após o resfriamento da solução as lâminas foram incubadas por 30 minutos em solução de H₂O₂ a 10% diluída em metanol para bloquear a atividade da peroxidase endógena e então foram lavadas três vezes em solução de PBS com pH de 7.4 (Anexo B) com 0,05% de Tween 20^{®28} por 5 minutos cada. Na seqüência foram incubadas com solução de leite desnatado a 5% em PBS, por 15 minutos a 37-40°C, para bloquear os sítios hidrofóbicos inespecíficos, sendo lavadas novamente três vezes em solução de PBS com 0,05% de Tween 20[®].

As secções foram então incubadas com o anticorpo primário na diluição adequada, segundo testes precedentes (EP₁ e EP₂ 1:50; EP₃ e EP₄ 1:100), de um dia para outro “overnight” em uma câmara úmida a 4°C. Os anticorpos utilizados para os receptores EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄²⁹ foram anticorpos policlonais de coelho.

²⁷ 3-Aminopropiltrióxissilano – Sigma-Aldrich, São Paulo-SP.

²⁸ Tween 20[®] - Merck, Darmstadt-Germany.

²⁹ catálogo número 101740, 101750, 101760 e 101775 - Cayman, USA.

No dia seguinte, após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em solução de PBS com 0,05% de Tween 20[®], durante 5 minutos cada, e então incubadas com o anticorpo secundário, antioelho e anticamundongo³⁰, por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente as lâminas foram novamente lavadas três vezes em PBS com 0,05% de Tween 20[®] durante 5 minutos cada, antes da incubação com anticorpos polimerizados com peroxidase *horseradish*³¹ por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após lavar três vezes na solução de PBS, uma solução de peróxido de diaminobenzidina³² foi adicionada às lâminas por 5-10 segundos e depois se seguiu nova seqüência de lavagem em PBS (três banhos de 5 minutos cada). Para se obter coloração de fundo as lâminas foram imersas em solução de Hematoxilina de Harris por 20 segundos, sendo lavadas imediatamente em água destilada.

Para o processo de diafanização (desidratação) deu-se uma seqüência de lavagens, de 5 minutos em temperatura ambiente, em álcool 70%, álcool 90%, álcool 100% I, álcool 100% II e xilol + álcool (50%), seguidas de lavagens, de 10 minutos em temperatura ambiente, em xilol I e xilol II. Antes da análise das lâminas em microscópio óptico elas foram montadas com resina.

Analisou-se apenas um animal por ciclo estral e fragmento do sistema genital, realizando-se, portanto, um estudo qualitativo. A reação positiva foi evidenciada pela cor marrom e a negativa apenas pela coloração de fundo. Para o registro das marcações foram realizadas fotos com auxílio do programa KS-400 3.0, utilizando câmera AxioCam HRc (Zeiss) acoplada a microscópio Olympus Bx60.

3.3.4 Análise Estatística

Tratando-se de uma análise qualitativa os dados relativos a cada subtipo de receptor, nas diferentes fases do ciclo e porções do trato genital da égua, foram apresentados na forma de quadros sem aplicação de análise estatística.

Contudo, considerando-se os seis animais estudados, pudemos realizar uma comparação em relação à quantidade expressa dos quatro diferentes subtipos de receptores

³⁰ Advance™ HRP Link – Sistema de detecção Advance HRP, Dako

³¹ Enzima Advance™ HRP - Sistema de detecção Advance HRP, Dako

³² Liquid DAB + Substrate Chromogen System – Code K3468 - DakoCytomation

para as prostaglandinas E. Para isso, a intensidade de marcação pelo método da imunohistoquímica, nas diferentes porções do trato genital e nas diferentes fases do ciclo foi analisada através do programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007), utilizando-se a Análise de Variância de Friedman. Anteriormente foi verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias através da análise dos resíduos. Os dados (variáveis dependentes) que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidos à transformação logarítmica [$\text{Log}(X+1)$], pela raiz quadrada [$\text{RQ}(X+1/2)$] e pelo arco-seno [$\text{Arcsin}(\text{RQ} 1)$]. Mesmo após a transformação dos dados, eles não respeitaram as premissas, tratando-se, portanto, de dados que não respeitam a curva Gaussiana e que devem ser analisados através de uma análise não-paramétrica. Foi considerado como nível de significância o valor de 0,5%.

Como se trata de dados ordinais substituiu-se a marcação em cruces por notas antes da aplicação do teste: 0 (sem marcação), 1 (fraca), 2 (fraca a moderada), 3 (moderada), 4 (moderada a forte) e 5 (forte marcação).

3.4 RESULTADOS

Os resultados obtidos com os procedimentos de imunohistoquímica para a marcação dos subtipos de receptores EP são descritos a seguir.

3.4.1 Expressão do receptor do subtipo EP₁ no sistema genital de fêmeas eqüinas

O receptor do subtipo EP₁ foi expresso na mucosa (epitélio de revestimento + lâmina própria) e na camada muscular do corno uterino, da junção útero-tubárica e nas diferentes porções da tuba uterina (Quadro 2 e Figura 6), em todas as fases do ciclo e também nos períodos gestacionais estudados (Quadro 2). A reação positiva foi evidenciada pela cor marrom no citoplasma das células (Figura 6).

A Figura 6 ilustra apenas algumas das imagens geradas durante o experimento. Na primeira coluna temos como exemplo imagens aumentadas em 100 vezes da mucosa dos diferentes segmentos da tuba uterina, da JUT e do útero de uma égua em diestro, sem a

utilização do anticorpo primário no protocolo (controle negativo). As demais colunas mostram imagens da mucosa do sistema genital de animais onde foi utilizado o anticorpo primário no protocolo (material testado). Assim, a segunda coluna ilustra lâminas de uma égua na fase de diestro, a terceira coluna de uma égua em estro e a quarta de uma égua em anestro.

Verificou-se também que os cílios das células epiteliais foram marcados (Figura 6), denotando a presença do receptor subtipo EP₁. Na lâmina própria também se identificou receptores no epitélio das glândulas, especialmente nas mais próximas ao epitélio de revestimento. Do mesmo modo, registrou-se uma marcação do receptor EP₁ nas túnicas de células musculares lisas, nas diferentes partes do sistema genital, nas diferentes fases analisadas (Figura 10).

PORÇÃO DO TRATO GENITAL		FASE DO CICLO					
		Diestro inicial	Diestro	Estro	Gestação 40-70 dias	Gestação 120-150 dias	Anestro
Corno uterino		+	+	+	+	+	+
Junção útero-tubárica		+	+	+	+	+	+
Tuba Uterina	Istmo	+	+	+	+	+	+
	Ampola	+	+	+	+	+	+
	Infundíbulo	+	+	+	+	+	+

Quadro 2 - Expressão do receptor do subtipo EP₁ (+: positivo; -: negativo) nas células epiteliais de diferentes porções do trato reprodutivo de éguas e em diferentes fases do ciclo ou período gestacional evidenciadas por imuno-histoquímica - São Paulo - 2008

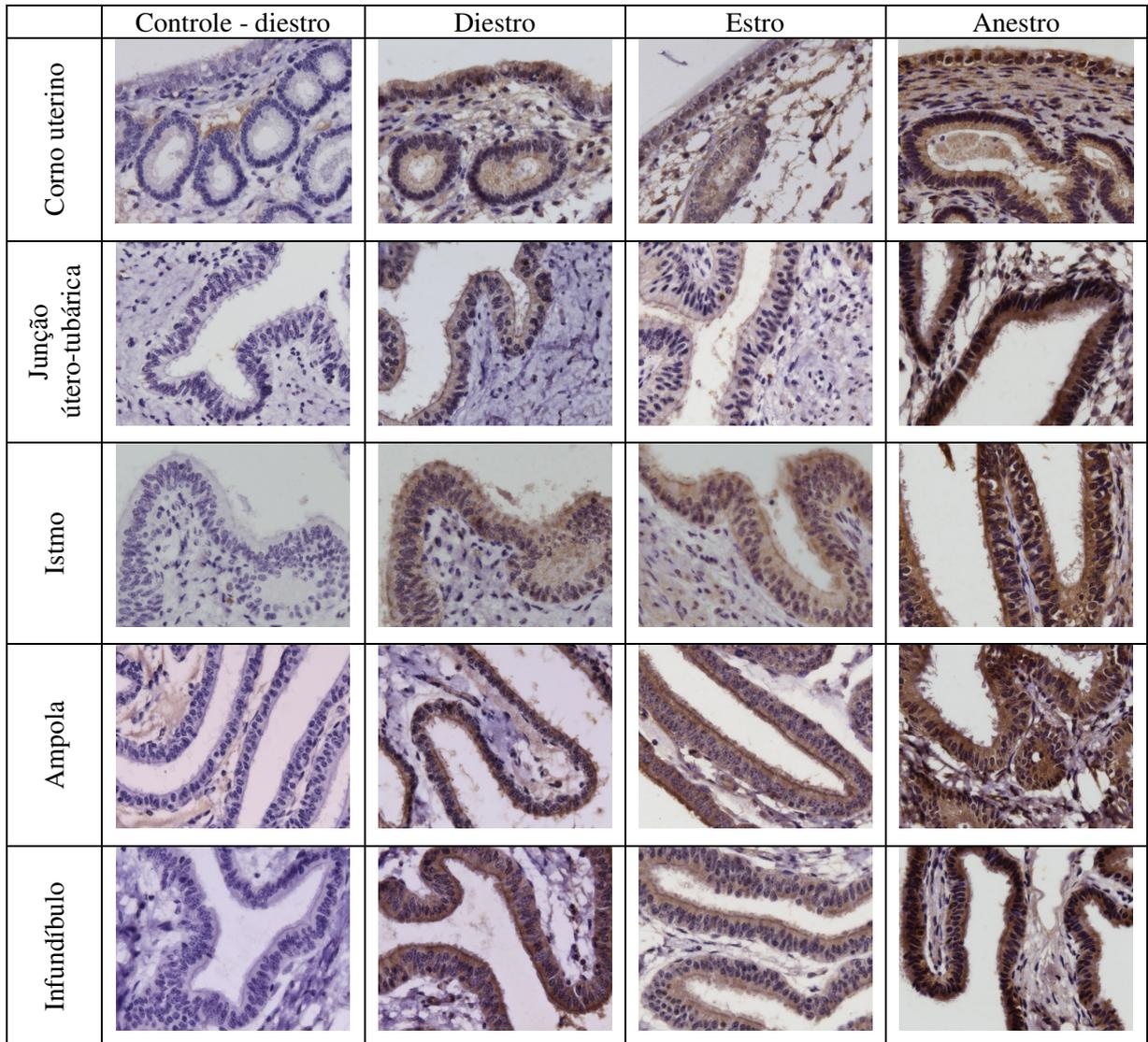


Figura 6 – Imagens representativas da imunomarcagem do receptor EP₁ na região da mucosa do corno uterino, da junção útero-tubárica e das diferentes porções da tuba uterina de éguas nas fases de diestro, estro e anestro (100x) - São Paulo - 2008

3.4.2 Expressão do receptor do subtipo EP₂ no sistema genital de fêmeas equínas

O receptor do subtipo EP₂ foi expresso no epitélio de revestimento (lúmen), na lâmina própria e na camada muscular do corno uterino, da junção útero-tubárica e nas diferentes porções da tuba uterina, independente da fase do ciclo (Quadro 3 e Figura 7) e também nas fases gestacionais estudadas (Quadro 3).

A Figura 7 ilustra algumas das imagens produzidas da região da mucosa (epitélio de revestimento + lâmina própria) durante o experimento. A primeira coluna refere-se ao controle negativo de uma égua na fase de estro e as demais colunas ilustram lâminas de éguas no diestro, estro e anestro.

Verificou-se também que os cílios das células epiteliais foram marcados de marrom (Figura 7), denotando a presença do receptor subtipo EP₂. Na lâmina própria se identificou receptores principalmente no epitélio glandular, especialmente nas mais próximas ao epitélio de revestimento.

PORÇÃO DO TRATO GENITAL		FASE DO CICLO					
		Diestro inicial	Diestro	Estro	Gestação 40-70 dias	Gestação 120-150 dias	Anestro
Corno uterino		+	+	+	+	+	+
Junção útero-tubárica		+	+	+	+	+	+
Tuba Uterina	Istmo	+	+	+	+	+	+
	Ampola	+	+	+	+	+	+
	Infundíbulo	+	+	+	+	+	+

Quadro 3 - Expressão do receptor do subtipo EP₂ (+: positivo; -: negativo) nas células epiteliais de diferentes porções do trato reprodutivo de éguas e em diferentes fases do ciclo ou período gestacional, evidenciadas por imuno-histoquímica - São Paulo - 2008

Do mesmo modo, registrou-se uma marcação do receptor EP₂ nas tûnicas de células musculares lisas, nas diferentes partes do sistema genital, nas diferentes fases analisadas (Figura 10).

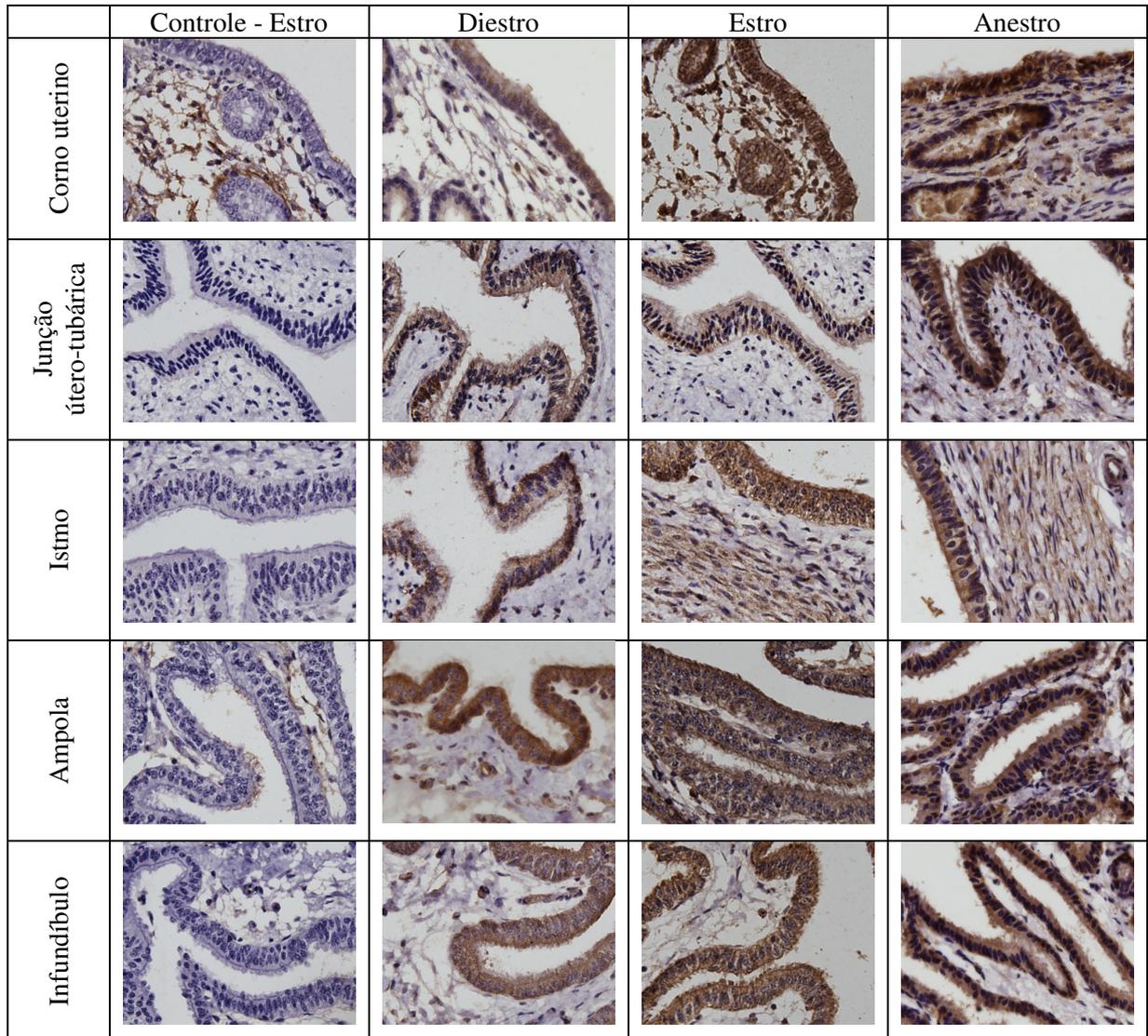


Figura 7 - Imagens representativas da imunomarcagem do receptor EP₂ na região da mucosa do corno uterino, da junção útero-tubárica e das diferentes porções da tuba uterina de éguas nas fases de diestro, estro e anestro (100x) - São Paulo - 2008

3.4.3 Expressão do receptor do subtipo EP₃ no sistema genital de fêmeas eqüinas.

O receptor do subtipo EP₃ foi expresso no epitélio de revestimento, na lâmina própria e na camada muscular do corno uterino, da junção útero-tubárica e nas diferentes porções da tuba uterina, em todas as fases estudadas (Quadro 4 e Figura 8) e também nas fases gestacionais examinadas (Quadro 4).

A Figura 8 ilustra algumas das imagens da região da mucosa do sistema genital geradas durante o experimento. A primeira coluna refere-se ao controle negativo de uma égua na fase de diestro, enquanto as demais colunas ilustram lâminas de éguas nas fases de diestro, estro e anestro.

PORÇÃO DO TRATO GENITAL		FASE DO CICLO					
		Diestro inicial	Diestro	Estro	Gestação 40-70 dias	Gestação 120-150 dias	Anestro
Corno uterino		+	+	+	+	+	+
Junção útero-tubárica		+	+	+	+	+	+
Tuba Uterina	Istmo	+	+	+	+	+	+
	Ampola	+	+	+	+	+	+
	Infundíbulo	+	+	+	+	+	+

Quadro 4 - Expressão do receptor do subtipo EP₃ (+: positivo; -: negativo) nas células epiteliais de diferentes porções do trato reprodutivo de éguas e em diferentes fases do ciclo ou período gestacional, evidenciadas por imuno-histoquímica - São Paulo - 2008

Igualmente aos receptores EP₁ e EP₂, os cílios das células epiteliais ciliadas foram marcados pela cor marrom (Figura 8), denotando a presença do receptor do subtipo EP₃.

Na lâmina própria foram identificados receptores no epitélio das glândulas, especialmente nas mais próximas ao epitélio de revestimento.

Do mesmo modo, registrou-se uma marcação positiva nas tûnicas de células musculares lisas, nas diferentes partes do sistema genital, nas diferentes fases analisadas (Figura 10).

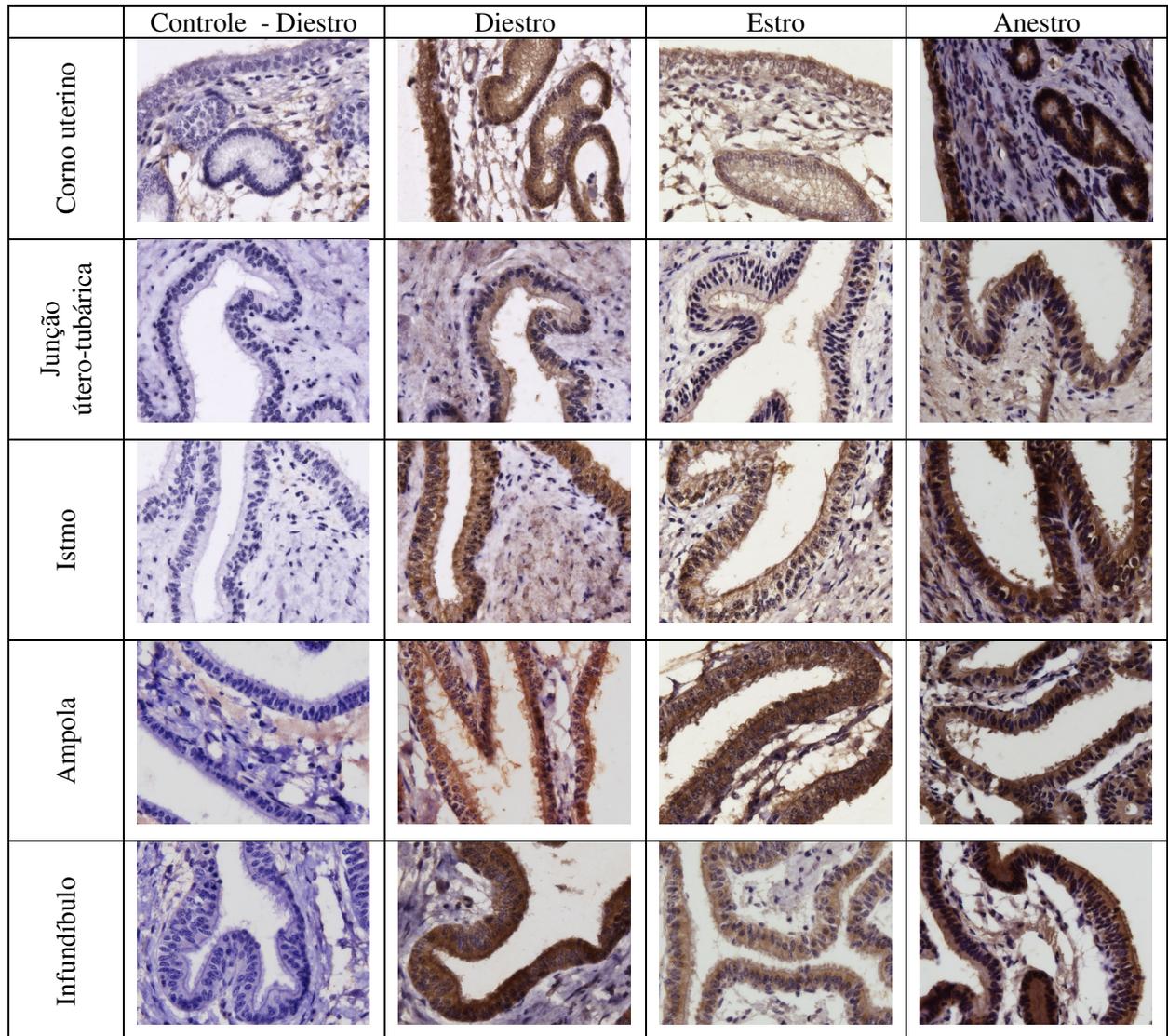


Figura 8 - Imagens representativas da imunomarcagem do receptor EP₃ na região da mucosa do corno uterino, da junção útero-tubárica e das diferentes porções da tuba uterina de éguas nas fases de diestro, estro e anestro (100x) - São Paulo - 2008

3.4.4 Expressão do receptor do subtipo EP₄ no sistema genital de fêmeas eqüinas

O receptor do subtipo EP₄ foi expresso no epitélio de revestimento, na lâmina própria e na camada muscular do corno uterino, da junção útero-tubárica e nas diferentes porções da tuba uterina, independente da fase do ciclo (Quadro 5 e Figura 9) e também nas fases gestacionais estudadas (Quadro 5).

A Figura 9 ilustra algumas das imagens da região da mucosa do sistema genital geradas durante o experimento. A primeira coluna refere-se ao controle negativo de uma égua na fase de estro e as demais colunas ilustram lâminas de éguas no diestro, estro e anestro.

Diferentemente dos outros subtipos de receptores do tipo EP, os cílios das células epiteliais ciliadas não foram marcados, corando-se apenas pela hematoxilina de fundo (Figura 9).

Na lâmina própria também se identificou receptores no epitélio das glândulas, especialmente nas mais próximas ao epitélio de revestimento.

Do mesmo modo, registrou-se uma marcação do receptor EP₄ nas tûnicas de células musculares lisas, nas diferentes partes do sistema genital, nas diferentes fases analisadas (Figura 10).

PORÇÃO DO TRATO GENITAL		FASE DO CICLO					
		Diestro inicial	Diestro	Estro	Gestação 40-70 dias	Gestação 120-150 dias	Anestro
Corno uterino		+	+	+	+	+	+
Junção útero-tubárica		+	+	+	+	+	+
Tuba Uterina	Istmo	+	+	+	+	+	+
	Ampola	+	+	+	+	+	+
	Infundíbulo	+	+	+	+	+	+

Quadro 5 - Expressão do receptor do subtipo EP₄ (+: positivo; -: negativo) nas células epiteliais de diferentes porções do trato reprodutivo de éguas e em diferentes fases do ciclo ou período gestacional, evidenciadas por imuno-histoquímica - São Paulo - 2008

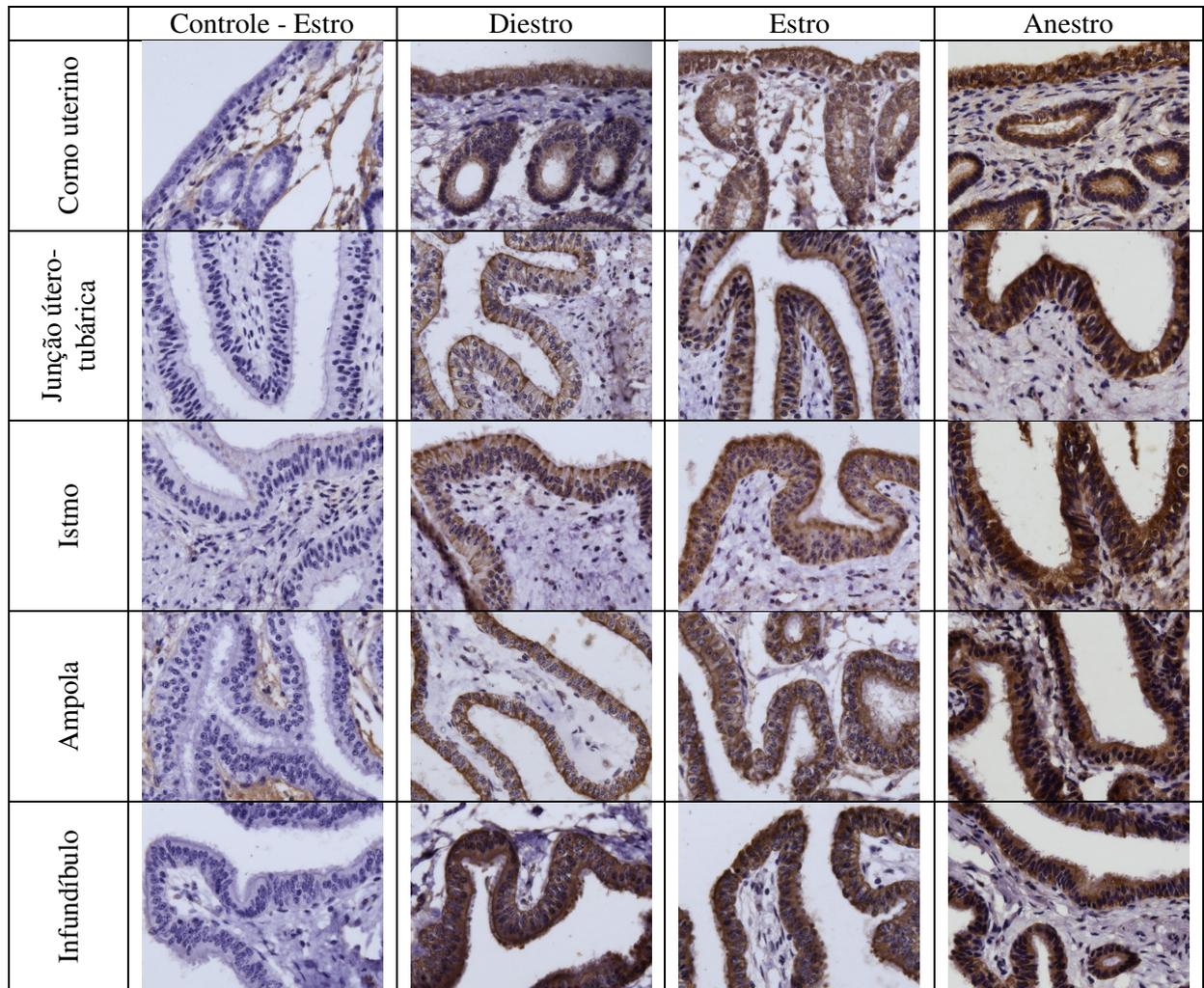


Figura 9 - Imagens representativas da imunomarcagem do receptor EP₄ na região da mucosa do corno uterino, da junção útero-tubárica e das diferentes porções da tuba uterina de éguas nas fases de diestro, estro e anestro (100x) - São Paulo - 2008

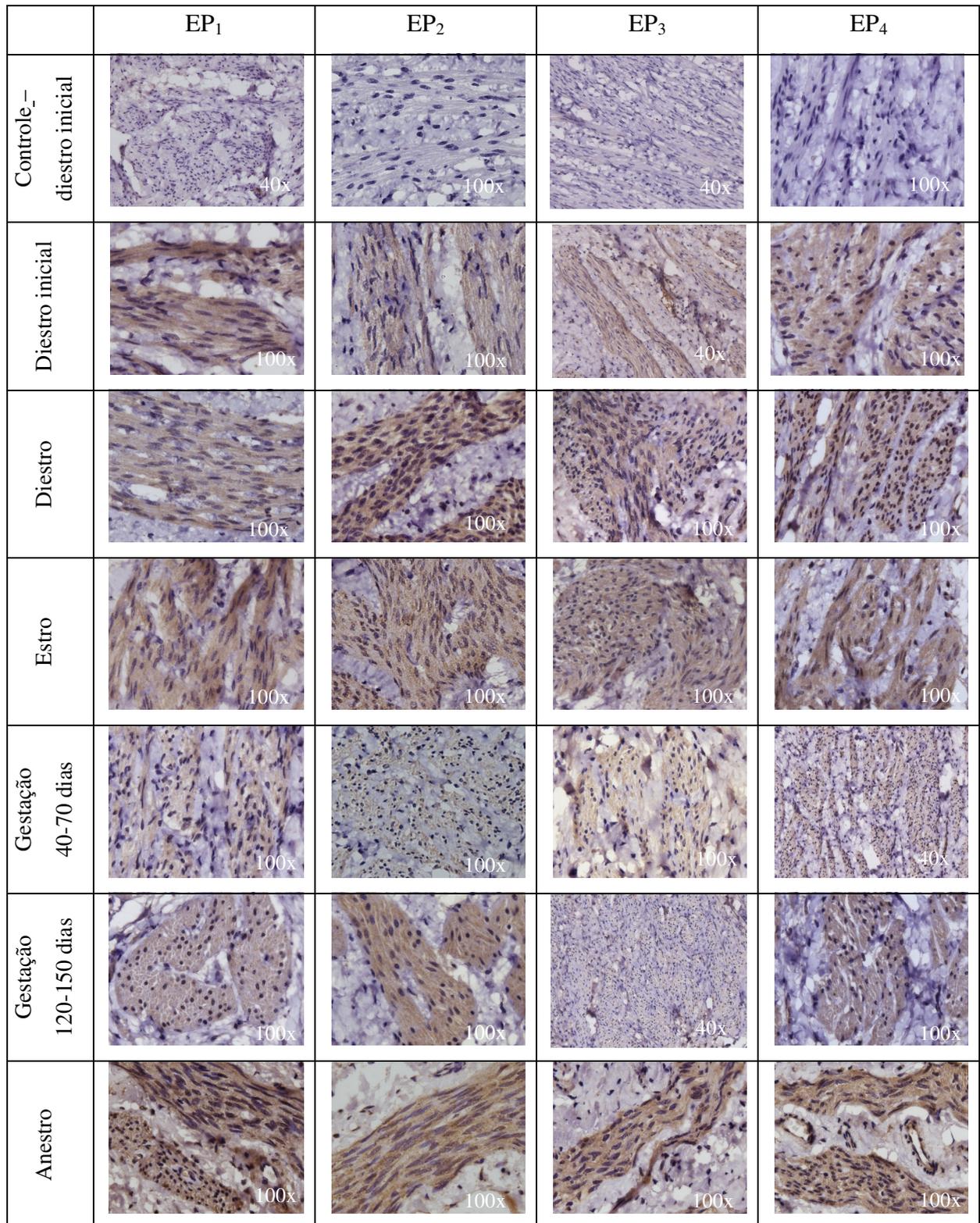


Figura 10 – Imagens representativas da imunomarcção dos receptores EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄ no miométrio de éguas em diferentes fases do ciclo estral e durante diferentes períodos gestacionais - São Paulo - 2008

3.4.5 Comparação entre a expressão dos diferentes subtipos de receptores de prostaglandinas da série E (EP)

Considerando-se todos os segmentos do sistema genital e todos os momentos estudados, verificamos que houve uma menor imunomarcção do receptor do subtipo EP₁ (P<0,001) em comparação aos demais (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado geral da análise imuno-histoquímica de receptores de prostaglandina E no epitélio do trato genital de éguas em diferentes fases do ciclo ou em estado gestacional (1=fraca, 2=fraca a moderada, 3=moderada, 4=moderada a forte, 5=forte) - São Paulo - 2008

	Receptor			
	EP ₁	EP ₂	EP ₃	EP ₄
Soma dos Ranks	36,00	85,50	82,00	96,50
Mediana	3,00	4,00	4,00	5,00
Média dos Ranks	1,20	2,85	2,73	3,22
Média de marcação ± DP	2,87 ± 0,82 ^a	4,13 ± 0,90 ^b	4,03 ± 0,99 ^b	4,37 ± 0,76 ^b

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na linha diferem entre si (P < 0,05)

4 DISCUSSÃO

Até hoje, todas as pesquisas realizadas com prostaglandinas do tipo E em equinos tinham por objetivo básico estudar a migração do embrião pela tuba uterina e pelo útero, dando à PGE₂ total responsabilidade pela passagem do embrião para o ambiente uterino. Com os resultados obtidos por Robinson, Neal e Allen (1998, 2000) percebemos que poderia ser admissível a utilização das PGE com a pretensão de se recuperar embriões equinos o mais precocemente possível, com um tamanho suficientemente pequeno e adequado para os protocolos de criopreservação. Além disso, a inclusão da biotécnica de superestimulação ovariana, que tem demonstrado intensos avanços nos últimos anos para a espécie, seria um ponto de extrema significância para aumentar o número de embriões disponíveis.

Inicialmente tínhamos a expectativa de repetir os resultados de Robinson, Neal e Allen (1998, 2000), mas precisávamos adequar o experimento à realidade brasileira. O primeiro ponto que precisávamos inovar seria em relação à técnica de aplicação da PGE, pois, apesar do sucesso relatado naquela referência, o procedimento de laparoscopia requer a utilização de um equipamento de elevado custo para a medicina veterinária de campo e que deve ser operado por um profissional adequadamente treinado para se reduzir ao mínimo os riscos ao paciente e o tempo da intervenção. Esta dificuldade também foi observada por Arruda et al. (comunicação pessoal). Portanto, além do procedimento de vídeo-laparoscopia, utilizamos uma técnica original na literatura para a aplicação tópica de PGE₂, inspirada em um método utilizado para a inseminação artificial em éguas que deposita o sêmen em um ponto mais próximo do local de fertilização, permitindo a redução da dose inseminante. Esta técnica, conhecida como procedimento de desvio da pipeta, utiliza uma pipeta flexível que é introduzida até a ponta do corno, ipsilateral ao folículo pré-ovulatório, onde o sêmen é então depositado. No nosso experimento, no lugar do sêmen utilizamos o gel contendo a PGE₂ e realizamos o depósito no local mais próximo possível da junção útero-tubárica (papila), seguida de uma leve massagem através da parede do reto, visando facilitar o contato do gel com a papila.

No primeiro experimento não obtivemos diferença entre os métodos de vídeo-laparoscopia e de desvio de pipeta em relação à taxa de recuperação embrionária, mas observamos uma maior aplicabilidade da técnica não-cirúrgica, por poder ser realizada por um veterinário com experiência em transferência de embriões (TE), não necessitando ser um cirurgião; por não necessitar da aquisição de instrumentos e de uma infra-estrutura, além das

necessárias para a realização de uma TE; poder ser realizada em um menor tempo em comparação a técnica cirúrgica e especialmente por ter um custo menor.

Em relação à recuperação embrionária não conseguimos obter embriões com cinco dias de idade e tivemos uma baixa recuperação no 6º dia, inferior ao esperado e relatado normalmente na literatura. Portanto, respeitadas as devidas modificações no material e métodos, não conseguimos reproduzir os resultados relatados por Robinson, Neal e Allen (1998, 2000), refutando inicialmente a nossa hipótese de que a administração tópica de PGE₂ sobre a tuba uterina ou na junção útero-tubárica promoveria a recuperação antecipada de embriões eqüinos. Sendo que, podemos atribuir este insucesso à impossibilidade que encontramos em adquirir um produto comercial contendo a PGE₂ em um veículo a base de gel e ao provável insucesso que tivemos na tentativa de incorporar a droga liofilizada a um gel de fórmula idêntica a indicada no produto comercial, entretanto, manuseado em uma farmácia de manipulação.

Através do procedimento de aplicação da PGE₂ na junção útero-tubárica não foi possível controlar e comprovar a ação do produto, porém, por meio de vídeo-laparoscopia evidenciamos que o gel utilizado rapidamente tornou-se fluido em contato com a tuba uterina, provavelmente devido à exposição à temperatura intra-abdominal, escorrendo e não ficando aderido ao órgão, conforme ansiado. Entretanto, poucos segundos após a administração da droga, mesmo após a perda da consistência do gel, evidenciamos uma importante vasodilatação (Figura 4) na região da tuba e do ovário ipsilateral à deposição. Isto significa que ao menos a propriedade de vasodilatação da PGE₂ foi mantida no produto manipulado por nós e que provavelmente as outras ações da droga também foram preservadas. No entanto, não podemos garantir que a ação desejada de relaxamento da musculatura lisa foi obtida na tuba uterina banhada pelo gel.

Deste modo, podemos elencar alguns dos problemas que podem ter ocorrido e impedido o sucesso do primeiro experimento.

A primeira coisa que precisamos lembrar é que a PGE₂ é um prostanóide muito instável, que se dissocia rapidamente. Portanto, uma das possibilidades é que o gel que manipulamos não foi capaz de manter a estabilidade da droga por um período suficiente para promover a ação de relaxamento das células musculares. Outro fator que pode ter ocorrido é que como a droga se fluidificou, o tempo de contato com a tuba uterina e com a junção útero-tubárica pode ter sido insuficiente. Talvez utilizando a droga comercial (Prepidil gel[®] ou Prostin E₂ Vaginal gel[®], por exemplo), o tempo de contato com os órgãos seja maior, assim como, a estabilidade do produto. Seria necessário um experimento comparando o produto

comercial com o produto manipulado, mas, infelizmente, isto não é possível de ser realizado em nosso país no momento. Outro experimento importante seria a avaliação *in vitro* da ação da droga, sob condições de temperatura controlada, para conseguirmos presumir por quanto tempo a droga permanece ativa, agindo sobre a tuba uterina.

Diante das dificuldades e dos resultados obtidos com o experimento I, percebemos que deveríamos buscar um produto de mais fácil aquisição e que possuísse uma maior estabilidade em comparação à PGE₂.

Em nossa procura descobrimos que a PGE₁ poderia ser uma boa alternativa, primeiro porque ela tem a mesma ação que a PGE₂ na tuba uterina humana (SANDBERG; INGELMAN-SUNDBERG; RYDEN, 1964), segundo por ser um produto de maior disponibilidade no país, terceiro por ter uma melhor estabilidade do que a PGE₂ e por último por ter um menor custo.

A PGE₁, também conhecido como Alprostadil, está disponível no país como produto ativo de medicamentos de ação local (injeções intra-cavernosas) contra as disfunções eréteis humanas (Caverject[®]). O análogo sintético misoprostol, amplamente conhecido pelo nome de Cytotec[®], foi introduzido e comercializado no Brasil a partir de 1987 para tratamento da úlcera péptica, mas a literatura mundial e brasileira também demonstrou que o misoprostol é muito eficiente na maturação do colo uterino, indução do trabalho de parto e aborto (Disponível em: <<http://www.hebron.com.br/medica/cientificos/mono001prostokos.doc>>). No Brasil este medicamento, disponível para uso intravaginal, é produzido pela Hebron Farmacêutica, Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica sob o nome de Prostokos[®].

Além da maior facilidade de aquisição, a PGE₁ e o misoprostol, diferentemente da PGE₂, são estáveis à temperatura ambiente e atualmente, no Brasil, apresentam um custo 15 a 20 vezes mais baixo em comparação à PGE₂ (dinoprostone). Diante de inúmeras vantagens decidimos repetir o procedimento de deposição local na junção útero-tubárica utilizando a PGE₁ e o misoprostol. E, visando aumentar o tempo de contato destas prostaglandinas com a junção, elas foram incorporadas a um gel, assim como no experimento I. Além disso, optamos por garantir o estímulo através de uma segunda aplicação local.

É importante reforçarmos que as doses utilizadas da PGE₁ e do misoprostol foram iguais (200µg), entretanto, as drogas apresentavam-se em concentrações diferentes, em virtude exclusivamente da matéria prima disponível. Este é um importante ponto de discussão porque acreditamos que como a PGE₁ estava na sua forma pura (100%) ela foi altamente irritativa, provocando uma reação inflamatória uterina em 80% das éguas tratadas, que evidenciamos pelos lavados turvos. No grupo tratado com misoprostol a 1%, ao contrário,

apenas um animal apresentou um lavado levemente turvo, e ainda apenas no primeiro litro recuperado do útero.

Em relação à recuperação embrionária também refutamos a nossa hipótese de que a PGE_1 e seu análogo acelerariam a migração do embrião equino pela tuba uterina, antecipando sua descida para o útero para o quinto dia após a ovulação. Entretanto, obtivemos uma excelente recuperação embrionária (100%), no D6-6,5, no grupo tratado com o misoprostol a 1%, sendo que todos os embriões recuperados possuíam um tamanho adequado para serem submetidos à criopreservação. Assim, apesar de não colhermos embriões com cinco dias de idade, o protocolo utilizando o misoprostol associado à biotécnica de superovulação mostrou-se muito promissor e indicado para ser realizado quando se pretende submeter os embriões à criopreservação. Contudo, devido à reação inflamatória uterina observada, recomenda-se utilizá-lo apenas em éguas resistentes à endometrites.

Este resultado abre um rol de experimentos que podem ser desenvolvidos para aprimorar este protocolo primogênito. Primeiramente precisamos discernir se realmente há uma diferença entre o misoprostol e a PGE_1 sobre a tuba uterina, ou se a diferença nos resultados deveu-se exclusivamente pela concentração das drogas. Assim, há a necessidade de realizarmos um experimento comparando a PGE_1 e o seu análogo utilizando a mesma concentração e a mesma dose.

Depois de estabelecido se há diferença entre a PGE_1 e o seu análogo misoprostol, outras concentrações e outras dosagens devem ser testadas, visando diminuir ao máximo a reação inflamatória local, reduzir os custos e manter o ótimo resultado obtido no grupo experimental tratado com o misoprostol.

Ainda, se comprovado que a PGE_1 e o seu análogo na mesma concentração possuem a mesma ação, como é esperado, isto pode significar que o efeito desejado na tuba uterina é obtido com uma determinada concentração e que aumentando esta concentração o efeito desejado não é mais alcançado. Com os resultados obtidos com o grupo tratado com misoprostol acreditamos que a droga a 1%, tal como é utilizado para promover a maturação do colo uterino em mulheres, e a dosagem de 200 microgramas estejam próximas do ideal.

Pelo fato do misoprostol ser uma droga mais estável, acreditamos ainda ser possível diminuir o número de administrações da droga para apenas uma. Entretanto, acreditamos que isto possa ser mais facilmente conquistado por meio da mudança do veículo onde a prostaglandina é incorporada. Desejamos um veículo que promova uma liberação controlada da prostaglandina. Em virtude disso, recomendamos que experimentos com nanopartículas e com complexos de inclusão com as ciclodextrinas sejam realizados. Relata-se que as

ciclodextrinas possuem uma habilidade especial para se complexar com drogas, permitindo aumentar a solubilidade, melhorar a estabilidade, controlar a disponibilidade da droga e diminuir a irritação do tecido (LI; LOH, 2008).

Outro ponto do protocolo que necessita ser avaliado é a superestimulação ovariana. A dosagem utilizada no segundo experimento (12,5 mg) mostrou-se mais adequada que a baixa dosagem (6 mg) utilizada no primeiro, pois conseguimos em média 2,1 ovulações com a dosagem mais alta e apenas 1,4 ovulações em média com a mais baixa. Em relação à sincronia, não tivemos ovulações não-sincrônicas com a baixa dosagem, mas, das 21 ovulações obtidas no segundo experimento, cinco (23,8%) foram não-sincrônicas. Isto ocorreu porque utilizamos o EPE como agente estimulador ovariano. O EPE possui tanto FSH como LH, além de outros hormônios e substâncias, e esta relação varia de acordo com o lote utilizado. Infelizmente não tivemos acesso à informação das quantidades relativas de FSH e de LH nos lotes de EPE utilizados, mas acreditamos que eles tinham uma quantidade de LH além da desejável. Para contornar este problema recomendamos utilizar um lote de EPE que possua a menor fração possível de LH, ou ainda, se possível, utilizar o FSH purificado de origem equina (eFSH).

O terceiro experimento surgiu da necessidade que tínhamos em verificar a presença e quais os subtipos de receptores EP que estão presentes no útero e na tuba uterina de éguas, principalmente durante a fase do diestro, para comprovarmos que a administração das prostaglandinas do tipo E na região da junção útero-tubárica não é empírica. Através da técnica de imuno-histoquímica nós conseguimos detectar no útero, na junção útero-tubárica e em todas as porções da tuba uterina, os quatro subtipos de receptores testados. Estes subtipos estavam presentes em todas as fases do ciclo estudadas e também durante os dois períodos gestacionais estudados (40-70 dias e 120-150 dias). Este parece ser o primeiro relato de imunolocalização destes subtipos de receptores no útero e na tuba uterina equina. Até o momento, estes receptores para prostaglandinas do tipo E somente foram detectados na tuba uterina de mulheres (WANGGREN et al., 2006), de camundongos (SEGI et al., 2003) e no oviduto de galinhas (KWOK et al., 2008). Já no útero, alguns subtipos foram detectados em camundongos (HONDA et al., 2003), em hamster (COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994), humanos (ASTLE; THORNTON; SLATER, 2005) e bovinos (WEHBRINK et al., 2008).

Conseguimos demonstrar por este experimento que não há uma diferença qualitativa na expressão dos quatro subtipos, em decorrência da fase do ciclo, nas diferentes porções da

tuba uterina e no útero equino. Contudo, realizando-se uma análise geral dos seis animais analisados, o subtipo EP₁ foi o menos expresso (Tabela 3).

Entretanto, diferentemente do que se pensava e do que está descrito na literatura, a ação das prostaglandinas do tipo E não parece ser apenas sobre a musculatura lisa do trato genital, visto que, além das células musculares, as células do epitélio também foram imunomarcadas, o que deve trazer uma mudança nos conceitos.

Este resultado abre uma série de questões que precisam ser respondidas, tais como:

- Se a PGE₂ é considerada como a responsável pela migração do embrião pela tuba uterina, porque seus receptores são expressos nas diferentes fases do ciclo, inclusive durante o anestro?

- Qual é a ação promovida pela ligação das PGE nos receptores localizados nas células epiteliais da tuba uterina?

- Diferentes concentrações de PGE podem ativar diferentes subtipos de receptores EP?

- Porque detectamos receptores dos subtipos EP₁, EP₂ e EP₃ nos cílios das células do epitélio uterino e tubárico e não detectamos o subtipo EP₄?

- Existem isoformas do subtipo EP₃ em equinos, assim como em bovinos (NAMBA et al., 1993) e em mulheres (KOTELEVETS et al., 2007)?

- Existem outros receptores, como os do tipo FP e IP, no sistema genital de éguas e em quais situações estão expressos?

Assim, entendemos que muito há ainda para ser respondido e que devemos desmistificar que o processo de migração embrionária equina baseia-se apenas na ação da PGE₂ sobre a musculatura lisa da tuba uterina e sobre o sistema vascular. Pois os dados sugerem que o transporte embrionário e a comunicação entre o embrião e a tuba envolvem a ação das prostaglandinas sobre os receptores EP em adição ao efeito das prostaglandinas sobre o sistema vascular e a contratilidade muscular.

Neste estudo, a expressão de EP₁ foi encontrada nas células epiteliais do lúmen da tuba uterina, assim como em mulheres (WANGGREN et al., 2006) e isso pode nos levar a especular que assim como a ação da PGE₂ sobre os receptores do subtipo EP₁ regulam a secreção de muco nas células da mucosa gástrica (OHNISHI et al., 2001), a atuação das PGE através deste subtipo de receptor pode favorecer o desenvolvimento embrionário através da secreção de muco. Já a ação das PGE sobre o receptor do subtipo EP₁ nas células musculares resulta em um aumento no IP₃, que induz a uma liberação de cálcio que leva a contração da musculatura lisa.

Acreditamos que os receptores EP₂, também encontrados no epitélio luminal da tuba e do útero, além da lâmina própria e das células musculares, podem estar envolvidos no processo de fertilização, pois fêmeas de camundongos com deficiência de receptores EP₂ são inférteis, e isto é atribuído a uma inibição da fertilização do ovócito (TILLEY et al., 1999). Acredita-se que essa infertilidade pode ser devida a uma inibição da expansão das células do cumulus (HIZAKI et al., 1999). Assim, o papel do receptor EP₂ pode ser o de regular a composição do fluido tubárico excretado, importante para a expansão do cumulus e para fornecer um ótimo ambiente para o embrião durante sua passagem através da tuba uterina. Já a ligação da PGE no receptor o subtipo EP₂ localizado nas células musculares da tuba e do útero resulta em um aumento na atividade da adenilato ciclase, que leva a um aumento do AMPc que determinará o relaxamento da musculatura lisa.

Para definirmos a ação das PGE sobre os receptores EP₃, acreditamos que primeiro precisamos definir quais são as isoformas presentes na espécie eqüina, informação ainda não disponível, para depois podermos atribuir suas funções tanto nas células epiteliais como nas musculares, pois o mecanismo de transdução do sinal depende da isoforma expressa. Apesar disso, é creditado que nas células musculares ele esteja mais envolvido no mecanismo de contração da musculatura lisa (COLEMAN et al., 1990).

Já a ação da PGE₂ sobre o receptor EP₄ parece estimular a atividade dos cílios e a secreção de glicoproteínas no epitélio da tuba uterina de coelhas (SEGI et al., 2003). Wanggren et al. (2006) acreditam que a função de EP₄ na tuba uterina humana pode regular a secreção de glicoproteínas e o batimento de cílios, assim como em coelhos e camundongo. Entretanto, estes autores não fazem alusão da imunomarcagem dos subtipos de receptores sobre os cílios da tuba. Como no nosso estudo detectamos receptores dos subtipos EP₁, EP₂ e EP₃ nos cílios, mas não os do subtipo EP₄, supomos que, diferentemente do relatado para mulheres, coelhos e camundongos, a atuação das PGE sobre os subtipos EP₁, EP₂ e EP₃, mas não o subtipo EP₄, estejam envolvidos no movimento dos cílios da tuba uterina. Já a ligação da PGE no receptor do subtipo EP₄, presente nas células musculares, parece ser bem parecido ao relatado para o subtipo EP₂, com aumento na atividade da adenilato ciclase e do AMPc, mediando o relaxamento da musculatura lisa (JABBOUR; SALES, 2004).

Desta forma, precisamos agora responder qual é a ação das PGE sobre cada subtipo de receptor e em cada fase do ciclo estral da égua. Para isso, estudos competitivos com agonistas e antagonistas específicos podem colaborar.

5 CONCLUSÕES

- A PGE₂, quando aplicada no D4, em forma de gel manipulado, sobre a tuba uterina ou sobre a junção útero-tubárica de éguas, não antecipa a descida do embrião para o útero no D5;
- O método não-cirúrgico de administração das PGEs, que utiliza uma pipeta flexível para acessar a junção útero-tubárica, é uma técnica viável e de fácil aplicação, sendo superior a técnica que utiliza a vídeo-laparoscopia;
- Não houve diferença na taxa de recuperação embrionária no D6-6,5 quando se comparou o método cirúrgico (vídeo-laparoscopia) com o método não-cirúrgico (pipeta flexível na junção útero-tubárica);
- A aplicação tópica sobre a JUT de PGE₁, ou de seu análogo (misoprostol 1%) no D4, não antecipa a descida do embrião eqüino para o útero no D5;
- O misoprostol 1% (análogo da PGE₁) quando aplicado na junção útero-tubárica no D4, mostrou-se altamente eficiente (100%) em aumentar a taxa de recuperação embrionária no D6-6,5, quando comparado a PGE₁;
- Os embriões recuperados no D6-6,5, após aplicação no D4 do misoprostol 1% na junção útero-tubárica, apresentavam tamanhos e morfologias adequadas para serem submetidos a protocolos de criopreservação;
- A égua apresenta receptores dos subtipos EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄ no útero, na junção útero-tubárica e nas diferentes porções da tuba uterina (istmo, ampola e infundíbulo), nas fases de diestro inicial, diestro, estro, anestro e durante a gestação entre 40 e 70 dias e entre 120 e 150 dias;
- A égua apresenta receptores dos subtipos EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄ nas células do epitélio de revestimento, na lâmina própria e na camada muscular do corno uterino, da junção útero-tubárica e nas diferentes porções da tuba uterina;
- Os receptores dos subtipos EP₁, EP₂ e EP₃ são expressos nos cílios das células do epitélio tubárico de fêmeas eqüinas; entretanto, não existe a expressão do subtipo EP₄;
- Nas fêmeas eqüinas, o subtipo EP₁ é expresso em menor quantidade no trato reprodutivo como um todo em comparação aos demais subtipos estudados;
- Na égua, a presença de subtipos de receptores de PGE nas células do epitélio de revestimento do lúmen tubárico e uterino, além da presença nas células musculares, sugere que o transporte embrionário e a comunicação entre o embrião e a tuba envolvem a ação das prostaglandinas sobre os receptores EP em adição ao efeito das prostaglandinas sobre o sistema vascular e a contratilidade muscular.

REFERÊNCIAS³³

- ALVARENGA, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEIRA, C. Some modifications in the technique used to recovery equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 111-112, 1993. Supplementum 15.
- ALVARENGA, M. A.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J.; NEVES NETO, J. R.; SQUIRES, E. L. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, v. 56, n. 6, p. 879-887, 2001.
- ALVARENGA, M. A.; SQUIRES, E. L.; MACHADO, M. S.; ARANTES, M.; PERES, K. R.; LEÃO, K. M.; OLIVEIRA, J. V.; ROSER, J. F. Avaliação da resposta superovulatória em éguas tratadas com FSH equino purificado. **Acta Science Veterinary**, v. 31, p. 216-217, 2003 (abstract).
- ASTLE, S.; THORNTON, S.; SLATER, D. M. Identification and localization of prostaglandin E2 receptors in upper and lower segment human myometrium during pregnancy. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, n. 4, p. 279-287, 2005.
- AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá - IDSM/MCT/CNPq, 2007. 364 p.
- BARRY, D. M.; VAN NIEKERK, C. H.; RUST, J.; VAN DER WALT, T. Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with prostaglandin E2 and estradiol. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 190, 1990.
- BATTUT, I.; COLCHEN, S.; FIENI, F.; TAINTURIER, D.; BRUYAS, J. -F. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, p. 60-62, 1998. Supplementum 25.
- BATTUT, I.; GRANDCHAMP DES RAUX, A.; NICAISE, J. L.; FIENI, F.; TAINTURIER, D.; BRUYAS, J. F. When do equine embryos enter the uterine cavity: an attempt to answer? **Havemeyer Foundation Monograph Series**, Finland, n. 3, p. 66-68, 2000.

³³ UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. FACULDADE DE MEDICINA. Veterinária e Zootecnia. Serviço de Biblioteca e Documentação. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo / Serviço de Biblioteca e Documentação. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo; Coordenação de Rosa Maria Fischi Zani, Maria Cláudia Pestana. -- 4. ed. rev. atual. ampl. -- São Paulo : SBD, 2003. 84 f.

BENEDETTO, C.; MCDONALD-GIBSON, R. G.; NIGAN, S.; SLATER, T. F. **Prostaglandins and related substances a practical approach**. Oxford –Washington, Ed. IRL Press, 1987, 327 p.

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

BETTERIDGE, K. J.; MITCHELL, D. A surgical technique applied to the study of tubal eggs in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 519-524, 1975. Supplementum 23.

BETTERIDGE, K. J.; MITCHELL, D. Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 39, n. 1, p. 145-148, 1974.

BRUYAS, J. -F.; BÉZARD, J.; LAGNEAUX, D.; PALMER, E. Quantitative analysis of morphological modifications of day 6.5 horse embryos after cryopreservation: differential effects on inner cell mass and trophoblast cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, n. 1, p. 15-23, 1993.

BUSER, D.; MORA, G.; ARIAS, F. A randomized comparison between misoprostol and dinoprostone for cervical ripening and labor induction in patients with unfavorable cervixes. **Obstetrics & Gynecology**, v. 89, n. 4, p. 581-585, 1997.

BYGDEMAN, M.; FREDRICSSON, B.; SYANDORG, K.; SAMUELSSON, B. The relation between fertility and prostaglandin content of seminal fluid in man. **Fertility and Sterility**, v. 21, n. 8, p. 622, 1970.

CARMO, M. T. **Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária equina na indução de superovulação em éguas**. 2003. 156f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

CARNEVALE, E. M.; ELDRIDGE-PANUSKA, W. D.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; SEIDEL, G. E.; SQUIRES, E. L. Embryo development rates after vitrification and transfer of equine embryos. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 6., 2004, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: R&W Publications, 2004. p. 20.

CARROLL, C. L.; HUNTINGTON, P. J. Body condition scoring and weight estimation of horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 20, n. 1, p. 41-45, 1988.

COLEMAN, R. A.; KENNEDY, I.; HUMPHREY, P. P. A.; BUNCE, K.; LUMLEY, P. Prostanoids and their receptors. In: EMMETT, J. C. (Ed.). **Comprehensive medicinal chemistry: membranes and receptors**. Oxford, UK: Pergamon Press, 1990. v. 3, p. 643-714.

COLEMAN, R. A.; SMITH, W. L.; NARUMIYA, S. VIII International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacological Reviews**, v. 46, n. 2, p. 205-229, 1994.

COUTINHO, E. M.; MAIA, H. S. The contractile response of the human uterus, fallopian tubes, and ovary to prostaglandins in vivo. **Fertility and Sterility**, v. 22, n. 9, p. 539-543, 1971.

CRISMAN, R. O.; MCDONALD, L. E.; WALLACE, C. E. Oviduct (uterine tube) transport of ova in the cow. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 4, p. 645-647, 1980.

DAVID, J. S. E. A survey of eggs in the oviducts of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 513-517, 1975. Supplementum 23.

DUCHENS, M.; FREDRIKSSON, G.; KINDAHL, H.; AIUMLAMAI, S. Effect of intracervical administration of a prostaglandin E2 gel in pregnant and non-pregnant heifers. **Veterinary Record**, v. 133, n. 22, p. 546-549, 1993.

FERREIRA, J. C. P.; MEIRA, C.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; ALVARENGA, M. A.; BURATINI, J. Criopreservation of equine embryos with glycerol plus sucrose and glycerol plus 1,2-propanediol. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, p. 88-93, dec. 1997. Supplementum 25.

FREEMAN, D. A.; WEBER, J. A.; GEARY, R. T.; WOODS, G. L. Time of embryo transport through the mare oviduct. **Theriogenology**, v. 36, n. 5, p. 823-830, 1991.

FREEMAN, D. A.; WOODS, G. L.; VANDERWALL, D. K.; WEBER, J. A. Embryo-initiated oviductal transport in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, n. 2, p. 535-538, 1992.

GANDOLFI, F.; BREVINI, T. A. L.; MODINA, S.; PASSONI, L. Early embryonic signals: embryo-maternal interactions before implantation. **Animal Reproduction Science**, v. 28, n. 1-4, p. 269-276, 1992.

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

GEARY, R. T.; WEBER, J. A.; WOODS, G. L. Hastened transport of equine embryos through the oviduct of the mare. **Theriogenology**, v. 31, n. 5, p. 973-978, 1989.

GRANSTRÖM, L.; EKMAN, G.; ULMSTEN, U. Myometrial activity after local application of prostaglandin E2 for cervical ripening and term labor induction. falta título do artigo. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 162, n. 3, p. 691-694, 1990.

HINRICHS, K.; WATSON, E. D. Effect of administration of phenylbutazone or progesterone on recovery of embryos from the uterus of mares 5 days after ovulation. **American Journal Veterinary Research**, v. 52, n. 5, p. 678-681, 1991.

HIZAKI, H.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; HIROSE, M.; SAJI, T.; USHIKUBI, F.; MATSUOKA, T.; NODA, Y.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; NARUMIYA, S.; CHIKAWA, A. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 18, p. 10501–10506, 1999.

HOCHI, S.; FUJIMOTO, T.; BRAUN, J.; OGURI, N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. **Theriogenology**, v. 42, n. 3, p. 483-488, 1994.

HOCHI, S.; FUJIMOTO, T.; OGURI, N. Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7, n. 1, p. 113-117, 1995.

HOLST, P. J. The time of entry of ova into the uterus of the ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 36, n. 1, p. 427-428, 1974.

HONDA, A.; SUGIMOTO, Y.; NAMBA, T.; WATABE, A.; IRIE, A.; NEGISHI, M.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₂ subtype. **Journal of Biology Chemistry**, v. 268, n. 11, p. 7759-7762, 1993.

HUANG, J-C.; ARBAB, F.; TUMBUSCH, K. J.; GOLDSBY, J. S.; MATIJEVIC-ALEKSIC, N.; AND WU, K. K. Human Fallopian Tubes Express Prostacyclin (PGI) Synthase and Cyclooxygenases and Synthesize Abundant PGI. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 9, p. 4361-4368, 2002

JABBOUR, H. N.; SALES, K. J. Prostaglandin receptor signalling and function in human endometrial pathology. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 8, p. 398–404, 2004.

KOTELEVETS, L.; FOU DI, N.; LOUEDEC, L.; COUVELAR, A.; CHASTRE, E.; NOREL, X. A new mRNA splice variant coding for the human EP_{3,1} receptor isoform. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, n. 3-4, p. 195-201, 2007.

KWOK, A. H. Y.; WANG, Y.; WANG, C. Y.; LEUNG, F. C. Molecular cloning and characterization of chicken prostaglandin E receptor subtypes 2 and 4 (EP₂ and EP₄). **General and Comparative Endocrinology**, v. 157, n. 2, p. 99-106, 2008.

LEETHONGDEE, S.; KHALID, M.; BHATTI, A.; PONGLOWHAPAN, S.; KERSHAW, C. M.; SCARAMUZZI, R. J. The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 767-777, 2007.

LEGRAND, E.; BENCHARIF, D.; BARRIER-BATTUT, I.; DELAJARRAUD, H.; CORNIÈRE, P.; FIÉNI, F.; TAINTURIER, D.; BRUYAS, J. F. Comparison of pregnancy rates for days 7-8 equine embryos frozen in glycerol with or without previous enzymatic treatment of their capsule. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 721-723, 2002.

LEGRAND, E.; KRAWIECKI, J. M.; TAINTURIER, D.; CORNIÈRE, P.; DELAJARRAUD, H.; BRUYAS, J. F. Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos? **Havemeyer Foundation Monograph**, Finland, n.3, p. 62-65, 2000.

LI, J.; LOH, X. J. Cyclodextrin-based supramolecular architectures: synthesis, structures, and applications for drug and gene delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 9, p. 1000-1017, 2008.

MACHADO, M. S.; ARANTES, M.; PERES, K. R.; LEÃO, K. M.; CARMO, M. T.; SQUIRES, E. L.; ALVARENGA, M. A. Dinâmica folicular, número de ovulações e embriões recuperados em éguas submetidas a tratamento superovulatório, utilizando-se extrato de pituitária equina e FSH equino purificado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 506-8, 2003.

MACHADO, M. S.; CARMO, M. T.; SQUIRES, E. L.; ROSER, J. F.; ALVARENGA, M. A. Follicular dynamic, superovulation response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract and equine FSH. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 6., 2004, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: P&W Publications, 2004. p. 29.

MACLELLAN, L. J.; BASS, L. D.; McCUE, P. M.; SQUIRES, E. L. Effect of cooling large and small equine embryos prior to cryopreservation on pregnancy rates after transfer. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 306, 2003. (abstract)

MACLELLAN, L. J.; CARNEVALE, E. M.; COUTINHO DA SILVA, M. A.; MCCUE, P. M.; SEIDEL JUNIOR, G. E.; SQUIRES, E. L. Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin-B and/or trypsin. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 717-720, 2002.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Equine embryo transfer. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 4, n. 2, p. 305-333, 1988.

MEIRA, C.; ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; OBA, E.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2-propanediol as cryoprotectants. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 64-66, oct. 1993. Supplementum 15.

NAMBA, T.; SUGIMOTO, Y.; NEGISHI, M.; IRIE, A.; USHIKUBI, F.; KAKIZUKA, A.; ITO, S.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP₃ determines G-protein specificity. **Nature**, v. 365, n. 6442, p. 166-170, 1993.

OGINO, N.; MIYAMOTO, T.; YAMAMOTO, S.; HAYAISHI, O. Prostaglandin endoperoxide E isomerase from bovine vesicular gland microsomes, a glutathione-requiring enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 3, p. 890-895, 1977.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical egg transfer in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, n.2, p. 313-320, 1974.

OHNISHI, A.; SHIMAMOTO, C.; KATSU, K.; ITO, S.; IMAI, Y.; NAKAHARI, T. EP1 and EP4 receptors mediate exocytosis evoked by prostaglandin E(2) in guinea-pig antral mucous cells. **Experimental Physiology**, v. 86, n. 4, p. 451-460, 2001.

ONUMA, H.; OHNAMI, Y. Retention of tubal eggs in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 507-511, 1975. Supplementum 23.

OXENREIDER, S. L.; DAY, B. N. Transport and cleavage of ova in swine. **Journal Animal Science**, v. 24, n. 2, p. 413-417, 1965.

PALERMO-NETO, J. Prostaglandinas. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 1996. p. 184-194.

PARK, J. Y.; PILLINGER, M. H.; ABRAMSON, S. B. Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: The role of PGE₂ synthases. **Clinical Immunology**, v. 119, n. 3, p. 229-240, 2006.

PERES, K. R.; FERNANDES, C. B.; ALVARENGA, M. A.; LANDIM-AVARENGA, F.C. Effect of eFSH on ovarian cyclicity and embryo production of mares in spring transitional phase. **Jornal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 4, p. 176-180, 2007.

PERES, K. R. **Avaliação do uso do Hormônio Folículo Estimulante Equino (eFSH) visando a antecipação da estação reprodutiva e a superovulação de éguas na fase de transição de primavera**. 2004. 131 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

POITRAS, P.; GUAY, P.; VAILLANCOURT, D.; ZIDANE, N.; BIGRAS-POULIN, M. In vitro viability of cryopreserved equine embryos following different freezing protocols. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 58, n. 4, p. 235-241, 1994.

PRATT, B. R.; BUTCHER, R. L.; INSKEEP, E. K. Antiluteolytic effect of the conceptus and of PGE₂ in ewes. **Journal of Animal Science**, v. 45, n. 4, p. 784-791, 1977.

RIGBY, S.; LOVE, C.; CARPENTER, K.; VARNER, D.; BLANCHARD, T. Use of prostaglandin E₂ to ripen the cervix of the mare prior to induction of parturition. **Theriogenology**, v. 50, n. 6, p. 897-904, 1998.

ROBINSON, S. J.; NEAL, H.; ALLEN, W. R. Modulation of oviductal transport in mares by local application of prostaglandin E₂. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, p. 587-592, 2000. Supplement 56.

ROBINSON, S. J.; NEAL, H.; ALLEN, W. R. Modulation of oviductal transport in the mare by local application of prostaglandin E₂. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 7, 1998, Pretória. **Proceedings...** South Africa: [s.n], 1998. p. 153-154.

SANDBERG, F.; INGELMAN-SUNDBERG, A.; RYDEN, G. The effect of prostaglandin E₁ on the human uterus and the fallopian tubes in vitro. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 42, n. 3, p. 269-278, 1963.

SANDBERG, F.; INGELMAN-SUNDBERG, A.; RYDEN, G. The effect of prostaglandin E₂ and E₃ on the human uterus and the fallopian tubes in vitro. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 43, n. 2, p. 95-102, 1964.

SCOGGIN, C. F.; MEIRA, C.; MCCUE, P. M.; CARNEVALE, E. M.; NETT, T. M.; SQUIRES, E. L. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p. 151-64, 2002.

SEGI, E.; HARAGUCHI, K.; SUGIMOTO, Y.; TSUJI, M.; TSUNEKAWA, H.; TAMBA, S.; TSUBOI, K.; TANAKA, S.; ICHIKAWA, A. Expression of messenger RNA for prostaglandin E receptor subtypes EP4/EP2 and cyclooxygenase isozymes in mouse periovulatory follicles and oviducts during superovulation. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 3, p.804–811, 2003.

SEIDEL JR, G. E.; SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O.; LONG, P. L. Cryopreservation of equine embryos in 1,2 propanediol. **Equine Veterinary Journal**, v. 8, p. 87-88, 1989. Supplementum 8.

SLADE, N. P.; TAKEDA, T.; SQUIRES, E. L.; ELSDEN, R. P.; SEIDEL JUNIOR, G. E. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. **Theriogenology**, v. 24, n. 1, p. 45-58, 1985.

SQUIRES, E. L. Advances in equine superovulation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 6., 2004, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: P&W Publications, 2004. p. 28.

SQUIRES, E. L. Embryo transfer. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.). **Equine Reproduction**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1993. p. 89-91.

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

SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E.; MCKINNON, A. O. Transfer of cryopreserved equine embryos to progestin-treated ovariectomised mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 8, p. 89-91, 1989. Supplementum 8.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Prostaglandin E2 and F2a production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. **Reproduction**, v. 123, n. 2, p. 261-268, 2002.

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

SUGIMOTO, Y.; NAMBA, T.; HONDA, A.; HAYASHI, Y.; NEGISHI, M.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₃ subtype. **Journal of Biology Chemistry**, v. 267, n. 10, p. 6463-6466, 1992.

THIBODEAUX, J. K.; ROUSSEL, J. D.; MYERS, M. W.; GODKE, R. A. Intrauterine infusion of prostaglandin E2 and subsequent luteal function in cattle. **Prostaglandins**, v. 44, n. 6, p. 531-541, 1992.

TILLEY, S. L.; AUDOLY, L. P.; HICKS, E. H.; KIM, H. S.; FLANNERY, P. J.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H.; Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 11, p. 1539–1545, 1999.

VAJE, S.; ELSAESSER, F.; ELGER, W.; ELLENDORF, F. Induktion der geburt beim schwein mit einem prostaglandin E. **Dtsch. Tierärztl. Wschr.**, v. 87, n. 3, p. 77-79, 1980.

VAN NIEKERK, C. H.; GERNEKE, W. H. Persistence and parthenogenetic cleavage of tubal ova in the mare. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 33, p. 195-232, jun. 1966.

VANDERWALL, D. K. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, n. 1, p. 61-83, 1996.

VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L.; WEBER, J. A. PGE2 secretion by the conceptus and binding by non-pregnant endometrium in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 24-27, 1993. Supplementum 15.

VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L.; WEBER, J. A.; LICHTENWALNER, A. B. Corpus luteal function in nonpregnant mares following intrauterine administration of prostaglandin E2 or estradiol-17b. **Theriogenology**, v. 42, n. 7, p. 1069-1083, 1994.

VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L.; WEBER, J. A.; LICHTENWALNER, A. B. Uterine transport of prostaglandin E2-releasing simulated embryonic vesicles in mares. **Theriogenology**, v. 40, n. 1, p. 13-20, 1993.

VOLKMANN, D. H.; BERTSCHINGER, H. J.; SCHULMAN, M. L. Effect of prostaglandin E2 on the cervixes of dioestrous and prepartum mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 30, n. 4, p. 240-244, 1995.

WÅNGGREN, K.; LALITKUMAR, P. G.; STAVREUS-EVERS, A.; STÅBI, B.; GEMZELL-DANIELSSON, K. Prostaglandin E2 and F2a receptors in the human Fallopian tube before and after mifepristone treatment. **Molecular Human Reproduction**, v. 12, n. 9, p. 577–585, 2006.

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

WEBER, J. A.; FREEMAN, D. A.; VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 4, p. 544-546, 1991a.

WEBER, J. A.; FREEMAN, D. A.; VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 4, p. 540-543, 1991b.

WEBER, J. A.; WOODS, G. L. Influence of embryonic secretory chemicals on selective oviductal transport in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, p. 36-38, 1993. Supplementum 15.

WEBER, J. A.; WOODS, G. L.; AGUILAR, J. J. Effects of cervical dilation and intrauterine infusions on the timing of oviductal transport of equine embryos. **Theriogenology**, v. 45, n. 8, p. 1443-1448, 1996a.

WEBER, J. A.; WOODS, G. L.; AGUILAR, J. J. Location of equine oviductal embryos on day 5 post ovulation and oviductal transport time of day 5 embryos autotransferred to the contralateral oviduct. **Theriogenology**, v. 46, n. 8, p. 1477-1483, 1996b.

WEBER, J. A.; WOODS, G. L.; FREEMAN, D. A.; VANDERWALL, D. K. Prostaglandin E2 secretion by day-6 to day-9 equine embryos. **Prostaglandins**, v. 43, n. 1, p. 55-59, 1992a.

WEBER, J. A.; WOODS, G. L.; FREEMAN, D. A.; VANDERWALL, D. K. Prostaglandin E2-specific binding to the equine oviduct. **Prostaglandins**, v. 43, n. 1, p. 61-65, 1992b.

WEBER, J. A.; WOODS, G. L.; LICHTENWALNER, A. B. Relaxatory effect of prostaglandin E₂ on circular smooth muscle isolated from the equine oviductal isthmus. **Biology of Reproduction Monograph**, n. 1, p. 125-130, 1995.

WEHBRINK, D.; HÄSSIG, M.; RITTER, N.; ZERBE, H.; BLEUL, U.; BOOS, A. Immunohistochemical demonstration of cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin receptors EP2 and FP expression in the bovine intercaruncular uterine wall around term. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 3-4, p. 241-254, 2008.

WING, D. A.; JONES, M. M.; RAHALL, A.; GOODWIN, T. M.; PAUL, R. H. A comparison of misoprostol and prostaglandin E2 gel for preinduction cervical ripening and labor induction. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, v. 172, n. 6, p. 1804-1810, 1995.

YAMAMOTO, Y.; OGURI, N.; TSUTSUMI, Y.; HACHINOHE, Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, p. 399-405, 1982. Supplementum 32.

YOUNG, C. A.; SQUIRES, E. L.; SEIDEL JUNIOR, G. E. Effects of three methods of cryopreservation on survival of large equine blastocysts. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 395, 1997. (abstract).

YOUNG, C. A.; SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E.; KATO, H.; MCCUE, P. M. Cryopreservation procedures for Day 7-8 equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, p. 98-102, 1997. Supplementum 25.

APÊNDICES

Apêndice A - Dados individuais sobre o tratamento superestimulatório com EPE (6mg, IM, 1x ao dia), resposta superovulatória e recuperação embrionária no 5º dia e 6-6,5º dia após a ovulação de éguas tratadas com PGE₂ administrada por método cirúrgico (C) ou não-cirúrgico (NC) - Pirassununga, 2006

Égua	Idade	Raça	EC*	Data 1º dia EPE†	Dia do ciclo	População folicular (mm) no início do tratamento					Dias de tratam.	Data hCG‡ + IA§	Nº ovulações	Data PGE ₂	Método	Data 1ª colheita	Resultado		
						<10	10-14,9	15-19,9	20-24,9	25-30							Colheita D5	Colheita D6-6,5	
1	6	¾ Bretão	4	01/03	D5	PF**	7	7	-	-	4	05/03	1 (OE)	11/03	NC	12/03	-	-	
2	6	½ QM	4	01/03	D5	4	4	1	-	-	6	07/03	2 (OD)	13/03	C	14/03	-	-	
3	7	½ anglo-árabe	4	01/03	D6	-	2	2	1	-	4	05/03	1 (OD)	14/03	C	15/03	-	1	
4	10	½ árabe	4	08/03	D5	1	4	-	-	-	7	15/03	1 (OD)	25/03	NC	26/03	-	1	
5	3	½ appaloosa	4	10/03	D6	-	2	-	4	-	5	15/03	2 (OD)	21/03	NC	22/03	-	-	
MÉDIA											5,2		1,4						

* Escore Corporal (1-5)

† Extrato de Pituitária Equina

‡ Gonadotrofina Coriônica Humana – 2500 UI, IV

§ Inseminação Artificial

** Poli-folicular

Apêndice B - Dados individuais sobre o tratamento superestimulatório com EPE (12,5 mg, IM, 2x ao dia), resposta superovulatória e recuperação embrionária no 5º dia e 6-6,5º dia após a ovulação de éguas tratadas com PGE₁ ou Misoprostol 1% - Pirassununga, 2007

Égua	Idade	Raça	EC*	Data 1º dia EPE†	Dia do ciclo	População folicular (mm) no D5					Dias de tratamento	Data hCG‡ +IA§	Nº ovulações	Data aplicação	PGE ₁ / Misoprostol	Data 1ª colheita	Resultado		
						<10	10-14,9	15-19,9	20-24,9	25-30							Colheita D5	Colheita D6-6,5	
1	10	½ QM	4-5	18/01	D5	-	-	2	1	-	5	23/01	2	29/01	PGE ₁	30/01	-	-	
2	3	½ appaloosa	5	17/02	D5	1	3	-	2	-	3	20/02	2	26/02	PGE ₁	27/02	-	2	
3	3	½ appaloosa	5	16/01	D5	PF**	-	-	-	-	7	23/01	2	29/01	Misoprostol	30/01	-	2	
4	7	¾ Bretão	6	18/01	D5	2	1	2	1	-	4	22/01	1	28/01	PGE ₁	29/01	-	-	
5	11	½ árabe	6	11/02	D5	2	5	-	-	-	7	18/02	2 (1ons††)	26/02	Misoprostol	27/02	1 (D7)	1	
6	8	½ anglo-árabe	6	15/01	D5	PF	-	1	-	-	5	20/01	3 (1ons)	28/01	Misoprostol	29/01	1 (?)	1	
7	17-18	cruzada	4-5	16/01	D5	PF	-	-	-	-	9,5	25/01	2 (1ons)	31/01	Misoprostol	01/02	-	2	
8	7	½ QM	5	09/01	D5	-	1	1	2	-	4	13/01	2	18/01	PGE ₁	19/01	-	-	
9	4	½ appaloosa	5	09/02	D5	PF	-	2	1	-	5	14/02	2 (1ons)	20/02	PGE ₁	21/02	-	-	
10	5	BH	4-5	14/02	D5	2	4	1	1	-	4	18/02	3 (1ons)	24/02	Misoprostol	25/02	1 (D7)	2	
MÉDIA											5,35		2,1						

* Escore Corporal

† Extrato de Pituitária Equina

‡ Gonadotrofina Coriônica Humana – 2500 UI, IV

§ Inseminação Artificial

** Poli-folicular

†† Ovulação não-sincrônica

ANEXOS**Anexo A – Tampão Citrato (pH = 6.0)**

Solução A (base)	Quantidade			
Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,294 g	0,588 g	1,470 g	2,940g
Água destilada	100 ml	200 ml	500 ml	1000 ml

Solução B (ácido)	Quantidade			
Ácido cítrico anidro ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	0,192 g	0,288 g	0,384 g	0,576
Água destilada	100 ml	150 ml	200 ml	300 ml

Fazer a solução A (base) e ir adicionando aos poucos a solução B (ácida) até obter o pH 6.0.

Armazenamento: Geladeira (2 – 8°C)

Anexo B - PBS-1: tampão fosfato salino (pH 7.4)

Componentes	quantidade			
	1 l.	2 l.	5 l.	10 x
Potássio fosfato monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,24 g	0,48 g	1,2 g	2,4 g
Fosfato de Sódio bibásico (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	1,44 g	2,88 g	7,2 g	14,4 g
Cloreto de potássio (KCl)	0,20 g	0,40 g	1,0 g	2,0 g
Cloreto de sódio (NaCl)	8,00 g	16,00 g	40,0 g	80,0 g
Água destilada	1 l. q.s.p.	2 l. q.s.p.	5 l. q.s.p.	1 l q.s.p.

Diluir os sais em água destilada e regular o pH.

Ajustes:

Solução ácida (pH menor): adicionar gotas de NaOH

Solução básica (pH maior): adicionar NaCl

Armazenamento: Geladeira (2 – 8°C)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)