



**EFEITO DO TRATAMENTO ANTI-
INFLAMATÓRIO NA HISTOLOGIA
ENDOMETRIAL, PRODUÇÃO DE
PROSTAGLANDINA E TAXA DE GESTAÇÃO
APÓS TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES E/OU
MANIPULAÇÃO CERVICAL EM ÉGUAS**

ÁLVARO MENDES DE RESENDE

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ÁLVARO MENDES DE RESENDE

**EFEITO DO TRATAMENTO ANTI-INFLAMATÓRIO NA
HISTOLOGIA ENDOMETRIAL, PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINA
E TAXA DE GESTAÇÃO APÓS TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES
E/OU MANIPULAÇÃO CERVICAL EM ÉGUAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, área de concentração em
produção animal para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Professor José Camisão de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Resende, Álvaro Mendes de.

Efeito do tratamento anti-inflamatório na histologia endometrial, produção de prostaglandina e taxa de gestação após transferência de embriões e/ou manipulação cervical em éguas / Álvaro Mendes de Resende. – Lavras : UFLA, 2009.

95 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: José Camisão de Souza.

Bibliografia.

1. Fertilidade. 2. Flunixin meglumine. 3. Prostaglandina F2 α . 4. Égua. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.1

636.10898178

ÁLVARO MENDES DE RESENDE

**EFEITO DO TRATAMENTO ANTI-INFLAMATÓRIO NA
HISTOLOGIA ENDOMETRIAL, PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINA
E TAXA DE GESTAÇÃO APÓS TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES
E/OU MANIPULAÇÃO CERVICAL EM ÉGUAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, área de concentração em
produção animal para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 31 de julho de 2009

| | |
|---|-------|
| Professor Henrique Ribeiro Alves de Resende | UFLA |
| Professora Ana Tereza Mendonça Viveiro | UFLA |
| Professor Márcio Teoro do Carmo | UNESP |
| Professor Juan Ramon Olalquiaga Pérez | UFLA |

Professor José Camisão de Souza
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

DEDICATÓRIA

A Luciana, Gabriel, Pedro, Noir, Brucutu e Boy pelo amor, estímulo, apoio,
amizade e compreensão nos muitos momentos de ausência.

Aos cavalos pela colaboração e nobre resignação.

“O homem é sua própria estrela, e a alma que pode fazer um homem honesto e perfeito, comanda toda luz, toda influência, todo destino; nada lhe advém cedo ou tarde demais; nossos atos são nossos anjos, bons ou maus, nossas sombras fatais que andam ao nosso lado, silentes.”

(Ralph Emerson)

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos aos colegas veterinários, Raquel Chaves Barbosa, Adélcio Barbosa Júnior, Anselmo Foglia, Rafaela Tito Simões, Juliano Bastos, Fernanda Feres Sallun, Lilian Mara Kirsch, Tiago Amaral do Nascimento, pelo apoio participação e colaboração nos procedimentos de campo.

Ao Professor Edson Antunes da Unicamp, Professor Flademir Wounters da UFLA, Dr. Carlos Antonio Cardoso do Laboratório Scanlab e Leandra Leal Costa pelo indispensável auxílio nas análises.

A Professora Mayra Alves Stradioto e Professor José Camisão de Souza pelas orientações e sugestões nas análises estatísticas.

A Indústria Farmacêutica Veterinária Jofadel na pessoa do Sr. Gilberto Antonio Elizei, pelo incentivo, generosidade profissionalismo e interesse em nosso estudo.

Ao Sr. Daniel e todo o pessoal do Frigorífico Belo Vale em Campo Belo pela disposição e paciência em nossos trabalhos de coleta de material.

Ao nosso orientador Professor Dr. José Camisão de Souza pelo auxílio, parceria, coleguismo, ensinamentos, incentivos e colaboração incondicional para o término de nosso estudo.

Aos colaboradores, Reginaldo Bernardo Lima, Vilmar de Azevedo e Lanner Afonso Silva pelo auxílio nos procedimentos de campo, digitação e assessoria na área de informática.

Aos componentes da banca examinadora Professor Henrique Ribeiro Alves de Resende, Professor Juan Ramón Olalquiaga Pérez, Professor Márcio Teoro do Carmo, Professora Ana Tereza de Mendonça Viveiros, pelo interesse, participação e indispensáveis sugestões nas correções deste trabalho.

Sem a participação e ajuda de todos vocês não seria possível realizar este experimento.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| ANEXO | i |
| LISTA DE TABELAS | ii |
| LISTA DE FIGURAS | v |
| RELAÇÃO DE SIGLAS UTILIZADAS | vii |
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | x |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 OBJETIVOS | 4 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 5 |
| 3.1 Prostaglandinas | 5 |
| 3.2 Antiinflamatórios não esteroidais e Flunixin meglumine | 8 |
| 3.3 Ciclo Estral na Égua | 13 |
| 3.4 Início da gestação nas éguas | 16 |
| 3.5 Reconhecimento Materno de Gestação | 17 |
| 3.6 Morte embrionária em éguas | 19 |
| 3.7 Causas infecciosas e inflamatórias de Infertilidade | 23 |
| 3.8 Biópsia Endometrial | 25 |
| 3.9 Transferência de Embrião em éguas | 29 |
| 4 HIPÓTESES | 32 |
| 5 MATERIAL E MÉTODO | 33 |
| 6 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 40 |
| 7 RESULTADOS | 42 |
| 7.1 Resultados Experimento 1 | 42 |
| 7.2 Resultados Experimento 2 | 45 |
| 7.3 Resultados Experimento 3 | 56 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 8 DISCUSSÃO | 68 |
| 9 CONCLUSÃO | 78 |
| 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 79 |
| ANEXOS | 94 |

ANEXOS

| | | |
|---------|---|----|
| ANEXO 1 | Modelo de ficha para controle individual das receptoras no experimento 3 | 94 |
| ANEXO 2 | Principais alterações endometriais das éguas do experimento 2 submetidas à histologia de fragmento do corno uterino direito | 95 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 01 | Influência do momento de aplicação do flunixin meglumine sobre as concentrações médias de 13,14-dihidro-15-cetoprostaglandina F2 α em éguas | 42 |
| Tabela 02 | Concentrações médias de 13,14-dihidro-15-cetoprostaglandina F2 α nos diferentes momentos de aplicação..... | 44 |
| Tabela 03 | Efeito da manipulação cervical sobre a proporção de éguas com inflamação uterina do endométrio | 46 |
| Tabela 04 | Efeito da manipulação sobre a proporção de éguas com dilatação glandular do endométrio | 47 |
| Tabela 05 | Efeito da manipulação sobre a proporção de éguas com ninho glandular do endométrio | 47 |
| Tabela 06 | Efeito da manipulação sobre a proporção de éguas com dilatação linfática do endométrio | 47 |
| Tabela 07 | Efeito da manipulação sobre a proporção de éguas com atrofia do endométrio | 48 |
| Tabela 08 | Efeito da manipulação sobre a proporção de éguas com fibrose do endométrio | 48 |
| Tabela 09 | Efeito do uso do flunixin meglumine sobre a proporção de éguas com inflamação do endométrio | 49 |
| Tabela 10 | Efeito do uso do flunixin meglumine sobre a proporção de éguas com dilatação glandular do endométrio | 50 |
| Tabela 11 | Efeito do uso do flunixin meglumine sobre a proporção de éguas com ninho glandular do endométrio | 50 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 12 | Efeito do uso do flunixin meglumine sobre a proporção de éguas com dilatação linfática do endométrio | 50 |
| Tabela 13 | Efeito do uso do flunixin meglumine sobre a proporção de éguas com atrofia do endométrio | 51 |
| Tabela 14 | Efeito do uso do flunixin meglumine sobre a proporção de éguas com fibrose do endométrio | 51 |
| Tabela 15 | Efeito do uso do flunixin meglumine sobre a proporção de éguas gestantes nos 4 haras | 57 |
| Tabela 16 | Efeito do uso do flunixin meglumine sobre a proporção de éguas gestantes no Haras A | 58 |
| Tabela 17 | Efeito do uso do flunixin meglumine sobre a proporção de éguas gestantes no Haras B | 58 |
| Tabela 18 | Efeito do uso do flunixin meglumine sobre a proporção de éguas gestantes no Haras C | 58 |
| Tabela 19 | Efeito do uso do flunixin meglumine sobre a proporção de éguas gestantes no Haras D | 59 |
| Tabela 20 | Efeito da classe de diâmetro de folículo pré-ovulatório sobre a proporção de éguas gestantes | 59 |
| Tabela 21 | Efeito de haras sobre a proporção de éguas gestantes | 60 |
| Tabela 22 | Efeito da presença do potro ao pé sobre a proporção de éguas gestantes | 60 |
| Tabela 23 | Efeito do uso da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) sobre a proporção de éguas gestantes | 61 |
| Tabela 24 | Efeito da classificação do status do trato genital da égua receptora sobre a proporção de éguas gestantes | 62 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 25 | Efeito do uso da progesterona sobre a proporção de éguas gestantes | 62 |
| Tabela 26 | Efeito da duração do estro (em dias) sobre a proporção de éguas gestantes (regressão logística) | 63 |
| Tabela 27 | Efeito da duração do estro (em dias) sobre a proporção de éguas gestantes no Haras A (regressão logística) | 64 |
| Tabela 28 | Efeito da duração do estro (em dias) sobre a proporção de éguas gestantes no Haras B (regressão logística) | 65 |
| Tabela 29 | Efeito da duração do estro (em dias) sobre a proporção de éguas gestantes no Haras C (regressão logística) | 66 |
| Tabela 30 | Efeito da duração do estro (em dias) sobre a proporção de éguas gestantes no Haras D (regressão logística) | 67 |

LISTA DE FIGURAS

Figuras

- Figura 01 Protocolo de sincronização de éguas 34
- Figura 02 Protocolo de injeções de flunixin meglumine e da coleta de sangue de éguas..... 35
- Figura 03 Concentrações de 13, 14-dihidro-15 ceto-prostaglandina F2 α dos de amostragem relativos a manipulação cervical em éguas43
- Figura 04 Valores médios das concentrações de 13, 14-dihidro-15ceto prostaglandina F2 α para os diferentes momentos de aplicação de flunixin meglumine (FM), na réplica 2 45
- Figura 05 Efeito da manipulação sobre a proporção de éguas com inflamação, dilatação glandular, ninho glandular, dilatação linfática, atrofia e fibrose 46
- Figura 06 Efeito do uso do flunixin meglumine(FM) sobre a proporção de éguas com inflamação, dilatação glandular, ninho glandular, dilatação linfática e fibrose 49
- Figura 07 Imagem histológica do endométrio da égua 33 no experimento 2, corada pela hematoxilina e eosina, demonstrando endométrio normal 52
- Figura 08 Imagem histológica do endométrio da égua 32 no experimento 2, corada pela hematoxilina e eosina demonstrando infiltrado inflamatório..... 53
- Figura 09 Imagem histológica do endométrio da égua 11 no experimento 2, corada pela hematoxilina e eosina demonstrando atrofia endometrial 54

| | |
|--|----|
| Figura 10 Imagem histológica do endométrio da égua 19 no experimento 2, corada pela hematoxilina e eosina, demonstrando ninhos glandulares, fibrose periglandular e infiltrado | 55 |
| Figura 11 Imagem histológica do endométrio da égua 29 no experimento 2, corada pela hematoxilina e eosina, demonstrando ninhos glandulares e fibrose periglandular..... | 56 |
| Figura 12 Efeito do uso do flunixin meglumine sobre a proporção de éguas gestante..... | 57 |

RELAÇÃO DE SIGLAS UTILIZADAS

| | |
|-------------------------|---|
| AINES | Anti-inflamatórios não esteróides |
| CL | Corpo lúteo |
| COX | Ciclooxigenase |
| eCG | Gonadotrofina coriônica equino |
| FM | Flunixin meglumine |
| FSH | Hormônio folículo estimulante |
| GnRH | Hormônio liberador de gonadotrofinas |
| hCG | Gonadotrofina crônica humana |
| LH | Hormônio Luteinizante |
| LT | Leucotrienos |
| P4 ® | Progesterona ação prolongada |
| PGE² | Prostaglandina E ² |
| PGF₂α | Prostaglandina F ₂ α |
| PGFM | 13, 14 - dihydro - 15 – keto-PGF ₂ α |
| PGHs | Prostaglandina sintetase |
| PGs | Prostaglandinas |
| PMNS | Polimorfonucleados |
| TE | Transferência embrião |
| TEE | Transferência embrião em eqüinos |
| TxB² | Tromboxano 2 |

RESUMO

RESENDE, Álvaro Mendes de. **Efeito do tratamento anti-inflamatório na histologia endometrial, produção de prostaglandina e taxa de gestação após transferência de embriões e/ou manipulação cervical em éguas.** 2009. 95 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

A técnica de transferência de embriões (T.E.) é atualmente a principal ferramenta no melhoramento genético do rebanho equino. Mas é necessário melhorar as taxas de prenhez para reduzir os custos, ainda elevados. Entre os diversos fatores que influenciam os resultados desta técnica, destaca-se o manejo de receptoras. Atualmente o método utilizado é a transferência não cirúrgica transcervical. Profissionais que praticam a T.E. em eqüinos observam que quanto menor a manipulação cervical das receptoras durante a transferência maiores são as taxas de prenhez. Estes resultados provavelmente estão relacionados ao estímulo de produção de prostaglandinas ou endometrite após manipulação do trato genital. O principal objetivo deste estudo é avaliar a associação entre liberação de prostaglandina F2 α (PGF2 α) e endometrite com manipulação cervical e implantação de embrião com passagem transcervical de pipeta. Foi também investigado se a droga anti-inflamatória, flunixin meglumine (FM), é eficiente em inibir a produção de PGF2 α e endometrite, sendo assim, associada a melhores taxas de gestação. Neste estudo 209 éguas foram utilizadas em 3 experimentos. No experimento 1 as éguas controle apresentaram altas concentrações de 13,14-dihidro-15-ceto-PGF2 α (PGFM) após manipulação cervical e passagem de pipeta comparadas com as éguas que receberam injeção de FM as 6, 3 e 0 horas do estímulo cervical. No segundo experimento 42 éguas de abatedouro foram agrupadas aleatoriamente para 1 de 4 tratamentos antes do abate: G1 – sem manipulação cervical e sem injeção de FM, G2 - com manipulação e sem FM, G3 – com manipulação e com FM (1,1 mg/kg P.V.) e G4 – sem manipulação e com FM. Os grupos G2 e G3 apresentaram maior ocorrência de endometrite. Entretanto nove éguas do G3 (81,8%) apresentaram infiltrado inflamatório do endométrio, apesar do tratamento com FM. Não foi possível estabelecer se a endometrite foi produzida pela manipulação cervical. As alterações morfológicas mais frequentes foram inflamação (57,57%), atrofia (37,37%) e fibrose endometrial (27,57%). No experimento 3 o uso de FM mostrou associação com menores taxas de prenhez das receptoras. As taxas de gestação das éguas não tratadas foram mais elevadas (72,15%), quando comparadas com as taxas de gestação das éguas que receberam FM (58,13%).

¹ Orientador: Professor José Camisão de Souza.

Nosso experimento demonstrou uma associação entre manipulação cervical e produção de PGFM. As variações de concentração de PGFM associadas a passagem transcervical de pipeta foram mais discretas. A associação do uso de Flunixin meglumine com produção de PGFM não acompanhou um padrão, assim como, não foi evidenciado um efeito deste medicamento na inibição de endometrite. Nas condições que foi realizado este estudo, a utilização de FM foi deletéria para a reprodução e seu uso com o objetivo de melhorar as taxas de prenhez deve ser desaconselhado.

ABSTRACT

RESENDE, Álvaro Mendes de. **Effect of anti inflammatory treatment in endometrial histology, prostaglandin production and pregnancy rates after embryo transfer and/or cervical manipulation in mares.** 2009. 95 p. Thesis (Doctor in Animal Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.²

Embryo transfer is currently the main breeding tool in equine reproduction. However it is still necessary to improve pregnancy to lower its costs. Among many factors that influence ET results, recipient mare management should be underlined. Currently the method utilized is non surgical transcervical transfer. Equine ET professionals observed that the less cervical manipulation in recipients during transfer the higher the pregnancy rates. These results are probably related to prostaglandin production stimulus or endometritis post genital tract manipulation. The main objective of this study is to evaluate the association between prostaglandin F2 α (PF2 α) release and endometritis with cervix manipulation and the embryo implanting rod passage through the cervix. It was also investigated whether the anti inflammatory drug, Flunixin Meglumine is efficient in the inhibiting of PGFM production and endometritis, thus, associated with better recipient pregnancy rates. In this study, 209 mares were used. In experiment control mares had higher PGFM concentrations after cervix manipulation and rod passage compared to FM injected mares which received injections at 6, 3 and zero hours in relation to the cervix stimulus. In the second experiment, 42 mares were allocated randomly to one of four treatments before slaughter: G1 – no manipulation and no FM injection; G2 – cervix manipulation and no FM; G3 – cervix manipulation and FM injection (1.1 mg/kg of body weight) and G4 – no manipulation and FM injection. More G2 and G3 mares had endometritis. However, nine G3 mares (81.8%) had inflammatory infiltration in the endometrium, despite having received FM. It was not possible to establish if the endometritis were caused by cervix manipulation. The majority of alterations were inflammation (57.57%), atrophy (37.37%) and endometrial fibrosis (27.57%). In the third trial FM lowered recipient pregnancy rates. An association between cervix manipulation and PGFM production was found. Variations on PGFM concentrations associated to the passing of an embryo implantation rod were discrete. There was no apparent

²Advisor: Professor José Camisão de Souza

pattern in the association between FM injection and PGFM production, as no effect of FM on the inhibition of endometritis was observed. Under the conditions of this study the utilization of FM was deleterious to reproduction and its use with the objective of improving pregnancy rates in mares should be discouraged.

1 INTRODUÇÃO

A indústria eqüina tem passado por diversas modificações no que diz respeito às técnicas reprodutivas. Isto tem contribuído para melhorar o padrão genético dos animais, com maior eficiência reprodutiva, promovendo maior incentivo aos criadores.

Atualmente a técnica de reprodução assistida empregada rotineiramente é a transferência de embriões. Na espécie eqüina, a transferência de embriões é a solução mais utilizada para aumento do número de descendentes/ano/matriz.

No cenário mundial, o Brasil ocupa posição de destaque (3^o lugar), acompanhando os dois principais países (Estados Unidos e Argentina) na utilização desta técnica (Squires et al., 2003).

A primeira transferência de embriões eqüinos (TEE) que logrou sucesso foi realizada no Japão por Oguri & Tsutsumi (1972). No Brasil, os trabalhos foram iniciados em 1986, no Estado de São Paulo, e foram realizados com sucesso na raça Mangalarga (Fleury et al., 1989). Na raça Mangalarga Marchador, a técnica foi reconhecida e aceita pelo seu conselho deliberativo técnico em 1995 e, desde então, tem sido muito utilizada (Caiado et al., 2005). Apesar desta técnica ser bastante utilizada, ainda precisa ser aprimorada para melhorar sua eficiência e garantir melhores taxas de prenhez. Fatores que demonstram afetar a taxa de prenhez após TEE incluem: método de transferência, sincronismo entre doadora e receptora, qualidade do embrião, manejo da receptora, e habilidade do técnico. (Squires et al., 1999; Carnevale et al., 2000).

A técnica empregada atualmente é não cirúrgica através da introdução transcervical do embrião no útero da receptora. Técnicos que praticam a TEE observam que quanto menor a manipulação cervical durante o procedimento,

maiores são as taxas de prenhez, possivelmente pela menor contaminação, menor inflamação do endométrio e/ou menor estímulo de produção de PGF2 α endometrial; mas estas hipóteses não estão comprovadas cientificamente.

As taxas de prenhez variam bastante após a transferência cirúrgica ou transcervical (Squires et al., 1999; Carnevale et al., 2000; Fleury et al., 2007). Duas possíveis causas de menor eficiência no método transcervical são: contaminação bacteriana com subsequente endometrite, e mudanças hormonais, estimuladas pela manipulação cervical, que, interferem com mecanismos regulatórios da função luteotrófica (Higgins & Lees, 1984; Handler et al., 2003).

Apesar de a resposta inflamatória permanecer sub-clínica, ela pode ser ocasionada pela liberação de prostaglandina F2 α (PGF2 α) como parte de um processo inflamatório já sugerido em técnicas reprodutivas humanas (Egbase et al., 1996).

Adicionalmente a PGF2 α pode ocasionar luteólise e indiretamente provocar a morte embrionária e absorção fetal antes do reconhecimento materno. A reação inflamatória depois da transferência do embrião pode ser induzida pelo próprio embrião, pelo meio de transferência agindo como material estranho ou por bactérias introduzidas no útero durante a técnica de transferência, como já foi evidenciado em bovinos (Brand et al., 1976) e humanos (Franchin et al., 1998). Também existe a hipótese que o estímulo mecânico da cérvix induz liberação de PGF2 α suficiente para inibir a função corpo lúteo (Higgins & Lees, 1984). Foi demonstrado que a transferência de embrião transcervical e dilatação cervical não foram associadas com o aumento direto da liberação de PGF2 α , mas depois da dilatação cervical, o tempo de permanência do corpo lúteo foi menor (Sirois et al., 1987; Handler et al., 2003). Em outro estudo, altas concentrações de PGFM foram encontradas em seis de nove éguas receptoras, mas não suficiente para a indução da luteólise (Kask et al., 1997). Em bovinos, a transferência transcervical foi seguida por liberação de PGF2 α e o tratamento

com um anti-inflamatório não esteroidal, flunixin meglumine (FM), no momento da transferência aumentou as taxas de prenhez (Scenna et al., 2005).

Drogas antiinflamatórias não esteroidais inibem a luteólise em diferentes espécies de ruminantes (Cooke et al., 1983; Skidmore et al., 1998).

Em éguas, tratamento com o antiinflamatório não esteroidal fenilbutazona atrasou a luteólise associada com coleta de fragmento do endométrio para biópsia. Os autores sugerem que a fenilbutazona acumulada no endométrio irritado agiu diretamente no processo inflamatório (Ellysworth-Swihart et al., 1985). Em outro estudo concluiu-se que tratamento com ácido meclofenâmico melhorou as taxas de prenhez em éguas receptoras (Wilsher, 2006) e fêmeas de camelos (Skidmore et al., 2002; Skidmore et al., 2005).

Entretanto, existe uma contradição entre os pesquisadores a respeito da liberação ou não de $PGF2\alpha$ após a manipulação cervical.

2 OBJETIVOS

Neste estudo os objetivos principais são avaliar a ocorrência de endometrite, produção de PGFM (principal metabólito da $\text{PGF2}\alpha$), e fertilidade após a manipulação cervical utilizada no procedimento de transferência de embrião eqüino (TEE) e se o anti-inflamatório, flunixin meglumine, é eficiente em inibir a inflamação do endométrio e/ou produção de PGFM, estando associado às taxas de prenhez em programas de TEE.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Prostaglandinas

As prostaglandinas são ácidos graxos hidroxilados insaturados com vinte átomos de carbono e um anel ciclopentano. O ácido araquidônico, um ácido graxo essencial, é o precursor da maioria das prostaglandinas intimamente associadas com os aspectos reprodutivos, principalmente a $\text{PGF2}\alpha$ e a prostaglandina E2 (PGE2). As prostaglandinas são produzidas, em vários tecidos e no útero, sendo responsáveis pela luteólise (Hafez, 1996).

A primeira indicação que $\text{PGF2}\alpha$ poderia ser a substância luteolítica que controla a integridade do corpo lúteo (CL), e a duração do ciclo estral, dos animais domésticos é atribuída a Pharris & Wyngarden (1969). Eles relataram que o tamanho do corpo lúteo e concentração de progesterona em ratas pseudo-gestantes diminuíram bastante após uma única injeção intramuscular de $\text{PGF2}\alpha$.

O ácido araquidônico é liberado na forma livre, como resultado da hidrólise de fosfolípidios de membrana pela enzima fosfolipase A, sendo assim convertido para prostaglandinas ou compostos relacionados pelas vias da ciclo-oxigenase usando uma enzima microsomal conhecida coletivamente como prostaglandina sintetase (Samuelsson, 1981).

Prostaglandina $\text{F2}\alpha$ e Prostaglandina E2 são as duas prostaglandinas mais intimamente associadas com reprodução em mamíferos e, ambas, podem ser liberadas por diversos tipos de células dentro do trato reprodutivo em resposta a vários estímulos endócrinos, neurais e físicos (Daels et al., 1987).

Prostaglandinas endógenas são metabolizadas rapidamente pelo organismo no local de produção e também nos pulmões, fígado, e rins (Samuelsson, 1970). Na égua, $\text{PGF2}\alpha$ é metabolizado primeiro para 15 – ceto – $\text{PGF2}\alpha$, então para 13, 14 – dihidro – 15 – ceto – $\text{PGF2}\alpha$, e finalmente para um

grupo de 11 – ceto + tetranor – PGF compostos (Kindahl et al., 1976). Embora o metabólito 13, 14 – dihydro – 15 – ceto - PGF 2α (PGFM) tenha uma meia vida biológica de apenas 5 minutos na circulação periférica, ele é consideravelmente mais estável em plasma ou soro quando separado das células vermelhas do sangue. Por esta razão, tem sido aceito que a medida das concentrações de PGFM no soro ou plasma oferece uma correlação direta com as concentrações de PGF 2α liberadas pelos tecidos (Haluska et al, 1988).

Embora exista pouco conhecimento do real papel da PGE 2 na reprodução equina, existem sólidas evidências de que a PGF 2α é o hormônio uterino luteolítico que controla a duração do ciclo estral em éguas não gestantes seguindo as demonstrações originais da potente propriedade luteolítica da PGF 2α e seus análogos sintéticos, produzidos em 1972 pela ICI Pharmaceuticals Division (Douglas & Ginther, 1972; Allen & Rowson, 1973). Douglas & Ginther (1976) foram os primeiros a demonstrar o aumento na liberação uterina de PGF 2α endógena na égua associada com luteólise durante o ciclo estral.

PGF 2α é liberada pelo endométrio em ondas pulsáteis de curta duração. No ciclo estral típico das éguas estas liberações ocorrem próximas ao 14^o até o 17^o dia após a ovulação e o primeiro pulso ocorre, geralmente, 3 a 4 horas antes do primeiro declínio de progesterona plasmática (Allen et al., 1974). A liberação de PGF 2α continua por mais 24 – 48 horas após completar a luteólise (Neely et al., 1979).

Diferente de outras espécies a égua não possui anastomose entre a veia uterina e artéria ovariana, que permite a perfusão em contracorrente de PGF 2α na artéria ovariana. Assim, a PGF 2α endometrial liberada, somente atinge o ovário passando através do sistema cardiovascular, estando sujeita ao metabolismo nos pulmões e outros órgãos (Samuelsson, 1970). Isto talvez justifique a grande sensibilidade das éguas ao uso de pequenas doses de PGF 2α exógena ou seus análogos através do efeito luteolítico (Allen & Cooper, 1975).

Entre os trabalhos estudados há contradições quanto à liberação ou não de prostaglandina após a manipulação cervical, infusão ou lavado uterino.

Berglund et al. (1982) avaliaram o efeito da técnica de coleta de embriões na concentração de PGF2 α na cavidade uterina de éguas pôneis. Em seus resultados observaram maior concentração de PGF2 α quando o útero foi lavado pelo método transcervical do que após a histerectomia. A concentração de PGF2 α foi significativamente maior em éguas não gestantes. Concluíram que a manipulação cervical aumenta a concentração de PGF2 α .

Já Wilde et al. (1989) realizaram estudo para avaliar o efeito da dilatação cervical na concentração plasmática do metabólito de PGF2 α (PGFM). Não houve diferença significativa nos padrões de PGFM entre os grupos e os pesquisadores concluíram que não há liberação de PGF2 α em resposta a dilatação cervical no diestro.

Kask et al. (1997) investigaram se houve a liberação de PGF2 α após o procedimento de TE não cirúrgico em éguas, mas em seus resultados obtiveram 3 padrões distintos de liberação de PGF2 α e a concentração ou declínio de progesterona não foram correspondentes a estes padrões de PGF2 α . Os autores concluíram que deve haver variação individual muito grande e deve-se aumentar o número de animais para tornar o experimento mais confiável.

Sharp et al. (1997) investigaram em 18 éguas pôneis o efeito da biópsia endometrial transcervical nas concentrações plasmáticas de ocitocina e PGFM. Eles concluíram que a liberação de PGF2 α foi induzida por ocitocina e foi mediada por receptoras de ocitocina. Inibição da liberação de PGF2 α induzida por prenhez não foi associada com a supressão da liberação de ocitocina ou densidade de receptores de ocitocina. Eles sugeriram que um fator derivado do embrião é provavelmente responsável pela inibição da liberação e/ou síntese de PGF2 α e interrupção da interação ocitocina – PGF2 α na gestação precoce em éguas.

Nikolakopoulos et al. (2000) pesquisaram a liberação de ocitocina e prostaglandina F2 α no momento da rufiação, monta natural e manipulação manual do trato genital. Eles concluíram que manipulação de clitóris, vagina e cérvix causaram aumento significativo de ocitocina em todas as éguas e a infusão intra-uterina de 500 mL de salina fosfatada tamponada (PBS) causou aumento em 3 de 5 éguas. Entretanto, somente uma égua teve aumento significativo de PGFM após manipulação cervical e apenas uma respondeu com aumento de PGFM depois da infusão uterina com PBS. Eles concluíram que procedimentos como manipulação ou infusão frequentemente ocasionam aumento nas concentrações de ocitocina, mas raramente determinam aumento de PGFM.

Mais recentemente Koblischke et al. (2008) testaram a hipótese que endometrite subclínica ocorre depois da transferência de embrião (ET). As éguas receptoras foram tratadas com ácido meclofenâmico (AM) ou FM (F) depois de TE ou foram deixadas sem tratamento. Os pesquisadores concluíram que o tratamento de éguas receptoras de embrião com drogas antiinflamatórias não esteróides inibe a resposta inflamatória do endométrio depois da transferência do embrião (TE). Eles também sugeriram que o AM poderia ser mais apropriado quando comparado ao FM, devido à diferente influência na síntese de prostaglandinas que não resultaria em inibição da mobilidade embrionária necessária ao processo de reconhecimento materno.

3.2 Anti-inflamatórios não esteroidais e flunixin meglumine

Anti-inflamatórios não esteroidais, (AINES) por definição, inibem com intensidade diferente, as enzimas da via ciclooxigenase (COX). Isto impede o metabolismo de ácido araquidônico para o endoperóxido PGG2 (Ziel & Krupp, 1975).

Atualmente duas isoformas das enzimas COX, conhecidas como COX1 e COX2 são conhecidas (Vane & Botting, 1995). A enzima COX-1 é produzida constitutivamente em muitos tecidos e tem sido proposto que esta isoforma é responsável pela produção de prostaglandinas (PGs) nas funções de homeostase, de plaquetas, mucosa gastrointestinal, rins e outras funções essenciais ao organismo (Mitchell et al., 1993).

A produção de COX-2, entretanto, pode ser induzida em muitas células, incluindo aquelas primariamente associadas com o processo inflamatório. A maior parte dos efeitos indesejáveis do uso de AINES se deve a inibição de COX-1. Com o objetivo de diminuir estes efeitos adversos associados com a terapia por AINES, novos compostos com inibição seletiva de COX-2 têm sido desenvolvidos (Insel, 1996). Embora numerosos produtos seletivos para COX-2 estejam disponíveis para uso humano, poucos destes compostos têm sido estudados nas espécies animais. Aparentemente a seletividade é espécie dependente. Sendo assim, um medicamento seletivo para uma espécie pode não ser seletivo para outra. O carprofeno, por exemplo, é um inibidor seletivo para COX-2 em cães, mas esta seletividade não foi confirmada para outras espécies, como o cavalo (Ricketts et al., 1998). Existem evidências que a maior parte dos AINES não afeta o metabolismo do ácido araquidônico pela via da lipooxigenase, o que permite a produção de leucotrienos (LT). Estes apresentam, de maneira similar as prostaglandinas, um importante efeito inflamatório. LTB4 é um potente agente quimiotático para leucócitos (Owens et al., 1996).

Existem evidências que alguns AINES, como ácido meclofenâmico e cetoprofeno têm algum efeito inibitório em lipooxigenase (Stadler et al., 1994).

O FM, derivado do ácido nicotínico, é um potente analgésico e antiinflamatório usado regularmente para controlar dor abdominal em cavalos. Adicionalmente, tem sido mostrado em diversos modelos experimentais um

efeito antiendotoxêmico do FM com a utilização de doses inferiores aquelas utilizadas nos processos inflamatórios (Jackman et al., 1994).

Em cavalos, a farmacocinética de FM está bem definida. Quando utilizado na dose recomendada de 1,1 mg/kg possui uma meia vida plasmática curta de aproximadamente 1,5 a 3 horas, mas persiste no sítio inflamatório por até 16 horas (Soma et al., 1988).

A farmacodinâmica de FM em cavalos demonstra que ele é um eficiente antiinflamatório não esteroideal quando usado nas doses recomendadas. Em um modelo inflamatório, o FM inibiu produção de TXB2 e PGE2 no soro por mais que 24 horas e 30 horas respectivamente (Londoni & Lees, 1995). O efeito máximo de FM foi obtido com 1mg/kg. Doses mais altas não aumentam a eficiência, mas prolongam a duração do efeito de 16 horas com 1 mg/kg para até 24 horas com 2 mg/kg (Toutain et al., 1994).

Coakley et al., (1999) investigaram a farmacocinética de FM em jumentos, muares e cavalos. Os pesquisadores concluíram que existem diferenças significativas quanto à disposição sorológica de FM em jumentos quando comparadas aos muares e cavalos. Consequentemente as doses destes antiinflamatórios rotineiramente utilizados em jumentos podem ser inapropriadas.

Semrad et al. (1985) compararam a farmacocinética de FM com diferentes dosagens em cavalos saudáveis. Depois da administração intravenosa de FM nas doses de 1,1 mg/kg, 0,25 mg/kg e 0,1 mg/kg, supressão significativa de tromboxanos no soro persistiu por 12, 4 e 3 horas respectivamente. Repetidas administrações de FM na dose de 0,25 mg/kg a cada 8 horas manteve significativa supressão de tromboxano durante todo o tratamento. Depois da interrupção do tratamento os valores sorológicos de tromboxano excederam os valores basais pré-tratamento. Entre os grupos não ocorreram diferenças significativas nos valores de 6 – keto prostaglandina F1 α .

Os benefícios dos antiinflamatórios não esteroidais na eficiência reprodutiva têm sido investigados e o FM tem sido ostensivamente utilizado por profissionais de campo, no momento da transferência do embrião, com o propósito de melhorar as taxas de prenhez em receptoras que sofrem exagerada manipulação cervical e provavelmente produzem mais $PGF2\alpha$ endometrial.

Berglund et al. (1982) também avaliaram a eficiência do FM. Éguas não gestantes tratadas com FM tiveram a mesma concentração de PGFM de éguas prenhes. Concluíram que a manipulação cervical aumenta a concentração de PGFM e o FM foi capaz de inibir este aumento.

Além da concentração de PGFM, Wilde et al. (1989), também avaliaram a eficiência do FM em inibir a produção de PGF. Um dos grupos recebeu 500 mg de FM 30 minutos antes da manipulação cervical. Observaram que a concentração plasmática média de PGFM foi menor na estimulação cervical acrescida de FM do que a estimulação cervical e o controle. Concluíram que a administração de FM deprimiu as concentrações plasmáticas de PGFM, provavelmente devido à inibição da rota metabólica da ciclooxigenase.

Daels et al. (1991a) avaliaram os efeitos do FM na secreção de PGF induzida pela endotoxina da *Salmonella typhimurium* durante início da gestação em éguas. A concentração de progesterona não foi alterada e a síntese de $PGF2\alpha$ foi inibida por várias horas naquelas éguas que receberam o FM 10 minutos antes da endotoxina. Os achados destes pesquisadores sugerem que o efeito inibitório do FM é rápido, pois a concentração de $PGF2\alpha$ diminuiu a um limite de detecção dentro de 30 minutos após a administração intravenosa deste medicamento.

Giri et al. (1991) estudaram a função dos ecosanóides no aborto e na sua prevenção através do tratamento com FM em vacas durante o primeiro trimestre de gestação. Nenhuma vaca tratada com FM abortou após a infusão de *Escherichia coli*. Segundo os autores deste experimento, embora o FM tenha

falhado em impedir os aumentos das concentrações de cortisol e ácido láctico plasmáticos induzidos pela endotoxina, ele efetivamente preveniu a queda das concentrações de progesterona e o aumento de $\text{PGF2}\alpha$, TxB2 e $6\text{-ceto-PGF2}\alpha$. Eles concluíram que o uso de FM demonstra ser uma terapia promissora na prevenção do aborto bovino resultante de infecção bacteriana endotoxêmica no início da gestação.

Daels et al. (1995) avaliaram a secreção endógena de $\text{PGF2}\alpha$ durante a indução de aborto com cloprostenol em éguas e analisaram a eficácia do FM em impedir a liberação de $\text{PGF2}\alpha$ e conseqüentemente o aborto. Neste experimento, o FM não alterou a síntese de $\text{PGF2}\alpha$ e, portanto os autores sugeriram que o FM é ineficiente para modular a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ uterina após indução com cloprostenol.

Aba et al. (2000) realizaram um estudo para avaliar a habilidade do FM em inibir a luteólise em lhamas não-gestantes. A dose utilizada (2,2 mg/kg) provou ser efetiva na depressão da síntese de $\text{PGF2}\alpha$. Este efeito foi claramente percebido nos dois primeiros dias de tratamento, não sendo, no entanto suficiente para inibir a luteólise.

Purcell et al. (2005) conduziram um experimento para testar o efeito do FM e inserção de progesterona intravaginal (CIDR; PFIZER INC., New York, NY, USA), administrados no momento da transferência do embrião, nas taxas de prenhez e ressincronização do estro em bovinos de corte. Eles concluíram que receptoras tratadas com FM, no momento da transferência de embrião, melhoraram suas taxas de prenhez, mas este resultado foi influenciado pelo local do experimento. As receptoras que receberam o implante intravaginal de progesterona tiveram melhor re-sincronização do estro sem redução de sua fertilidade.

3.3 Ciclo estral na égua

A égua é um animal poliestral estacional. A atividade reprodutiva é regulada primariamente por fotoperíodo, mas também por aspectos nutricionais e climáticos principalmente temperatura.

O ciclo estral é definido como a sequência repetitiva de eventos que preparam a fêmea para a concepção. Na égua ele pode ser convenientemente dividido em estro (fase folicular) e diestro (fase luteal). Durante o estro a égua é sexualmente receptiva ao garanhão, o trato genital é preparado para aceitar e transportar o espermatozóide e a ovulação ocorre. Durante este período o folículo dominante se desenvolve e secreta estrógeno que induz receptividade sexual. A ovulação geralmente ocorre 24 a 48 horas antes do final da receptividade sexual. Diestro é o período no qual a égua não é receptiva ao garanhão e o trato genital é preparado para aceitar e nutrir o concepto. Depois da ovulação o folículo rompido desenvolve um corpo lúteo, que secreta progesterona. O período em que ocorre secreção do corpo lúteo é denominado diestro. O fim do diestro é marcado pela regressão do corpo lúteo (luteólise) 14 a 15 dias após a ovulação. (Mc Kinnon & Voss, 1993).

Diferenças na duração da fase luteal são geralmente associadas com desordens uterinas ou ovarianas, causando regressão prematura do corpo lúteo através da secreção de prostaglandina F_{2α}, ou nos casos de prolongamento desta fase devido a uma persistência do corpo lúteo.

A duração da fase folicular é primariamente influenciada pela estação, mas também por variações individuais, raça e status folicular no início do estro. A duração do estro geralmente diminui à medida que a estação progride, com o estro mais rápido durante o verão. (Ginther, 1979).

Durante o ciclo estral, hormônios do hipotálamo, pituitária, ovário e útero controlam a dinâmica no trato genital e comportamento sexual através de complexas interações. Estes hormônios incluem: o hormônio liberador de

gonadotrofinas (GnRH) produzido no hipotálamo, as gonadotrofinas (hormônio folículo estimulante – FSH e hormônio luteinizante – LH) da pituitária anterior, hormônios esteróides (progesterona e estradiol) e peptídeos (inibina) do ovário e prostaglandina F2 α do endométrio (Mc Kinnon & Voss, 1993).

Produção da atividade reprodutiva por mudança de fotoperíodo ocorre através da secreção de GnRH.

A glândula pineal desempenha um importante papel quanto à informação fotoperiódica para o hipotálamo através do hormônio melatonina. O GnRH chega até a pituitária anterior via sistema portal e estimula a síntese e secreção de gonadotrofinas que chegam aos ovários através da circulação sistêmica (Kilmer et al., 1982; Evans & Irvine, 1976).

O LH se mantém em concentrações baixas entre os dias 5 a 16 do ciclo estral (ovulação=dia 0) e ele é o principal agente luteotrófico na égua. Depois da luteólise seus níveis aumentam progressivamente para atingir o pico máximo 2 dias após a ovulação e então diminuir progressivamente para baixos valores no diestro (Geschwind et al., 1975).

Durante o diestro a secreção de progesterona pelo corpo lúteo é mantida por concentrações basais de LH. Depois da luteólise o feedback negativo da progesterona na secreção de LH pituitário é removido e o estrógeno produzido pelos folículos estimula a secreção de LH. Assim, o LH estimula o desenvolvimento e maturação do folículo primário e a secreção de estrógeno folicular, criando uma onda de feedback positivo. A égua diferente de outras espécies não mostra o pico pré-ovulatório de LH. Não existe ainda uma explicação para a duração dos altos níveis de LH após a ovulação na égua (Montovan et al., 1990).

A secreção de FSH durante o ciclo estral é bifásica com ondas de 10 a 12 dias de intervalo. Valores de pico são atingidos no final do estro, imediatamente após a ovulação e do meio até o final da fase luteal,

aproximadamente 10 dias antes da próxima ovulação (Evans & Irvine, 1975). O FSH mantém o contínuo crescimento dos pequenos folículos e estimula a secreção de estrógeno folicular. Progesterona tem um efeito de feedback negativo para secreção de FSH . Um aumento da secreção de FSH no final do diestro é o principal estímulo para desenvolvimento folicular. Quando o folículo atinge o estágio pré-ovulatório produz hormônios protéicos, provavelmente a inibina, que inibe a secreção de FSH pela pituitária. Assim, a queda da secreção de FSH com o efeito estimulante do estrógeno na secreção de LH cria o ambiente necessário para a maturação final do folículo e impede o desenvolvimento dos folículos imaturos (Bergfelt & Ginther, 1985).

Secreção de estrógeno folicular atinge um pico um a dois dias antes da ovulação. Depois da ovulação o estrógeno atinge concentrações basais em 2 dias. Uma segunda onda na secreção de estrógeno pode ocorrer durante o diestro (Daels et al., 1991b). Provavelmente os inúmeros folículos que estão presentes no diestro podem contribuir para os níveis de estrógeno nesta fase. Na ausência de progesterona a secreção de estrógeno determina a receptividade sexual, relaxamento cervical e vulvar, estimula as secreções do útero, cérvix e vagina, permite a passagem e transporte do sêmem e participa da maturação folicular e ovulação (Lasley et al., 1990). Durante o estro, as concentrações de progesterona no plasma estão abaixo de 1 ng/mL.

Depois da ovulação, as concentrações de progesterona aumentam rapidamente para valores máximos em seis dias, permanecendo alta durante o diestro (6 a 10 ng/ml) e então, diminui rapidamente após a regressão do corpo lúteo nos dias quatorze a quinze do ciclo estral. A progesterona inibe o comportamento do estro, determina a contração e fechamento da cérvix e prepara o útero para a gestação. Os efeitos da progesterona no comportamento e características morfológicas da cérvix e útero são dominantes sobre os efeitos do estrógeno. Progesterona inibe o pico pré-ovulatório de LH, entretanto, diferente

de outras espécies, a progesterona não inibe completamente a foliculogênese e ovulação nas éguas. Assim, durante o diestro, os folículos podem continuar a crescer e ovular, mesmo com concentrações elevadas de progesterona (Stabenfeldt et al., 1981) permitindo que fêmeas gestantes passem apresentar sinais de estro.

3.4 Início da gestação nas éguas

A vida do embrião equino livre pode ser dividida em fases tubária e uterina. A fase tubária dura 5 ou 6 dias quando a mórula ou blastocisto inicial passa através da junção útero-tubária. A fase uterina continua até que o trofoblasto e o epitélio uterino comecem a formar uma nidação por volta de quarenta dias. Assim, o período que o concepto se mantém livre dentro da cavidade uterina, sem estabelecer uma adesão e localização no endométrio, é especialmente prolongado na égua, excedendo as outras espécies domésticas (Mc Kinnon & Voss, 1993).

Embriões recuperados do útero a partir do sexto dia após a fertilização se encontram nos estágios de mórula ou blastocisto inicial circundados pela zona pelúcida. Neste estágio ocorre uma rápida expansão destes embriões acompanhada por diferenciação e formação de uma cápsula embrionária que quando completamente formada mede aproximadamente 4 μm de espessura e é composta por uma glicoproteína que é diferenciada da zona pelúcida por características físico-químicas e imunológicas. (Bousquet et al., 1987).

Infelizmente as informações quanto ao período da ruptura desta cápsula são escassas. Enders & Liu (1991) observaram que dois embriões examinados aos 20 dias ainda estavam encapsulados, mas a cápsula já se encontrava deslocada aos 22 dias.

O concepto equino se desloca continuamente dentro da cavidade uterina, com uma movimentação máxima entre os dias 14 e 15 após a fertilização. A

função desta peregrinação aparentemente está relacionada a reconhecimento materno da gestação, porque quando o embrião não tem acesso a totalidade do endométrio, ele deteriora por insuficiência luteal (Mc Dowell et al., 1988). Inibição farmacológica da contração uterina prejudica a mobilidade embrionária indicando que o miométrio é primariamente responsável. Entretanto embriões artificiais não se movem de maneira semelhante, sugerindo que existe um fator embrionário que pode estimular o útero (Ginther, 1986).

O concepto normalmente cessa de se movimentar para sua fixação aos 15 ou 16 dias após a fertilização. O aumento progressivo do tônus miometrial durante o início da gestação parece favorecer a fixação (Enders & Liu, 1991).

3.5 Reconhecimento materno de gestação

O ciclo estral é, como o próprio nome indica, um fenômeno repetitivo para permitir múltiplas oportunidades de acasalamento e fertilização.

Basicamente a regressão do corpo lúteo divide as fases do ciclo estral. Assim, o reconhecimento da gestação depende de eventos e mecanismos que impedem a regressão do corpo lúteo. Uma forma precoce de reconhecimento ocorre no oviduto, que somente permite o transporte de óvulos fertilizados, mas somente este evento, isoladamente, não oferece garantia de continuidade da gestação e estabilidade do corpo lúteo. O útero é necessário para a regressão do corpo lúteo na maioria dos mamíferos, e mais especificamente o endométrio desempenha um importante papel na regressão normal do corpo lúteo (Ginther & First, 1971).

Zavy et al. (1979) relataram que diferente de éguas ciclando normalmente as éguas gestantes não apresentam nenhum aumento de $PGF2\alpha$ 14 dias após a ovulação. De maneira semelhante Berglund et al. (1982), relataram que endométrio coletado em éguas gestantes de 14 dias incubados com tecido de

concepto produzia significativamente menos $PGF^{2\alpha}$ do que endométrios incubados sem tecido embrionário.

É evidente que o concepto deve estar presente para que ocorra reconhecimento materno da gestação, mas é possível transferir o concepto de uma égua fertilizada para outra égua não fertilizada e obter uma gestação com sucesso. Evidentemente, existe um período crítico pelo qual o concepto deve agir ou sofrer as conseqüências da regressão do corpo lúteo e perda de secreções uterinas vitais para uma gestação. Na prática, as transferências de embriões são efetuadas no dia 6 a 8 após ovulação para que o sucesso da transferência seja maior. Estas taxas de prenhez declinam com a idade do concepto transferido. Ainda não está claro se esta redução ocorre devido às dificuldades técnicas provocadas por um embrião excessivamente grande ou por um fenômeno fisiológico real que ocorre pelo insuficiente tempo de interação entre o concepto e o útero materno (Hershman & Douglas, 1979).

Existem diversas hipóteses para o mecanismo de ação do concepto para manutenção do corpo lúteo. Entre estas ações a que possui mais evidências é que o concepto possui um efeito na prevenção da secreção de prostaglandina $F2\alpha$, contribuindo assim, para a manutenção do corpo lúteo. Zavy et al. (1979) reportaram que a concentração de $PGF2\alpha$ em lavados uterinos de éguas não fertilizadas atingia altas concentrações aos 14 dias pós ovulação, mas as concentrações de $PGF2\alpha$ em lavados de éguas gestantes não aumentavam. Este estudo sugere que na presença do concepto, a secreção uterina de $PGF2\alpha$ é reduzida ou bloqueada.

Em bovinos e ovinos, um grupo de proteínas denominadas proteínas trofoblásticas é sintetizada e secretada pela membrana do concepto no período do reconhecimento da gestação, mas existem poucas evidências de que isto ocorra de forma semelhante em éguas. Em suínos o fator ligado ao concepto que parece ter uma maior participação no reconhecimento materno é o estrógeno

(Bazer et al., 1989). A idéia de que o estrógeno é o sinal do conceito para o reconhecimento gestacional em éguas persiste por que existem relatos na literatura científica de que a administração de estrógeno garante a manutenção da função do corpo lúteo, mas a maioria dos trabalhos tem fracassado em provar esta hipótese (Heap et al., 1982).

Finalmente, um experimento demonstrou migração embrionária do conceito até 16 dias após a ovulação, estabelecendo contato com a maior parte possível da superfície do endométrio aparentemente é um importante mecanismo para assegurar a inibição da produção da PGF2 α e conseqüentemente contribuir para a manutenção do corpo lúteo (Mc Dowell et al., 1988).

3.6 Morte embrionária em éguas

Pesquisas efetuadas nas últimas décadas têm demonstrado que a perda embrionária precoce em éguas é um dos principais fatores de subfertilidade e baixa eficiência reprodutiva em éguas.

Foram relatadas 9% de perdas embrionárias em éguas jovens férteis e taxas de 62 a 73% para éguas velhas subférteis (Ball et al., 1986; Ball et al., 1989).

Muitos fatores podem ocasionar morte embrionária em éguas. Os fatores maternos incluem problemas endócrinos, do oviduto, útero e idade da égua. Os fatores externos podem estar relacionados a stress, clima, manejo, nutrição e causas iatrogênicas. Os fatores embrionários incluem defeitos genéticos e imunogenéticos (Mc Kinnon & Voss, 1993).

A progesterona é fundamental para a manutenção da gestação em éguas. Durante o período embrionário a fonte de progesterona depende do corpo lúteo primário formado a partir da ovulação inicial. A manutenção deste corpo lúteo depende da habilidade do conceito em bloquear a produção de PGF2 α

endometrial dentro do processo de reconhecimento materno de gestação (Sharp et al., 1989).

Depois dos 30 dias de gestação a produção de progesterona pelo corpo lúteo primário é aparentemente estimulada e assegurada com a produção de gonadotropina coriônica eqüina (eCG) pelos cálices endometriais (Ginther, 1979). A redução nas concentrações de progesterona, ocasionando a morte embrionária, provavelmente seja devido a três mecanismos; que incluem falha de reconhecimento materno da gestação, insuficiência luteal primária e luteólise induzida pelo útero devido à inflamação e estímulo endometrial (Ginther, 1985b).

A falha no reconhecimento materno da gestação pode resultar em baixas concentrações de progesterona antes do 11^o dia pós-ovulação, mas a luteólise induzida pelo útero pode comprometer as concentrações de progesterona depois do dia 4 ou 5 pós-ovulação, ou seja, de forma muito precoce Ginther (1985a). Para demonstrar de maneira conclusiva um defeito luteal primário é necessário excluir luteólise secundária a endometrite ou falha no reconhecimento materno. Isto exige medidas da concentração de PGF2 α ou de seu metabólito (PGFM) a fim de excluir luteólise (Darenius et al., 1989).

Adams et al. (1987) demonstraram luteólise induzida pelo útero como causa de redução da concentração de progesterona e perda embrionária em éguas com evidência ultrassonográfica de endometrite.

Inoculação intra-uterina de leveduras em éguas gestantes resultou em endometrite, luteólise e morte embrionária. Nestas éguas a perda embrionária coincidiu com declínio nas concentrações de progesterona plasmática, entretanto é importante considerar os efeitos inflamatórios e patológicos locais como possíveis causas de morte embrionária (Ball et al., 1988).

Daels et al. (1987) Daels et al. (1989) demonstraram morte embrionária em éguas até 55 dias de gestação causada por liberação de PGF2 α mediada por

endotoxinas. Como endotoxemia é uma complicação usual de diversas condições patológicas, a luteólise e morte embrionária podem ser uma importante ocorrência nestas doenças. Embora FM efetivamente bloqueie a liberação de PGF2 α resultante de endotoxemia, ele deve ser administrado antes do início da produção de endotoxinas para demonstrar mais eficiência. Entretanto, estes autores concluíram que a administração de progesterona parece ser a melhor alternativa para prevenir morte embrionária decorrente de endotoxemia. A administração do progestágeno sintético altrenogest (44 mg) 12 horas após o início da produção de endotoxinas impediu eficientemente a morte embrionária.

O concepto eqüino produz concentrações detectáveis de estrógeno *in vitro* a partir dos 6 aos 12 dias depois da ovulação. A produção de estrógeno pelo concepto tem sido investigada como um importante fator de reconhecimento materno (Marsan et al., 1987). Um pouco mais tarde, entre 35 e 40 dias de gestação ocorre um aumento em estrógenos conjugados que tem sido utilizado para atestar viabilidade fetal, pois morte embrionária pode ser associada ao rápido declínio em sulfato de esterona plasmáticas (Kasman, et al., 1988).

A função do oviduto é importante em muitos aspectos iniciais do desenvolvimento embrionário e existem algumas características que ocorrem somente nas éguas. O embrião eqüino permanece no oviduto por um período consideravelmente maior nas éguas quando comparado a outras espécies domésticas. O período médio de deslocamento do embrião no oviduto, até alcançar a cavidade uterina, é de 5,5 dias. Quando o embrião chega ao útero seu estágio é de mórula ou blastocisto inicial (Betteridge et al., 1979).

O tempo de transporte no oviduto parece ser crítico para proporcionar condições de formação de um meio uterino favorável a permanência embrionária.

Se esse deslocamento no oviduto é acelerado, o meio uterino pode ser indesejável para a sobrevivência embrionária. Entretanto, estudos em transferência de embriões têm demonstrado que o ambiente uterino é capaz de suportar o desenvolvimento embrionário a partir do 4º dia após a ovulação (Ball et al., 1989).

Outro aspecto único da função do oviduto em éguas é o transporte diferenciado de embriões e oócitos não fertilizados. Existe um mecanismo que assegura o transporte de embriões, mas não garante o deslocamento de oócitos que não foram fertilizados adequadamente. Um relato recente demonstrou que embriões iniciais começam seu trânsito no oviduto provavelmente pela secreção de prostaglandina E2 (Weber et al., 1991). Falha na secreção embrionária de E2 pode resultar em trânsito inadequado e perda embrionária antes que chegue ao útero.

O ambiente uterino é fundamental para o desenvolvimento embrionário após o 6º dia da fertilização. Como a formação microcotiledonária da placenta só ocorre após 40 dias, a nutrição e desenvolvimento do concepto dependem exclusivamente das secreções uterinas (Leite uterino) produzidas pelas glândulas endometriais sob o estímulo da progesterona (Mc Kinnon & Voss, 1993).

Secreção de proteínas uterinas tem sido demonstrada em éguas com aumento significativo na concentração destas proteínas através da influência de progesterona (Mc Dowell et al., 1990). Embora as proteínas endometriais sejam influenciadas pela progesterona, éguas gestantes e em diestro possuem proteínas semelhantes aos 12 a 18 dias pós-ovulação.

Clinicamente a relação entre ambiente uterino anormal e morte embrionária tem sido investigada. Estas anormalidades uterinas incluem endometrite e fibrose periglandular. Kenney (1978) sugeriu uma relação entre fibrose endometrial e perdas embrionárias. O efeito desta anormalidade na

fertilidade das éguas é complicado porque esta alteração ocorre frequentemente em éguas mais velhas.

Endometrites podem ocasionar morte embrionária pela luteólise ou efeito direto da inflamação e patógenos sobre o concepto. Éguas subfêrteis e idosas podem ser mais susceptíveis a endometrite após cobertura ou inseminação. Falha nos mecanismos de defesa uterina e eliminação de agentes contaminantes do útero podem resultar em endometrite crônica durante a fase luteal, ocasionando perda embrionária (Hughes & Loy, 1975).

Stress é proposto como um importante fator de morte embrionária em éguas. Niekerk & Norgenthal (1982); relatou um declínio importante nas concentrações periféricas de progesterona em éguas submetidas ao stress relacionado à dor ou doenças infecciosas e sugeriu que a queda nas concentrações de progesterona era provocada pela liberação de cortisol.

Palpação transretal foi considerada como um fator relacionado a perdas embrionárias. Um estudo evidenciou maiores perdas quando o controle de gestação por palpação foi efetuado entre os dias 20 e 30 pós fertilização comparado com controles após 40 dias de gestação (Osborne, 1975). Em outro estudo o nº de perdas de gestação foi similar independente do período em que as éguas foram examinadas por palpação transretal (Irwin, 1976). A grande incidência de perdas embrionárias deve ser considerada no início da gestação como uma ocorrência usual em éguas saudáveis e fêrteis, entretanto, palpação transretal efetuada por técnicos qualificados, aparentemente, não afeta as taxas de prenhez (Voss et al., 1975).

3.7 Causas infecciosas e inflamatórias de infertilidade

A patogenia das infecções uterinas é complexa e pouco compreendida. Fatores imunológicos e físicos devem ser considerados no mecanismo de defesa

uterino. Os elementos mais conhecidos deste mecanismo de defesa são os fagócitos e a evacuação mecânica do conteúdo da cavidade do útero.

A combinação de uma rápida e eficiente ingestão de bactérias por fagócitos e imediata expulsão de material celular e outros produtos inflamatórios através da cérvix resultam em um retorno ao ambiente uterino normal em algumas horas. O fator crítico é tempo, porque o embrião desce para a cavidade uterina entre 5 e 6 dias após a ovulação e neste momento o útero deve estar livre de todo material embriotóxico para que a gestação seja estabelecida em condições uterinas favoráveis. Endometrite ativa é incompatível com saúde embrionária. Adicionalmente, um processo inflamatório no endométrio a partir do 5º dia de gestação pode comprometer o corpo lúteo através da liberação de prostaglandina. Entretanto todas as éguas desenvolvem endometrite após trauma ou contaminação uterina, mas éguas férteis consideradas resistentes recuperam o ambiente uterino de maneira rápida e eficiente. (Hughes & Loy, 2003).

Imediatamente após a introdução de bactéria ou qualquer outro material antigênico dentro do útero da égua os neutrófilos e proteínas séricas são direcionados para a cavidade uterina e o útero é estimulado a evacuar seu conteúdo através da cérvix aberta. A contração do miométrio é mais eficiente sob a influência estrogênica. Oponinas, especialmente imunoglobulinas e complemento são muito importantes nos processos de fagocitose porque estimulam a aderência de microorganismos à membrana celular dos fagócitos. Secreções uterinas de éguas susceptíveis a endometrite foram menos eficientes em opsonizar bactérias do que éguas férteis resistentes (Watson et al., 1987).

Redução na habilidade para evacuar conteúdo uterino corresponde geralmente a éguas que perdem gradativamente sua resistência a endometrite. O processo tem a tendência de se agravar gradualmente na medida em que ocorrem sucessivos partos e múltiplos insultos cervicais e uterinos. Éguas mais velhas com o útero espesso e edematoso e com alterações degenerativas como fibrose

periglandular e estase linfática do útero são mais susceptíveis a reduções significativas da drenagem uterina e à endometrites (Kenney, 1978).

3.8 Biópsia endometrial

A biópsia endometrial para exame histológico é uma importante ferramenta na avaliação reprodutiva de éguas.

O principal valor desta técnica é a de oferecer base para prever a futura habilidade uterina de conduzir uma gestação a termo. Esta técnica é eficiente também em detectar mudanças citológicas e histopatológicas relacionadas com baixa fertilidade, que não são facilmente diagnosticadas por outros métodos. (Mc Kinnon & Voss, 1993).

Uma variedade de instrumentos tem sido usada para obter amostras endometriais aceitáveis. A mais utilizada é uma pinça Chevalier Jackson (Chas. F. tahackray Ltd., P.O. Box 171, Leeds LS1RQ Pilling Surgical Instrument Co., Fort Washington, PA) que fornece amostras de 1 a 2 cm de endométrio. Na ausência de anormalidades uterinas aparentes, apenas uma amostra pode ser suficiente e representativa do endométrio na sua totalidade. Como a cérvix uterina é facilmente dilatada, amostras podem ser obtidas em qualquer fase do ciclo estral. A arquitetura endometrial muda com o estágio do ciclo e a estação do ano e por esta razão, o técnico envolvido no exame deve ser informado do estágio do ciclo e dos achados anatomopatológicos na ocasião da coleta. (Kenney, 1978).

Os fixadores mais utilizados são formalina a 10% e solução de Bouin. A solução de Bouin aparentemente fornece uma amostra mais firme que a formalina, com menos distorção tecidual durante a secção. Depois de 2 a 4 horas em líquido de Bouin o tecido deve ser transferido para formalina antes que seja transportado para o laboratório. Excessiva fixação em solução de Bouin pode resultar em amostras muito densas, dificultando a coloração com hematoxilina.

Após os procedimentos histológicos de rotina as secções são coradas em hematoxilina-eosina (Mc Kinnon & Voss, 1993).

As características histológicas observadas nas amostras da biópsia endometrial devem ser fisiológicas (cíclicas ou estacionais), patológicas ou artefactuais. O sólido conhecimento das alterações fisiológicas é necessário para permitir a interpretação de mudanças patológicas. Durante anestro as glândulas endometriais são inativas. As células epiteliais glandulares e luminais são cubóides ou escamosas. As células epiteliais têm um aumento na basofilia citoplasmática. Os ramos glandulares individuais têm um diâmetro seccional pequeno. Características histológicas do endométrio transicional não são claramente definidas. A correta interpretação é difícil em razão de comportamento estral errático. Durante esta transição do inverno para a primavera, ou seja, do anestro para a fase de ciclicidade o endométrio retorna gradualmente sua atividade.

Durante o estro as células epiteliais glandulares e luminais são colunares. São de coloração pálida, e vacúolos na porção basal do epitélio luminal são comuns. Poucos leucócitos polimorfonucleados são geralmente localizados nos capilares sobre o epitélio da margem de vênulas na lâmina própria e considerável edema da lâmina própria pode ocorrer. Os ramos glandulares seccionados mostram um diâmetro aumentado e as secções longitudinais demonstram um padrão glandular relativamente reto com ausência de tortuosidade.

Durante diestro as células epiteliais variam de colunares a cubóides dependendo do estágio precedente ou seqüencial ao estro. O padrão glandular é geralmente tortuoso (Kenney, 1978).

As alterações endometriais mais encontradas no exame histológico são a degeneração glandular, lacunas linfáticas, atrofia endometriais e infiltrações celulares. As alterações degenerativas incluem fibrose periglandular, dilatação

cística das glândulas e necrose glandular. A fibrose ocorre geralmente em torno das glândulas ou em associação com a membrana basal do epitélio luminal. Distensão cística glandular é comum nos grupos de fibrose. Estas dilatações podem ocorrer no período sexual transicional, para finalmente desaparecer na estação reprodutiva normal. Quando estas alterações persistem durante os períodos de ciclo estral fisiológico normal elas são consideradas patológicas e são associadas a uma redução na fertilidade (Kenney, 1978).

Destruição e necrose glandular são um achado menos comum. Processos de necrose geralmente são associados a uma intensa resposta celular e o clínico deve estar alerta quanto a infecções fúngicas (Hurtgen & Commings, 1982).

Derivadas de dilatação linfática, as lacunas linfáticas são de formato irregular, contendo material eosinófilo levemente corado circundados por uma margem endotelial delgada. A atrofia endometrial se caracteriza por células epiteliais glandulares e luminais cubóides inativas, associadas a contração do lúmen glandular. Atrofia endometrial é um achado característico de anestro estacional e passa a ser anormal se for observada durante a estação reprodutiva fisiológica. Atrofia disseminada é frequentemente ocasionada por deficiência hormonal esteroideal dos ovários e pode ser observada em éguas velhas com atividades ovarianas deficientes (Mc Kinnon & Voss, 1993).

As infiltrações celulares consistem de polimorfonucleados, linfócitos, células plasmáticas, eosinófilos, macrófagos e mastócitos. Leucócitos polimorfonucleados (PMNS) são indicativos de processos, inflamatórios e endometrite.

Em amostras para biópsia de éguas com inflamação aguda do endométrio, PMNS são usualmente encontrados no estrato compacto e entre as células epiteliais luminais migrando para o lúmen uterino, mesmo em casos severos não encontramos grande número de PMNS no lúmen. Em casos extremamente severos os PMNS podem ser encontrados em camadas profundas

da lâmina própria. Glândulas dilatadas contendo PMNS degenerados podem ser encontradas em endometrite aguda independentemente do grau de severidade.

Inflamações crônicas são caracterizadas por infiltração de linfócitos, células plasmáticas e com menor frequência eosinófilos e mastócitos. Infiltrações crônicas acometem geralmente o estrato compacto e reações agudas e crônicas podem ser visualizadas juntas.

Reações crônicas são comuns na lâmina própria profunda, usualmente na forma de focos discretos ou distribuição difusa. Eosinófilos são encontrados com pouca frequência e geralmente em casos de endometrite provocada por fungos e pneumoútero. Macrófagos podem ser encontrados em éguas recentemente paridas ou após processos abortivos (Kenney, 1978).

Kenney & Doig (1986) propôs um sistema de classificação do endométrio inicialmente em 3 categorias, sendo posteriormente modificado em quatro categorias: endométrio normal (Categoria I), mudança endometrial leve (Categoria II A), mudança endometrial moderada (Categoria II B) e mudança endometrial severa (Categoria III).

A utilização do sistema originariamente proposto por Kenney & Doig (1986) pode oferecer um prognóstico razoável do futuro reprodutivo das éguas examinadas com a probabilidade de obter um potro saudável a termo. É importante saber que a confiabilidade deste sistema é relativa podendo ocorrer inúmeras exceções (Kenney & Doig, 1986), pois inúmeros fatores além das mudanças endometriais podem interferir na fertilidade (Waelchli, 1990).

Em um estudo comparativo de éguas repetidoras ou não de cio através da avaliação histológica do endométrio Moreira et al. (2007) concluíram que nem todas as éguas classificadas na categoria I e II levaram a gestação a termo e nem todas da categoria III tiveram falhas na reprodução, pois, deve-se considerar que outros fatores podem influenciar na manutenção da gestação. A biópsia endometrial demonstrou ser uma técnica fácil, segura, barata e com um

desconforto mínimo para o animal. Sugeriram que esta técnica juntamente com outros dados, constitui uma importante ferramenta para avaliação da fertilidade da égua.

Ricketts & Alonso (1991) demonstraram que o exame de duas amostras de biópsia endometrial coletadas antes e após tratamento uterino específico, considerando a habilidade de recuperação da égua, seria mais eficiente em estabelecer o prognóstico reprodutivo que a coleta de uma amostra.

Em uma investigação sobre a utilização de biópsia endometrial em éguas inférteis, Doig et al. (1981) concluíram que a biópsia endometrial é uma técnica diagnóstica e prognóstica válida, mas quando o grau de fibrose é usado para prever a probabilidade de um potro chegar a termo, a idade e o manejo reprodutivo também devem ser considerados para um prognóstico mais confiável.

3.9 Transferência de embrião em éguas

A aceitação de transferência de embriões entre éguas pela maioria das associações de registro tem estimulado esta técnica durante as últimas décadas. Esta técnica acrescenta algumas vantagens como: obter potros de éguas velhas ou subférteis, aumentar a produção de éguas consideradas geneticamente desejáveis ou superiores, garantir a produção de potros em éguas comprometidas com uma carreira esportiva ou outras tarefas e acelerar o início reprodutivo de éguas excessivamente jovens (Mc Kinnon & Voss, 1993).

Entretanto, diversas características biológicas específicas da espécie equina assim como problemas técnicos têm limitado sua eficiência quando comparada com a indústria bovina. Fatores que afetam a recuperação dos embriões podem estar relacionados ao dia da coleta, número de ovulações, idade da doadora, qualidade do sêmen e técnicas utilizadas.

Geralmente as coletas são efetuadas no 7^o ou 8^o dia após a ovulação. Nos casos em que se opta pelo congelamento do embrião esta coleta deve ocorrer no 6^o dia pós-ovulação por razões técnicas do processo. A maioria das coletas é efetuada em éguas com ovulação única.

Atualmente, ainda não existe preparação hormonal comercial que seja eficiente para induzir múltiplas ovulações na égua. Extrato de pituitária eqüina tem sido utilizado, com resultados variáveis. O FSH de origem ovina ou suína não tem demonstrado efeito em indução de ovulações na espécie eqüina.

Alguns fatores que afetam as taxas de transferência de embriões incluem o método de transferência, o sincronismo entre doadora e receptora, e manejo da receptora.

Um aspecto importante no processo de transferência atual é a possibilidade de armazenamento do embrião refrigerado a 5°C garantindo seu deslocamento e implantação em receptoras distantes do local de coleta, sem comprometimento da fertilidade. Atualmente a eficiência e sucesso das técnicas de congelamento do embrião ainda são insuficientes para garantir a utilização rotineira deste processo, Apenas pequenos embriões de 6 dias têm alcançado algum resultado nas técnicas de congelamento. Estudos adicionais são necessários para viabilizar técnicas eficientes de congelamento para embriões de 7 e 8 dias pós-ovulação. A demanda para desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Coleta de oocistos eqüinos através de punção transvaginal guiada por ultrasson e a transferência destes oocistos em receptoras começa a ser utilizada para obter gestação de doadoras incapazes de produzir embriões. Entretanto a fertilização *in vitro* tem encontrado grandes dificuldades na espécie eqüina. Uma alternativa para a fertilização *in vitro* é a injeção intracitoplasmática do espermatozóide, mas esta técnica também encontra dificuldades porque os meios de cultura para embriões *in vitro* tem se mostrado inadequados (Squires et al., 1999).

Carnevale et al. (2000) concluíram um estudo de 638 transferências de embriões durante 3 anos consecutivos. O objetivo foi determinar quais fatores (receptora, embrião e transferência) influenciaram significativamente as taxas de prenhez e a frequência de perdas embrionárias, a fim de melhorar a eficiência desta técnica. Nos dias 7 a 8 pós-ovulação os embriões (frescos ou refrigerados para transporte) foram transferidos pelo método cirúrgico e não-cirúrgico em receptoras ovulando de 5 a 9 dias antes da transferência. As taxas de prenhez aos 50 dias foram significativamente mais altas para as receptoras que apresentavam bom tônus uterino. Os fatores embrionários que afetaram significativamente as taxas de prenhez foram grau morfológico, diâmetro e estágio de desenvolvimento. As taxas de perda embrionária foram maiores em receptoras utilizadas dos 7 aos 9 dias após ovulação quando comparadas as receptoras de 5 a 6 dias. Embriões com poucas mudanças morfológicas (grau 2) resultaram em maiores perdas que embriões sem anormalidades (grau 1). Entre os dias 12 a 50 de gestação o maior nº de perdas embrionárias ocorreu no intervalo de 17 a 25 dias pós-ovulação. Neste estudo, os autores concluíram que os aspectos morfológicos do embrião são um fator importante para a viabilidade gestacional. O atraso no desenvolvimento do embrião até o momento da coleta ou no seu desenvolvimento após implantação são fatores determinantes de perda embrionária. Aspectos como idade e dia pós-ovulação afetaram significativamente as taxas de prenhez.

4 HIPÓTESES

- 1-** A manipulação transcervical de éguas estimula a produção de prostaglandinas e induz processo inflamatório do endométrio.
- 2-** A administração de flunixin meglumine inibe a produção de prostaglandinas e a ocorrência de endometrite após manipulação transcervical.
- 3-** A utilização de flunixin meglumine no momento da transferência de embrião aumenta o número de fêmeas gestantes.

5 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 209 animais em 3 experimentos, sendo 161 éguas mangalarga marchador e 48 éguas mestiças.

Experimento 1

Este experimento objetivou avaliar descritivamente concentrações individuais de PGFM de animais submetidos a diferentes horários de aplicação de FM em relação à manipulação transcervical. Também foi avaliada a variação circadiana parcial, ou efeito fixo do tempo, das concentrações médias de PGFM, independentemente da FM.

No primeiro experimento foram utilizadas 11 éguas separadas em duas réplicas. Na primeira réplica seis éguas mestiças com idade entre 7 e 11 anos e peso entre 380 e 450 kg, ciclando normalmente e sem alterações patológicas ao exame reprodutivo transretal e ultrassonográfico, foram sincronizadas (Figura 1) com aplicação de 1800 mg de progesterona de ação prolongada ou P4 (P4[®], Biotech, Botucatu, SP) por via intramuscular. Dez dias após a aplicação de P4 foram aplicados 10 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse[®], Laboratório Pfizer Ltda, Paulínia, SP) por via intramuscular. Das seis éguas quatro delas apresentaram sinais de estro durante a rufiação 4 a 5 dias após a aplicação de Lutalyse[®], uma não mostrou sinais de estro sendo descartada do experimento e a outra égua veio a óbito por acidente ofídico. O estro destas 4 éguas identificadas como éguas 61, 31, 01 e C1, foi acompanhado diariamente por ultrassonografia transretal, com sonda linear de 5,0 MHz (Aloka 500[®], Berger,SP) para determinação do dia da ovulação. Todas as quatro éguas que apresentaram estro ovularam num período de $4,0 \pm 1,0$ d depois de detectado o início do estro. Aos $7,0 \pm 1,0$ d após a ovulação as éguas foram submetidas à vigorosa manipulação digital, dilatando a abertura cervical com o dedo indicador, e submetidas a

técnica de transferência não cirúrgica de embrião (Squires et al., 1985) com passagem transcervical de pipeta de inseminação em éguas. Antes da introdução da pipeta, a genitália externa (vulva e região perineal) foi lavada com solução de iodo (Povidina Degermante[®] (Glicolabor, Ribeirao Preto, SP), enxaguada em seguida com água e secada com papel toalha. O braço do operador foi revestido com luva plástica de palpação transretal (Distribuidora Veterinaria, Mogi-Mirin, SP) lubrificada com pomada a base de água (Ky[®], J&J, São Jose dos Campos, SP). A pipeta protegida por camisa plástica sanitária foi introduzida, juntamente com o braço, no canal vaginal e conduzida até o óstio cervical caudal. Após introdução e passagem do conjunto de aplicação através do canal cervical, foram depositados 0,5 ml de meio Ham-F10 modificado (Nutricell[®], Campinas, SP), no interior do corpo uterino.

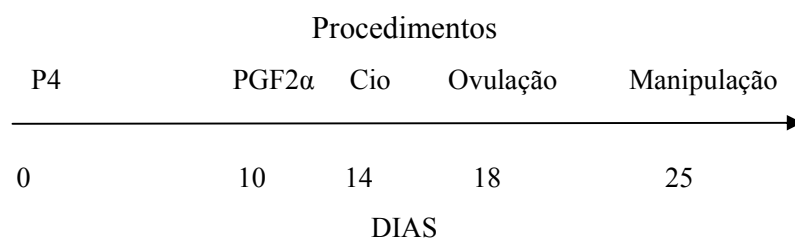


FIGURA 1 Protocolo de sincronização de éguas do experimento 1, réplica 1 (n=6). P4: aplicação de 1800,00 mg progesterona de longa ação (P4[®]); PGF2 α : aplicação de 10 mg de dinoprost trometamina.

Na segunda réplica foram utilizadas 5 éguas da raça Mangalarga Marchador identificadas como éguas 62, 32, 02, C2 e N, com idade entre 6 e 15 anos, peso entre 400 e 450 kg, em diestro e sem alterações patológicas do trato reprodutivo ao exame transretal e ultrassonográfico. Todas as éguas apresentavam nutrição e manejo semelhantes. Todas as 5 éguas foram submetidas à passagem transcervical de pipeta para inseminação em éguas, com

mínima manipulação cervical, e deposição de 0,5 ml de Ham F10 (Nutricell®, Campinas, SP) no interior do útero.

As éguas das réplicas 1 e 2 foram submetidas aos seguintes protocolos de injeções (Figura 2): as éguas 61 e 62 receberam uma aplicação endovenosa de 1,1 mg/kg de peso vivo de FM (Flumedin®, Jofadel, Varginha, MG), 6 horas antes da manipulação cervical. Utilizando a mesma técnica as éguas 31 e 32 receberam a mesma dosagem de FM, 3 horas antes da manipulação. As éguas 01 e 02 receberam a injeção de FM imediatamente após o procedimento. As éguas controle, C1 e C2 receberam uma injeção de 10 ml de soro fisiológico 0,9% por via endovenosa no mesmo momento das éguas 01 e 02, ou seja, logo após o procedimento de manipulação cervical. A égua N somente foi submetida a manipulação cervical, sem aplicação de injeção.

Após o procedimento de manipulação cervical e deposição do meio intra-uterino foi coletado de cada égua das duas réplicas uma amostra de 10 ml de sangue da jugular e depois mais 11 amostras idênticas consecutivas com intervalos de 30 minutos. Em torno de 24 horas após a 12ª coleta foi retirada a 13ª amostra.

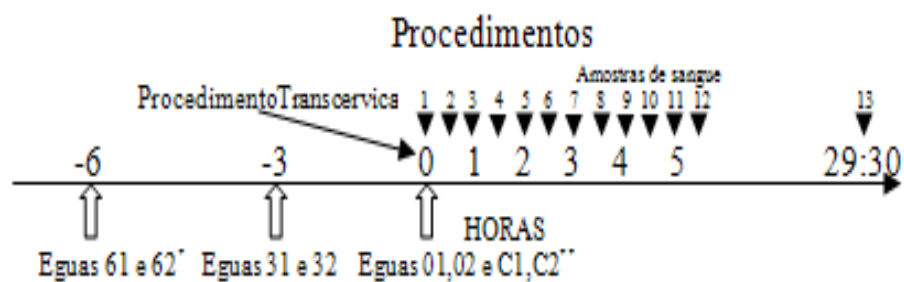


FIGURA 2 Protocolo de injeções e da coleta de sangue das éguas das 2 réplicas do experimento 1(n=9). - injeção de 1,1 mg/kg de peso vivo de flunixin meglumine (Flumedin®, Jofadel, Varginha, MG).

**Receberam injeção de solução salina (C1 e C2).

Observação: égua N não recebeu injeção.

Foi isolado o soro de cada frasco coletado e cada amostra foi identificada e congelada a -20°C . Cada uma das amostras foi analisada para determinar a concentração de 13, 14-dihidro-15-ceto prostaglandina $\text{F2}\alpha$ (PGFM) utilizando kit EIA[®] (Cayman Chemical, 1180 E. Ellsworth Road Ann Arbor, MI, 48108 USA). A metodologia para a execução do teste de ELISA utilizou técnica imunoenzimática por quimioluminescência.

Experimento 2

No segundo experimento, procurou-se investigar a relação entre manipulação cervical e endometrite, assim como, a eficiência do FM na inibição do processo inflamatório. Para tal, foram utilizadas 42 éguas mestiças de abatedouro. Estas éguas foram separadas em 4 grupos distintos. Todas as injeções foram compostas de 1,1 mg de FM/kg de peso vivo (Flumedin[®], Jofadel- Varginha/MG) via endovenosa. As éguas do grupo I, não foram submetidas à manipulação cervical digital e não foram injetadas com FM. No grupo II as éguas sofreram manipulação digital cervical com introdução do dedo indicador na abertura cervical e não foram injetadas com FM. No grupo III todas as éguas foram manipuladas e injetadas com FM. As éguas do grupo IV foram injetadas com FM, mas não foram submetidas à manipulação cervical digital. As manipulações consistiam na introdução do dedo indicador na abertura cervical movimentando por alguns segundos. As manipulações e injeções foram efetuadas num período que variava de 35 a 45 minutos antes do abate.

Todos os grupos utilizados neste experimento foram submetidas, após o abate, a coleta de fragmento da parede uterina na região medial do corno direito com dimensão de 2,0cm x 1,5cm. Das 42 éguas, 9 animais não foram coletados após o abate, pois estavam gestantes.

Os fragmentos coletados, medindo aproximadamente 2,0 x 1,5cm, foram fixados por até 24 horas em líquido de Bouin, lavados em álcool 70% e processados rotineiramente para exame histológico, corados pela hematoxilina e eosina e examinados por microscopia ótica (Ricketts, 1975a), no laboratório de patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

O útero e ovários isolados das carcaças foram seccionados para visualização de estruturas como endométrio, dobras endometriais, folículos e corpo lúteo com o intuito de caracterizar a fase do ciclo estral e eventuais patologias. Útero e ovários foram identificados e fotografados. Foram coletadas 33 amostras de fragmento uterino, sendo sete, nove, onze e seis dos grupos I, II, III e IV, respectivamente.

Todas as amostras foram coletadas no frigorífico, imediatamente após o abate, não ultrapassando o período de 30 minutos entre abate e coleta do fragmento uterino para exame histopatológico.

Experimento 3

Neste experimento foi avaliada a influência da utilização ou não de FM nas taxas de prenhez de receptoras em programas de transferência de embriões em 4 haras diferentes .

Foram utilizadas 156 éguas receptoras da raça mangalarga marchador, entre 3 e 15 anos de idade, que estavam sendo utilizadas em programas de transferência de embriões durante a estação reprodutiva de 2006/2007. Destes animais 25 eram do haras A, 31 do haras B, 74 do haras C e 26 do haras D. A égua número 47 do Haras A, a 3 do haras B, as éguas número 6, 13, 81, 10, 75 e 43 do haras C e a L87 do haras D foram reutilizadas neste experimento totalizando 165 transferências de embrião. Os criatórios A, B e D se localizam no estado de Minas Gerais e o Haras C no estado de Sergipe. No haras B, o FM

foi aplicado em todas as éguas. Sendo assim, os dados de prenhez somente foram incluídos na análise geral de proporção de éguas prenhez.

Das 165 transferências de embrião, 86 foram acompanhadas de injeção endovenosa de FM na dose de 1,1 mg/kg de peso vivo, logo após o procedimento de deposição intra-uterina do embrião. Nas 79 transferências restantes não foi utilizado o antiinflamatório, perfazendo o grupo controle.

Todas as receptoras foram identificadas e as seguintes informações foram registradas em ficha individual (Anexo I): Haras, número de identificação ou nome, presença ou não de potro ao pé, medida do folículo pré-ovulatório, aplicação ou não de Gonadotrofina Coriônica Humana ou hCG (Vetecor[®], Hertape-Calier Saude Animal S.A., Juatuba, MG) para indução da ovulação, duração em dias do estro, dia pós ovulação da transferência, aplicação ou não de FM, utilização ou não de P4 exógena, classificação do trato reprodutivo e finalmente diagnóstico de gestação.

A qualidade da receptora no momento da transferência foi determinada através da palpação e ultrassonografia transretal. A presença de tônus uterino, corpo lúteo visível com ecogenicidade homogênea e contração cervical determinaram a égua como boa e apta a receber o embrião. A presença de folículos acima de 30mm em crescimento, dobras endometriais, cistos do endométrio e presença de líquido ou ar intra-uterino determinavam o animal como inaceitável (ruim) para o procedimento de transferência de embrião. A classificação média se referia a éguas com características intermediárias (Carnevale et al., 2000).

Do total de éguas, 76 éguas do Haras C foram submetidas ao protocolo de tratamento com progesterona para utilização de receptoras anovulatórias. Este protocolo consistiu na aplicação das receptoras em anestro ou pouca atividade ovariana, de 5,0 mg de benzoato de estradiol (Estrogin[®], Biofarm Química Farmacêutica Ltda, Jaboticabal, SP) por via intramuscular por 2 dias

consecutivos, seguido por aplicação no 3º dia de 1800,0 mg de progesterona. Estas éguas foram utilizadas a partir do 5º dia após a aplicação de P4® e quando utilizadas receberam uma segunda dose idêntica de P4® no momento da transferência. Após a transferência estas éguas receberam injeções semanais da mesma dose de P4® até os 110 dias de gestação, quando então foi interrompido este tratamento, sendo os níveis de progesterona a partir deste momento mantidos pela produção de progesterona placentária.

Todas as éguas foram submetidas ao método não cirúrgico de transferência de embrião, (Squires et al., 1985), sendo o embrião transferido para o interior do útero com pipeta de inseminação de éguas (Provar®, Provar Comercio Ltda, São Paulo, SP) ou com batinha azul e aplicador universal IMV juntamente com meio de conservação HAM F10® ou Encare® (Agrofarma, Mogi-Mirim, SP).

As éguas receptoras que receberam o embrião foram submetidas ao diagnóstico de gestação por ultrassonografia transretal aos 15, 30 e 60 dias de gestação, sendo considerado como resultado final o diagnóstico de gestação aos 60 dias. Estas receptoras não foram acompanhadas a partir dos 60 dias até o parto.

6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Experimento 1

No primeiro experimento, cujo delineamento foi inteiramente casualizado, os dados foram submetidos à análise de variância de acordo com o procedimento Statistical Analysis System, SAS, (2004) após teste de normalidade via Proc Univariate¹, e as médias comparadas pelo teste SNK. O modelo inicial foi:

$$y_{ijkl} = \mu + \text{Trat}_i + \text{Tempo}_j + \text{Réplica}_{kl} + \text{Trat}_i * \text{Tempo}_j + \text{erro}_{ijkl}$$

onde y = concentração de PGFM;

μ = constante inerente à todas as variáveis

Trat= Tratamento

e_{ijkl} = erro residual do i-ésimo animal (aleatório)¹

Foi constatada distribuição anormal para os valores de prostaglandina, sendo assim, foi efetuado o procedimento para detectar *outliers* (SAS, 2004), sendo os dados espúrios então desconsiderados. A concentração media inicial (amostra 1) foi utilizada como covariável para a ANOVA

Para efeito de comparação, as concentrações de PGFM de todas as éguas que receberam FM foram agrupadas (o grupo foi denominado FM) e comparadas com os animais controle.

Como ocorreram perdas substanciais de dados no tratamento com FM de 3 horas antes da manipulação cervical, os dados da réplica 2 foram analisados separadamente. Os dados das concentrações de PGFM foram submetidos à análise de variância utilizando os procedimentos ANOVA do pacote Minitab15.0 e SPSS 16.0.

Experimentos 2 e 3

Com o objetivo de verificar a presença de associação entre o uso do FM e a proporção de éguas com inflamação, dilatação glandular, ninho glandular, dilatação linfática, atrofia ou fibrose (2^o experimento), assim como, na associação do uso do FM e proporção de éguas gestantes (3^o experimento), foi utilizado o teste Qui-quadrado. O teste exato de Fisher foi usado no caso de tabelas com valores esperados menores que cinco, usando o procedimento Proc Freq (SAS, 2004).

Para estudar a relação entre o tempo de duração do estro (em dias) e as taxas de gestação das éguas, foram construídos modelos de regressão logística, utilizando como variável a resposta ao diagnóstico de gestação e como variável explicativa o tempo de duração do estro.

Nas análises estatísticas nos dois últimos experimentos, foram também utilizados os softwares estatísticos Minitab 15.0 e SPSS 16.0. Para todas as análises foi utilizado o nível de significância de 8%.

7 RESULTADOS

6.1 Resultados experimento 1

As concentrações médias de PGFM foram mais baixas ($p < 0,0001$) para as éguas que receberam FM (Tabela 1). Os diferentes horários de injeção de FM não influenciaram as concentrações de PGFM, ou seja, os valores médios de PGFM foram semelhantes entre os animais injetados 6 e 3 horas antes e no momento da manipulação.

TABELA 1 Influência do momento de aplicação do flunixin meglumine sobre as concentrações médias de PGFM em éguas. Números são médias dos quadrados mínimos.

| Tratamentos ¹ | Média(PGFM) (pg/mL) ² | EPM ³ |
|--------------------------|-------------------------------------|------------------|
| Controle | 632,82 ^a | 25,38 |
| 0 | 252,70 ^b | 23,30 |
| 3H | 191,31 ^b | 47,64 |
| 6H | 266,65 ^b | 25,58 |

¹Controle-aplicação de solução salina no momento da manipulação cervical (MC); 0-aplicação de FM no momento da MC; 3H-aplicação de FM 3 horas antes da MC; 6H-aplicação de FM 6 horas antes da MC.

²Médias com letras distintas na coluna são estatisticamente diferentes ($P < 0,0001$).

³EPM=Erro padrão da média

Comparando o grupo de animais aplicados, como um todo, com os animais controle, os tempos referentes às coletas não influenciou as concentrações de PGFM (Figura 3).

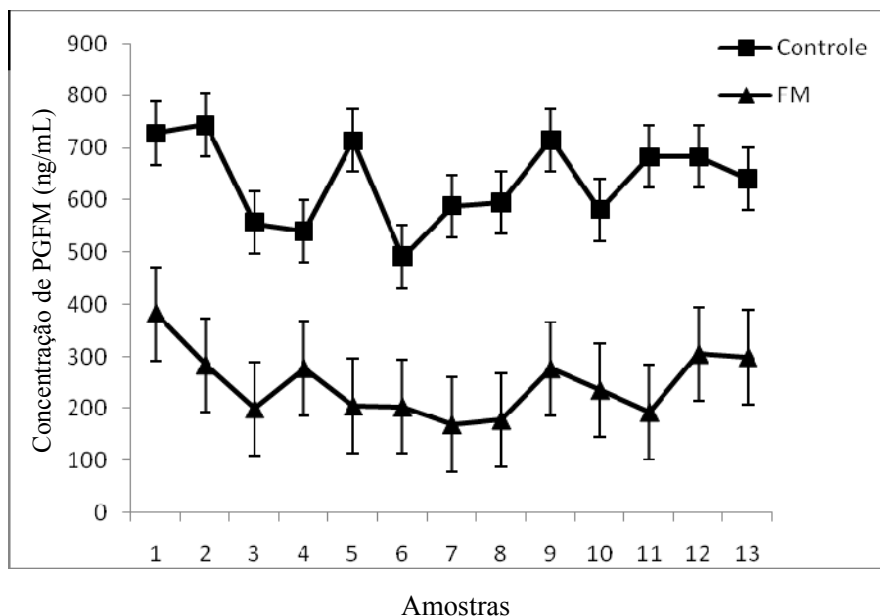


FIGURA 3 Concentrações de PGFM dos tempos de amostragem relativos a manipulação cervical em éguas.

Entre as éguas da réplica 2 no experimento 1, foi constatada diferença ($p = 0,002$) nas concentrações de PGFM entre os momentos de aplicação (Figura 5 e Tabela 2). Quando realizada a comparação múltipla, foram encontradas diferenças entre as éguas 3 e 4 ($p = 0,004$) e entre as éguas 3 e 5 ($p = 0,012$).

Na réplica 2, isoladamente, também houve efeito da aplicação de FM ($p = 0,041$) sobre as concentrações de PGFM, pois as éguas que receberam aplicação apresentaram valores médios de $190,04 \pm 63,49$ ng/mL e a égua que não recebeu aplicação apresentou valor médio de $253,63 \pm 51,75$ ng/mL.

Também, na réplica 2, houve influência do FM nas concentrações de PGFM entre éguas. Quando comparadas as éguas que receberam FM (1, 2 e 3)

com as que não receberam (4 e 5), o valor médio das primeiras foi de $172,49 \pm 63,15$ enquanto nas últimas o valor médio foi de $240,04 \pm 37,65$ ($p = 0,000$).

TABELA 2 Concentrações médias de PGFM nos diferentes momentos de aplicação*.

| Égua | Média (pg/mL) | Desvio-padrão |
|--|---------------|---------------|
| Aplicação 6 horas antes da manipulação (62) ^{a,b} | 181,02 | 47,49 |
| Aplicação 3 horas antes da manipulação (32) ^{a,b} | 188,35 | 38,61 |
| Aplicação no momento da manipulação (02) ^a | 156,74 | 82,84 |
| Aplicação de soro fisiológico (C2) ^b | 244,45 | 16,46 |
| Sem aplicação (N) ^b | 235,63 | 51,75 |

* ANOVA: $F = 5,05$; $p = 0,002$.

^a Letras iguais representam grupos estatisticamente iguais ($p = 1,000$)

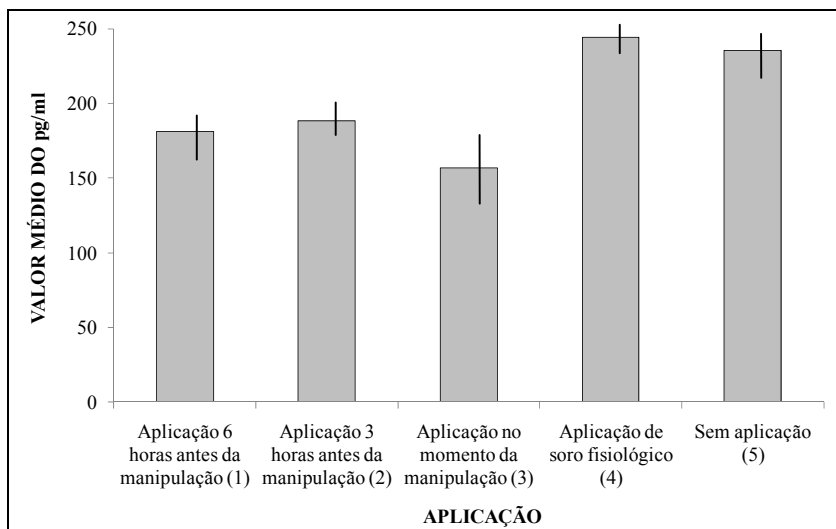


FIGURA 4 Valores médios das concentrações de PGFM para os diferentes momentos de aplicação de FM, na replica 2.

7.2 Resultados experimento 2

Houve efeito da manipulação sobre a proporção de éguas com inflamação ($p = 0,073$), mas não sobre a dilatação glandular ($p = 1,000$), ninho glandular ($p = 0,360$), dilatação linfática ($p = 0,659$), atrofia ($p = 0,270$) ou fibrose ($p = 1,000$)(Figura 6 e Tabelas 3-8).

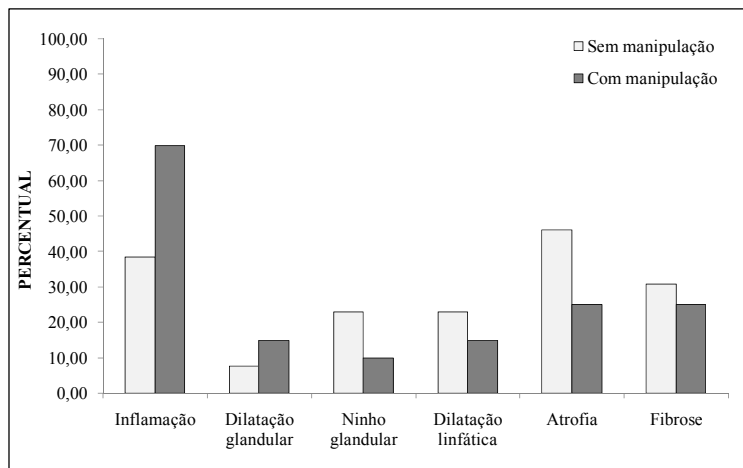


FIGURA 5 Efeito da manipulação sobre a proporção de éguas com inflamação, dilatação glandular, ninho glandular, dilatação linfática, atrofia e fibrose do endométrio.

TABELA 3 Efeito da manipulação cervical* sobre a proporção de éguas com inflamação uterina.

| Manipulação | Sem inflamação | Percentual sem inflamação | Com inflamação | Percentual com inflamação | TOTAL |
|-------------|----------------|---------------------------|----------------|---------------------------|-------|
| Não | 8 | 61,54 | 5 | 38,46 | 13 |
| Sim | 6 | 30,00 | 14 | 70,00* | 20 |
| TOTAL | 14 | 42,42 | 19 | 57,58 | 33 |

* Teste qui-quadrado: $p = 0,073$

TABELA 4 Efeito da manipulação sobre a proporção de éguas com dilatação glandular.

| Manipulação | Sem dilatação glandular | Percentual sem dilatação glandular | Com dilatação glandular | Percentual com dilatação glandular | TOTAL |
|-------------|-------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|-------|
| Não | 12 | 92,31 | 1 | 7,69 | 13 |
| Sim | 17 | 85,00 | 3 | 15,00 | 20 |
| TOTAL | 29 | 87,88 | 4 | 12,12 | 33 |

* Teste exato de Fisher: $p = 1,000$

TABELA 5 Efeito da manipulação* sobre a proporção de éguas com ninho glandular.

| Manipulação | Sem ninho glandular | Percentual sem ninho glandular | Com ninho glandular | Percentual com ninho glandular | TOTAL |
|-------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|-------|
| Não | 10 | 76,92 | 3 | 23,08 | 13 |
| Sim | 18 | 90,00 | 2 | 10,00 | 20 |
| TOTAL | 28 | 84,85 | 5 | 15,15 | 33 |

* Teste exato de Fisher: $p = 0,360$

TABELA 6 Efeito da manipulação* sobre a proporção de éguas com dilatação linfática.

| Manipulação | Sem dilatação linfática | Percentual sem dilatação linfática | Com dilatação linfática | Percentual com dilatação linfática | TOTAL |
|-------------|-------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|-------|
| Não | 10 | 76,92 | 3 | 23,08 | 13 |
| Sim | 17 | 85,00 | 3 | 15,00 | 20 |
| TOTAL | 27 | 81,82 | 6 | 18,18 | 33 |

* Teste exato de Fisher: $p = 0,659$

TABELA 7 Efeito da manipulação* sobre a proporção de éguas com atrofia.

| Manipulação | Sem atrofia | Percentual sem atrofia | Com atrofia | Percentual com atrofia | TOTAL |
|-------------|-------------|------------------------|-------------|------------------------|-------|
| Não | 7 | 53,85 | 6 | 46,15 | 13 |
| Sim | 15 | 75,00 | 5 | 25,00 | 20 |
| TOTAL | 22 | 66,67 | 11 | 33,33 | 33 |

* Teste exato de Fisher: $p = 0,270$

TABELA 8 Efeito da manipulação* sobre a proporção de éguas com fibrose.

| Manipulação | Sem fibrose | Percentual sem fibrose | Com fibrose | Percentual com fibrose | TOTAL |
|-------------|-------------|------------------------|-------------|------------------------|-------|
| Não | 9 | 69,23 | 4 | 30,77 | 13 |
| Sim | 15 | 75,00 | 5 | 25,00 | 20 |
| TOTAL | 24 | 72,73 | 9 | 27,27 | 33 |

* Teste exato de Fisher: $p = 1,000$

Não houve efeito estatístico do uso do FM sobre a proporção de éguas com inflamação ($p = 0,119$), dilatação glandular ($p = 0,335$), ninho glandular ($p = 0,656$), dilatação linfática ($p=1,000$), atrofia ($p=0,622$) ou fibrose ($p=1,000$) (Figura 7 e Tabelas 9-14).

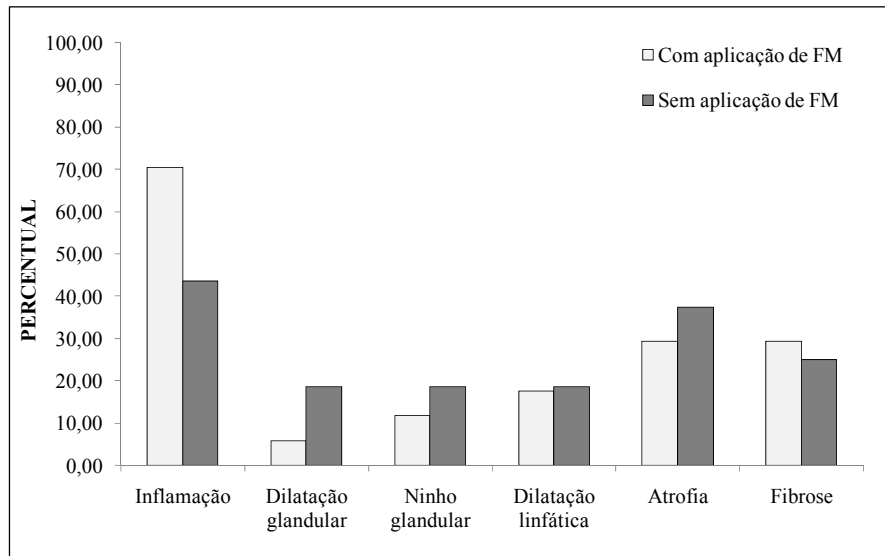


FIGURA 6 Efeito do uso do FM sobre a proporção de éguas com inflamação, dilatação glandular, ninho glandular, dilatação linfática, atrofia e fibrose do endométrio.

TABELA 9 Efeito do uso do FM* sobre a proporção de éguas com inflamação.

| Tratamento | Sem inflamação | Percentual sem inflamação | Com inflamação | Percentual com inflamação | TOTAL |
|------------|----------------|---------------------------|----------------|---------------------------|-------|
| Flunixin | 5 | 29,41 | 12 | 70,59 | 17 |
| Controle | 9 | 56,25 | 7 | 43,75 | 16 |
| TOTAL | 14 | 42,42 | 19 | 57,58 | 33 |

* Teste qui-quadrado: $p = 0,119$

TABELA 10 Efeito do uso do FM* sobre a proporção de éguas com dilatação glandular.

| Tratamento | Sem dilatação glandular | Percentual sem dilatação glandular | Com dilatação glandular | Percentual com dilatação glandular | TOTAL |
|------------|-------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|-------|
| Flunixin | 16 | 94,12 | 1 | 5,88 | 17 |
| Controle | 13 | 81,25 | 3 | 18,75 | 16 |
| TOTAL | 29 | 87,88 | 4 | 12,12 | 33 |

* Teste exato de Fisher: $p = 0,335$

TABELA 11 Efeito do uso do FM* sobre a proporção de éguas com ninho glandular.

| Tratamento | Sem ninho glandular | Percentual sem ninho glandular | Com ninho glandular | Percentual com ninho glandular | TOTAL |
|------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|-------|
| Flunixin | 15 | 88,24 | 2 | 11,76 | 17 |
| Controle | 13 | 81,25 | 3 | 18,75 | 16 |
| TOTAL | 28 | 84,85 | 5 | 15,15 | 33 |

* Teste exato de Fisher: $p = 0,656$

TABELA 12 Efeito do uso do FM* sobre a proporção de éguas com dilatação linfática.

| Tratamento | Sem dilatação linfática | Percentual sem dilatação linfática | Com dilatação linfática | Percentual com dilatação linfática | TOTAL |
|------------|-------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|-------|
| Flunixin | 14 | 82,35 | 3 | 17,65 | 17 |
| Controle | 13 | 81,25 | 3 | 18,75 | 16 |
| TOTAL | 27 | 81,82 | 6 | 18,18 | 33 |

* Teste exato de Fisher: $p = 1,000$

TABELA 13 Efeito do uso do FM* sobre a proporção de éguas com atrofia.

| Tratamento | Sem atrofia | Percentual sem atrofia | Com atrofia | Percentual com atrofia | TOTAL |
|------------|-------------|------------------------|-------------|------------------------|-------|
| Flunixin | 12 | 70,59 | 5 | 29,41 | 17 |
| Controle | 10 | 62,50 | 6 | 37,50 | 16 |
| TOTAL | 22 | 66,67 | 11 | 33,33 | 33 |

* Teste qui-quadrado: $p = 0,622$

TABELA 14 Efeito do uso do FM* sobre a proporção de éguas com fibrose.

| Tratamento | Sem fibrose | Percentual sem fibrose | Com fibrose | Percentual com fibrose | TOTAL |
|------------|-------------|------------------------|-------------|------------------------|-------|
| Flunixin | 12 | 70,59 | 5 | 29,41 | 17 |
| Controle | 12 | 75,00 | 4 | 25,00 | 16 |
| TOTAL | 24 | 72,73 | 9 | 27,27 | 33 |

* Teste exato de Fisher: $p = 1,000$

O quadro 1 ilustra a ocorrência detalhada e a distribuição das patologias uterinas em relação aos animais tratados ou não com FM.

No experimento 2, as 7 éguas do G 1 não foram manipuladas e não receberam injeção de FM. Neste grupo 2 éguas (28,57%) apresentaram processo inflamatório discreto do endométrio.

Das 9 éguas do G 2, 5 delas (55,5%) apresentaram processo inflamatório. Das 11 éguas do G 3 que foram submetidas à manipulação com aplicação de FM, 9 (81,8%) apresentaram inflamação endometrial.

Entre as 6 éguas do G 4, 3 (50%) demonstraram reação inflamatória.

As principais características morfológicas endometriais encontradas no exame histológico se relacionaram a inflamação, atrofia, fibrose, dilatação linfática, ninhos e dilatação glandular. Conforme observado no anexo 2, as alterações endometriais mais frequentes foram: infiltrado inflamatório do endométrio (57,57%), seguido por atrofia (33,33%), fibrose (27,27%).

As demais alterações, como, dilatação linfática, glandular e ninhos glandulares ocorreram com menor frequência

Cinco éguas apresentaram o endométrio completamente normal (anexo 2)

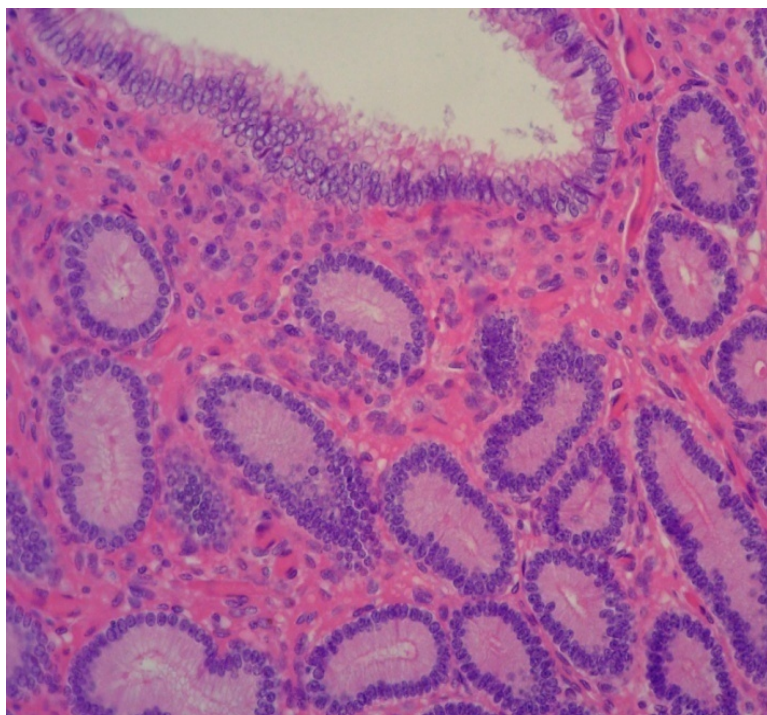


FIGURA 7 Imagem histológica do endométrio da égua 33 do experimento 2, corada pela hematoxilina e eosina, demonstrando endométrio normal.

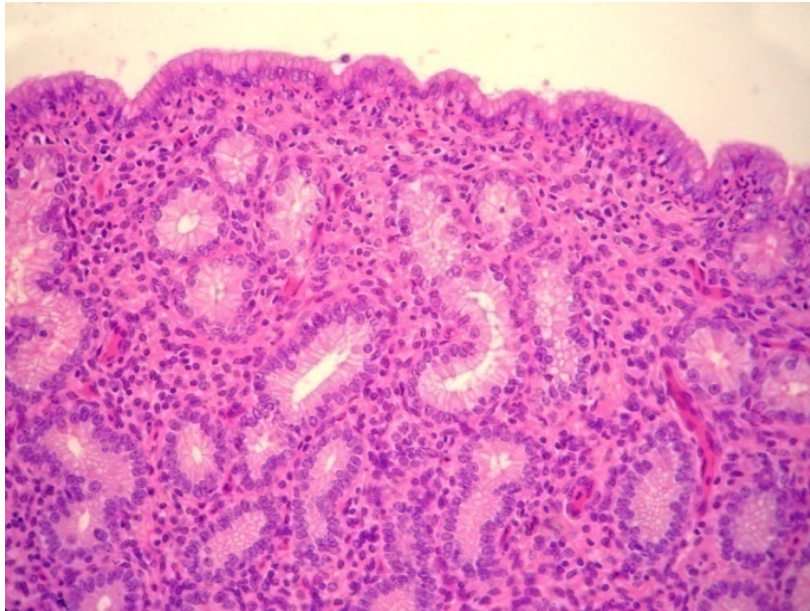


FIGURA 8 Imagem histológica do endométrio da égua 32 do experimento 2, corada pela hematoxilina e eosina, demonstrando infiltrado inflamatório.

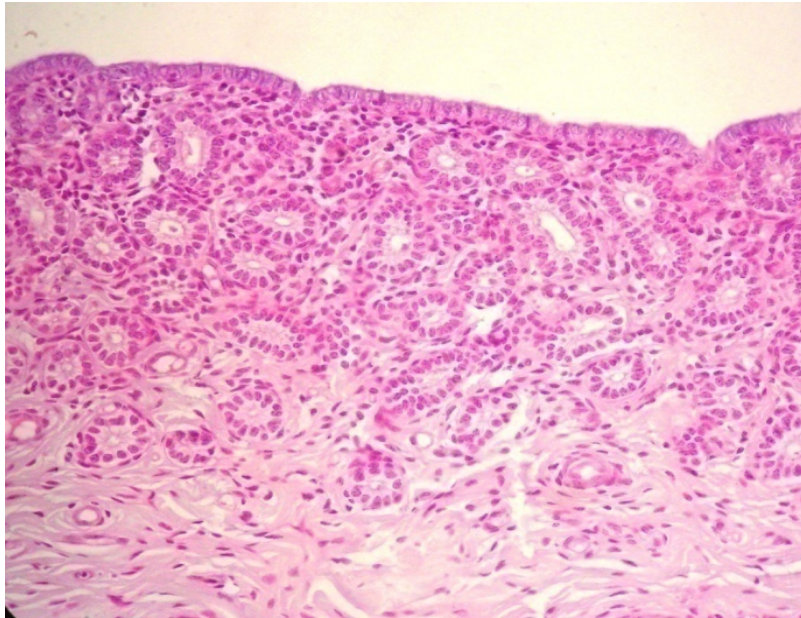


FIGURA 9 Imagem histológica do endométrio da égua 11 do experimento 2, corada pela hematoxilina e eosina, demonstrando atrofia endometrial.

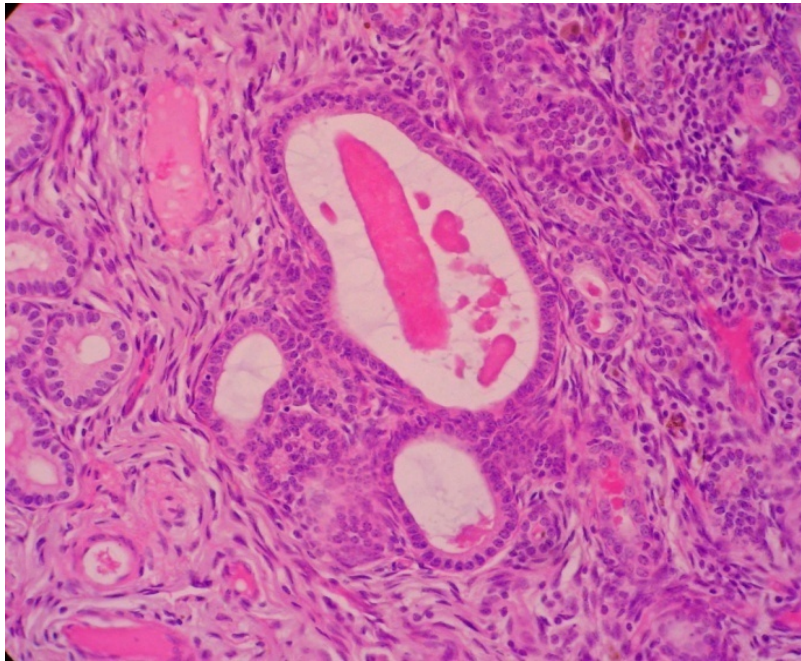


FIGURA 10 Imagem histológica do endométrio da égua 19 do experimento 2, corada pela hematoxilina e eosina, demonstrando ninhos glandulares, fibrose periglandular e infiltrado inflamatório.

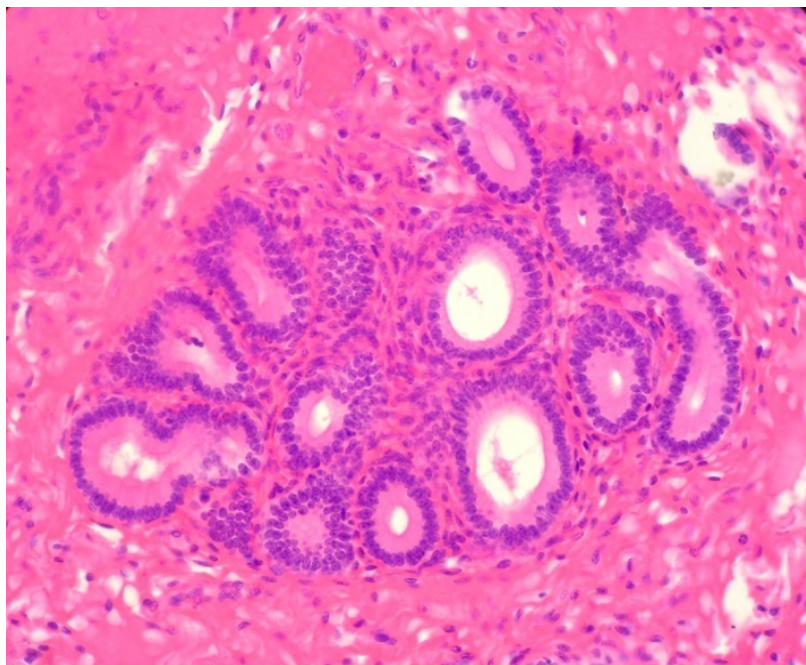


FIGURA 11 Imagem histológica do endométrio da égua 29 do experimento 2, corada pela hematoxilina e eosina, demonstrando ninhos glandulares e fibrose peringladular.

6.3 Resultados experimento 3

Quando observadas as 165 transferências em todos os haras, o uso de FM diminuiu a proporção de éguas gestantes ($p = 0,060$), assim como quando analisadas os resultados de cada haras D ($p = 0,068$), A e C ($p = 0,036$). No haras B não foi possível associar a aplicação ou não de FM porque todas as éguas do haras B receberam injeções de FM no momento da transferência (figura 12 e tabelas 15, 16, 17, 18 e 19)

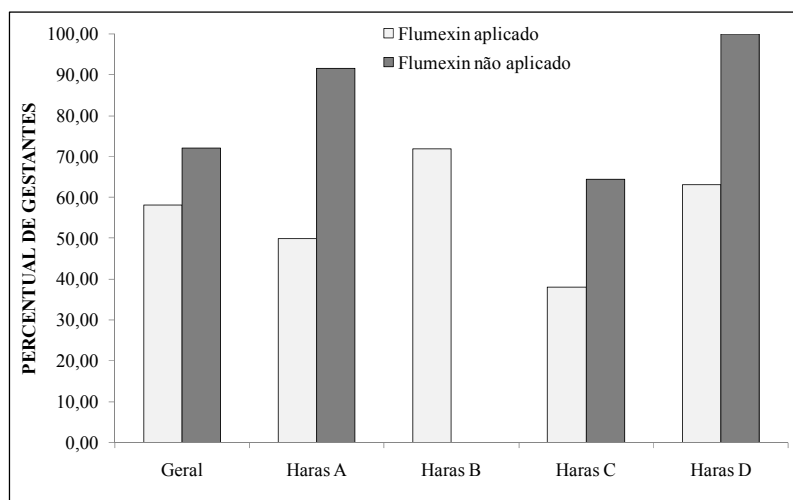


FIGURA 12 Efeito do uso do FM sobre a proporção de éguas gestantes.

*Todas as éguas do Haras B receberam FM

TABELA 15 Efeito do uso do FM* sobre a proporção de éguas gestantes em 4 haras da raça Mangalarga Marchador. Os dados foram analisados pelo teste do qui-quadrado, segundo o procedimento Proc Freq (SAS, 2004).

| Tratamento** | Vazias | Percentual de Vazias | Gestantes | Percentual de Gestantes | TOTAL |
|--------------|--------|----------------------|-----------|-------------------------|-------|
| Flunixin | 36 | 41,86 | 50 | 58,13 | 86 |
| Controle | 22 | 27,84 | 57 | 72,15 | 79 |
| TOTAL | 58 | 34,85 | 107 | 65,14 | 165 |

*FM= 1,1mg de flunixin meglumine

**P<0,0059

TABELA 16 Efeito do uso do FM* sobre a proporção de éguas gestantes no Haras A. Os dados foram analisados pelo teste do qui-quadrado, segundo o procedimento Proc Freq (SAS, 2004).

| Tratamento** | Vazias | Percentual de Vazias | Gestantes | Percentual de Gestantes | TOTAL |
|--------------|--------|----------------------|-----------|-------------------------|-------|
| Flunixin | 7 | 50,00 | 7 | 50,00 | 14 |
| Controle | 1 | 8,33 | 11 | 91,67 | 12 |
| TOTAL | 8 | 30,77 | 18 | 69,23 | 26 |

*FM=1,1mg de flunixin meglumine

** Teste exato de Fisher: p = 0,036

TABELA 17 Proporção de éguas gestantes recebendo FM* no Haras B.

| Uso de FM | Vazias | Percentual de Vazias | Gestantes | Percentual de Gestantes | TOTAL |
|-----------|--------|----------------------|-----------|-------------------------|-------|
| Flunixin | 9 | 28,13 | 23 | 71,88 | 32 |

*FM=1,1mg de flunixin meglumine

TABELA 18 Efeito do uso do FM* sobre a proporção de éguas gestantes no Haras C.

| Tratamento** | Vazias | Percentual de Vazias | Gestantes | Percentual de Gestantes | TOTAL |
|--------------|--------|----------------------|-----------|-------------------------|-------|
| Flunixin | 13 | 61,90 | 8 | 38,10 | 21 |
| Controle | 21 | 35,59 | 38 | 64,41 | 59 |
| TOTAL | 34 | 42,50 | 46 | 57,50 | 80 |

* FM=1,1mg de flunixin meglumine

**Teste qui-quadrado: p = 0,036

TABELA 19 Efeito do uso do FM* sobre a proporção de éguas gestantes no Haras D.

| Tratamento | Vazias | Percentual de Vazias | Gestantes | Percentual de Gestantes | TOTAL |
|------------|--------|----------------------|-----------|-------------------------|-------|
| Flunixin | 7 | 36,84 | 12 | 63,16 | 19 |
| Controle | 0 | 0,00 | 8 | 100,00 | 8 |
| TOTAL | 7 | 25,93 | 20 | 74,07 | 27 |

*FM=1,1mg de flunixin meglumine

** Teste exato de Fisher: p = 0,06

Quando observado o diâmetro do folículo pré ovulatório as taxas de gestação foram superiores para receptoras com folículos de diâmetro superior ou igual a 40 mm (tabela 20)

TABELA 20 Efeito da classe de diâmetro do folículo pré-ovulatório sobre a proporção de éguas gestantes. Os diâmetros foliculares foram agrupados e analisados pelo teste do qui-quadrado segundo o procedimento Proc Freq (SAS, 2004).

| Classe de Diâmetro Folicular* | Vazias | Percentual de Vazias | Gestantes | Percentual de Gestantes | TOTAL |
|-------------------------------|--------|----------------------|-----------|-------------------------|-------|
| < 40 mm | 31 | 31,96 | 66 | 68,04 | 97 |
| ≥ 40 mm | 10 | 14,71 | 58 | 85,29 | 68 |
| TOTAL | 41 | 24,85 | 124 | 75,15 | 165 |

*P<0,0116

Neste experimento não houve efeito do local nas taxas de gestação das éguas receptoras. (tabela 21)

TABELA 21 Efeito de haras sobre a proporção de éguas gestantes. Os dados foram agrupados e analisados pelo teste do qui-quadrado segundo o procedimento Proc Freq (SAS, 2004).

| Haras* | Éguas vazias | Percentual de éguas vazias | Éguas gestantes | Percentual de éguas gestantes | TOTAL |
|--------|--------------|----------------------------|-----------------|-------------------------------|-------|
| A | 8 | 30,77 | 18 | 69,23 | 26 |
| B | 9 | 28,13 | 23 | 71,88 | 32 |
| C | 24 | 30,00 | 56 | 70,00 | 80 |
| D | 7 | 25,92 | 20 | 74,00 | 27 |
| TOTAL | 48 | 28,7 | 117 | 71,27 | 165 |

*P<0,0132

A presença de potro ao pé teve um efeito favorável nas taxas de gestação das receptoras. (tabela 22)

TABELA 22 Efeito da presença do potro ao pé sobre a proporção de éguas gestantes. Os dados foram analisados pelo teste do qui-quadrado segundo o procedimento Proc Freq (SAS, 2004).

| Presença do Potro ao pé da Égua* | Vazias | Percentual de Vazias | Gestantes | Percentual de Gestantes | TOTAL |
|----------------------------------|--------|----------------------|-----------|-------------------------|-------|
| Potro Ausente | 36 | 27,69 | 94 | 72,31 | 130 |
| Potro Presente | 5 | 14,29 | 30 | 85,71 | 35 |
| TOTAL | 41 | 24,85 | 124 | 75,15 | 165 |

*P<0,1033

As receptoras que receberam hCG apresentaram melhores taxas de gestação quando comparadas as receptoras que não receberam este hormônio. (tabela 23)

TABELA 23 Efeito do uso da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) sobre a proporção de éguas gestantes. Os dados foram analisados pelo teste do qui-quadrado, segundo o procedimento Proc Freq (SAS, 2004).

| Uso de hCG* | Vazias | Percentual de Vazias | Gestantes | Percentual de Gestantes | TOTAL |
|------------------|--------|----------------------|-----------|-------------------------|-------|
| hCG aplicado | 4 | 11,76 | 30 | 88,24 | 131 |
| hCG não aplicado | 37 | 11,76 | 94 | 71,76 | 34 |
| TOTAL | 41 | 24,85 | 124 | 75,15 | 165 |

P<0,476

Em relação ao exame do trato reprodutivo através da palpação e da ultrassonografia as receptoras classificadas como boas e médias obtiveram taxas de gestação similares. Quando o trato genital era classificado como ruim não ocorreu nenhuma gestação aos 60 dias. (tabela 24)

TABELA 24 Efeito da classificação do status do trato genital da égua receptora sobre a proporção de éguas gestantes. A imagem do trato reprodutivo ao ultrassom foi classificada em boa, média e ruim. Os dados foram analisados pelo teste do qui-quadrado, segundo o procedimento Proc Freq (SAS, 2004).

| Classificação do trato genital da égua receptora* | Éguas vazias | Percentual de éguas vazias | Éguas gestantes | Percentual de éguas gestantes | TOTAL |
|---|--------------|----------------------------|-----------------|-------------------------------|-------|
| Boa | 27 | 21,09 | 101 | 71,88 | 128 |
| Média | 9 | 28,13 | 23 | 71,88 | 32 |
| Ruim | 5 | 100,0 | 0 | 0,00 | 5 |
| TOTAL | 41 | 24,85 | 124 | 75,15 | 165 |

*P<0

O uso da progesterona não incrementou as taxas de gestação neste experimento. (Tabela 25)

TABELA 25 Efeito do uso da progesterona* sobre a proporção de éguas gestantes. Os dados foram analisados pelo teste do qui-quadrado, segundo o procedimento Proc Freq (SAS, 2004).

| Uso de progesterona* | Vazias | Percentual de Vazias | Gestantes | Percentual de Gestantes | TOTAL |
|----------------------|--------|----------------------|-----------|-------------------------|-------|
| Controle | 17 | 19,10 | 72 | 80,90 | 89 |
| Progesterona | 24 | 31,58 | 52 | 68,42 | 76 |
| TOTAL | 41 | 24,85 | 124 | 75,15 | 165 |

* P<0,0645

Quando analisadas as 165 transferências, não houve efeito da duração do estro na proporção de éguas gestantes ($p = 0,534$), assim como quando analisadas as éguas dos haras A, B e D separadamente. No entanto, para as éguas do haras C a chance de gestação na égua diminuiu com o aumento da duração do estro ($p = 0,015$)

TABELA 26 Efeito da duração do estro (em dias)* sobre a proporção de éguas gestantes (regressão logística).

| Duração do estro | Vazias** | Percentual de Vazias | Gestantes*** | Percentual de Gestantes | TOTAL |
|------------------|----------|----------------------|--------------|-------------------------|-------|
| 1 dia | 6 | 20,69 | 23 | 79,31 | 29 |
| 2 dias | 27 | 52,94 | 24 | 47,06 | 51 |
| 3 dias | 8 | 25,81 | 23 | 74,19 | 31 |
| 4 dias | 7 | 41,18 | 10 | 58,82 | 17 |
| 5 dias | 3 | 21,43 | 11 | 78,57 | 14 |
| 6 dias | 5 | 27,78 | 13 | 72,22 | 18 |
| 7 dias | 2 | 40,00 | 3 | 60,00 | 5 |
| TOTAL | 58 | 35,15 | 107 | 64,85 | 165 |

* $p = 0,534$

** Média \pm desvio-padrão: $2,94 \pm 1,61$

*** Média \pm desvio-padrão: $3,12 \pm 1,77$

TABELA 27 Efeito da duração do estro (em dias)* sobre a proporção de éguas gestantes – Haras A (regressão logística).

| Duração do estro | Vazias** | Percentual de Vazias | Gestantes*** | Percentual de Gestantes | TOTAL |
|------------------|----------|----------------------|--------------|-------------------------|-------|
| 1 dia | 0 | - | 0 | - | 0 |
| 2 dias | 0 | 0,00 | 2 | 100,00 | 2 |
| 3 dias | 0 | 0,00 | 3 | 100,00 | 3 |
| 4 dias | 5 | 50,00 | 5 | 50,00 | 10 |
| 5 dias | 2 | 33,33 | 4 | 66,67 | 6 |
| 6 dias | 1 | 20,00 | 4 | 80,00 | 5 |
| 7 dias | 0 | - | 0 | - | 0 |
| TOTAL | 8 | 30,77 | 18 | 69,23 | 26 |

* $p = 0,717$

** Média \pm desvio-padrão: $4,50 \pm 0,76$

*** Média \pm desvio-padrão: $4,28 \pm 1,32$

TABELA 28 Efeito da duração do estro (em dias)* sobre a proporção de éguas gestantes – Haras B (regressão logística).

| Duração do estro | Vazias** | Percentual de Vazias | Gestantes*** | Percentual de Gestantes | TOTAL |
|------------------|----------|----------------------|--------------|-------------------------|-------|
| 1 dia | 0 | - | 0 | - | 0 |
| 2 dias | 0 | 0,00 | 1 | 100,00 | 1 |
| 3 dias | 7 | 29,17 | 17 | 70,83 | 24 |
| 4 dias | 2 | 40,00 | 3 | 60,00 | 5 |
| 5 dias | 0 | 0,00 | 2 | 100,00 | 2 |
| 6 dias | 0 | - | 0 | - | 0 |
| 7 dias | 0 | - | 0 | - | 0 |
| TOTAL | 9 | 28,13 | 23 | 71,88 | 32 |

* $p = 0,873$

** Média \pm desvio-padrão: $3,22 \pm 0,44$

*** Média \pm desvio-padrão: $3,26 \pm 0,69$

TABELA 29 Efeito da duração do estro (em dias)* sobre a proporção de éguas gestantes – Haras C (regressão logística).

| Duração do estro | Vazias** | Percentual de Vazias | Gestantes*** | Percentual de Gestantes | TOTAL |
|------------------|----------|----------------------|--------------|-------------------------|-------|
| 1 dia | 6 | 20,69 | 23 | 79,31 | 29 |
| 2 dias | 27 | 56,25 | 21 | 43,75 | 48 |
| 3 dias | 1 | 33,33 | 2 | 66,67 | 3 |
| 4 dias | 0 | - | 0 | - | 0 |
| 5 dias | 0 | - | 0 | - | 0 |
| 6 dias | 0 | - | 0 | - | 0 |
| 7 dias | 0 | - | 0 | - | 0 |
| TOTAL | 34 | 42,50 | 46 | 57,50 | 80 |

* $p = 0,015$

** Média \pm desvio-padrão: $1,85 \pm 0,44$

*** Média \pm desvio-padrão: $1,54 \pm 0,59$

TABELA 30 Efeito da duração do estro (em dias)* sobre a proporção de éguas gestantes – Haras D (regressão logística).

| Duração do estro | Vazias** | Percentual de Vazias | Gestantes*** | Percentual de Gestantes | TOTAL |
|------------------|----------|----------------------|--------------|-------------------------|-------|
| 1 dia | 0 | - | 0 | - | 0 |
| 2 dias | 0 | - | 0 | - | 0 |
| 3 dias | 0 | 0,00 | 1 | 100,00 | 1 |
| 4 dias | 0 | 0,00 | 2 | 100,00 | 2 |
| 5 dias | 1 | 16,67 | 5 | 83,33 | 6 |
| 6 dias | 4 | 30,77 | 9 | 69,23 | 13 |
| 7 dias | 2 | 40,00 | 3 | 60,00 | 5 |
| TOTAL | 7 | 25,93 | 20 | 74,07 | 27 |

* $p = 0,183$

** Média \pm desvio-padrão: $6,14 \pm 0,69$

*** Média \pm desvio-padrão: $5,55 \pm 1,05$

8 DISCUSSÃO

A literatura é bastante contraditória em relação ao efeito da manipulação do trato genital na secreção de $\text{PGF2}\alpha$ em éguas. Kask et al. (1995) através de um estudo evidenciaram secreção de $\text{PGF2}\alpha$ de 2 em 4 éguas relacionada a transferência de embrião. Sirois et al. (1987) trabalhando com 13 éguas não encontraram aumento das concentrações de PGFM após transferência de embrião não cirúrgica no 6º dia pós ovulação. Entretanto, foram coletadas somente uma amostra de sangue antes da transferência e outra, 2 minutos após o procedimento. Bowen, (1990) não observaram qualquer alteração na média de duração do cio e concluíram que se ocorre liberação de $\text{PGF2}\alpha$, esta é insuficiente para induzir luteólise. Diversos autores têm relatado que a manipulação dos órgãos reprodutivos, como dilatação cervical, palpação do útero ou lavagem e infusão uterina com substâncias diversas, pode induzir e estimular a liberação de $\text{PGF2}\alpha$ (Hurtgen & Ganjam, 1979; Betteridge et al., 1985; Pascoe et al., 1989). Todas as quatro éguas da réplica 1 do experimento 1 foram submetidas à manipulação cervical e infusão de meio de conservação de embrião no útero. No entanto, somente a égua C1 ou controle apresentou concentrações elevadas de PS. As éguas 61 e 31 receberam injeções de FM 6 e 3 horas antes da manipulação. A égua 01 foi medicada com FM no momento da manipulação cervical e a égua C1 recebeu uma injeção de NaCl 0,9% no mesmo momento da égua 01. O efeito do FM e de outros antiinflamatórios não esteroidais na inibição da produção de $\text{PGF2}\alpha$ endometrial também é bastante contraditório na literatura científica. Berglund et al. (1982) concluíram que a manipulação cervical aumenta a concentração de prostaglandinas e que o FM foi capaz de inibir este aumento. Semrad et al. (1985) administraram pequenas doses de FM e não observaram alteração na produção de PGFM. Wilde et al.

(1989) avaliaram a eficiência do FM em inibir a produção de PGFM e concluíram que a administração de FM deprimiu as concentrações plasmáticas de PGFM. Em ruminantes domésticos, inclusive lhamas, o uso de FM, aparentemente, tem relação com menores concentrações de PGFM e melhores taxas de prenhez (Aba et al., 2000; Purcell et al., 2005). Neste estudo o FM utilizado na égua 31, três horas antes da transferência transcervical, não impediu a elevação das concentrações de PGFM. Apesar de este animal apresentar comportamento mais inquieto, dificultando o procedimento com maior nível de stress e se encontrar no 8º dia pós- ovulação isto não justifica as concentrações mais altas de PS quando comparadas com os resultados das éguas 61 e 01 que também receberam FM. Em contraste com outros trabalhos, nos quais geralmente as injeções de FM eram realizadas após a manipulação, neste estudo o FM foi aplicado as 6 e 3 horas antes do procedimento de manipulação cervical, com a intenção de verificar variações do período da aplicação na inibição de PGF2 α . O maior número de amostras foi coletado para avaliação das concentrações de PGFM em um período mais prolongado. A observação de concentrações médias inferiores de PGFM nas éguas 61 e 01, comparadas às da égua C1, sugerem o efeito inibitório na produção de PGFM associado ao FM. Por outro lado, as altas concentrações de PGFM da égua 31 permanecem injustificadas. Não foi possível obter normalidade dos dados desse animal, através das transformações estatísticas disponíveis, tendo sido, então, descartados para efeitos de comparações com os demais tratamentos.

Na réplica 2 do experimento 1, todas as éguas foram submetidas à passagem transcervical com pipeta de inseminação em éguas e deposição de 0,5 ml do meio embrionário Han-Fan 10 no interior do útero. Neste grupo foram observadas menores variações das concentrações de PGFM nas cinco éguas estudadas. Houve diferenças nas concentrações de PGFM entre os momentos de aplicação; principalmente entre as éguas 3 e 4 ($p=0,004$) e entre as éguas 3 e 5

($p=0,012$) quando realizada a comparação múltipla. Se comparadas as duas réplicas do experimento 1 observa-se que as éguas da segunda réplica responderam à passagem transcervical com menor intensidade de produção de PGFM. Entretanto, podemos concluir que houve influência do FM na concentração da PGFM. Quando comparadas as éguas que receberam FM com as que não receberam, as concentrações de PGFM foram $172,49 \pm 63,15$ e de $240,04 \pm 37,65$, respectivamente.

No experimento 1 foi utilizado 2 grupos diferentes de égua em condições de campo. A réplica 1 ($n=4$) era composto de éguas que nunca foram submetidas a procedimentos de manejo e controle reprodutivo. Adicionalmente este grupo de éguas foi submetido a uma manipulação cervical mais agressiva. Na réplica 2 ($n=5$) as éguas utilizadas eram receptoras em período de programa reprodutivo e habituadas a rotina de exames ginecológicos frequentes. Nesta réplica 2 o procedimento na área cervical se restringiu a passagem transcervical de pipeta e manipulação do cervix menos agressiva. Em todas estas cinco éguas este procedimento foi considerado tecnicamente fácil, não exigindo muita manipulação. Esta diferença dos procedimentos pode estar associado a resposta nas concentrações de PGFM, ou seja, os animais mais estressados com manipulação mais intensa produzem mais $PGF2\alpha$ através destes estímulos. Entretanto nosso experimento não pode comprovar esta hipótese. Kask et al. (1997) observaram em um estudo que a maior parte das éguas que os procedimentos de transferência de embriões foram considerados difíceis de realizar, demonstraram aumento significativo dos níveis de PGFM.

Provavelmente um maior número de éguas poderia oferecer uma análise mais representativa e consistente.

No experimento 2 procuramos relacionar manipulação cervical com processo inflamatório do endométrio em 4 grupos de éguas com protocolos diferentes. Os grupos 3 e 4 receberam injeção de FM para avaliar o efeito

inibitório desta droga na endometrite. Papa et al. (1978) observaram que 100% das éguas com histórico de subfertilidade apresentaram evidências histopatológicas endometriais. Já Ricketts (1975b) encontrou alterações em 93,3% das éguas e Ricketts (1975a) e Doig et al. (1981) em 90%. Assim, pressupõe-se a importância do endométrio estar isento de anormalidade para a manutenção da gestação (Kenney, 1978). No estudo de Doig et al. (1981) 51% das éguas inférteis apresentaram endometrite aguda ou crônica. A fibrose endometrial foi encontrada em 88% das éguas. O autor sugere que a frequência de fibrose endometrial aumenta gradualmente com a idade das éguas. No experimento 2, o histórico reprodutivo das éguas não era conhecido, mas a grande frequência (14 em 20) de processos inflamatórios do endométrio dos grupos 2 e 3, submetidos a manipulação, sugere que este procedimento pode estar também associado a endometrite ($p = 0,073$). A grande maioria das éguas foi manipulada 35 a 50 minutos antes do abate e da coleta do fragmento uterino. Somente as éguas 27, 29, 30, 31, 32 e 33 (N=6) foram manipuladas no dia anterior ao abate e coleta de material para exame histológico. Se estas reações inflamatórias do endométrio na maioria das éguas estiverem relacionadas a manipulação transcervical, a resposta endometrial ocorreu rapidamente após o estímulo. Koblishike et al. (2008) concluíram que mesmo sem contaminação bacteriana, transferência de embrião pode induzir uma resposta do número de polimorfonucleados no sítio inflamatório por até 4 dias. Adicionalmente esta resposta inflamatória pode estar associada com o aumento das concentrações de PGF₂ α . No experimento 2 não foram medidas as concentrações de PGFM, para investigar esta associação. Como estas éguas não estavam sendo acompanhadas até o experimento, existe a possibilidade de que as reações inflamatórias do endométrio já estivessem presentes com característica crônica e não tenham associação com o estímulo da manipulação durante o estudo. Como a primeira parte do experimento 2 foi realizada no início de setembro, o grande número de

éguas com atrofia do endométrio pode estar relacionado ao período de transição reprodutiva estacional que ocorre durante este período em nossa região. Neste período as éguas ainda não apresentam atividade reprodutiva cíclica. A alta frequência de fibrose endometrial provavelmente é um achado comum em abatedouros, que recebem grande número de éguas velhas.

A alta frequência de processos inflamatórios endometriais do grupo 3 (81,81%as), no experimento 2, que foi submetido a manipulação associada a aplicação de FM, sugere que esta droga antiinflamatória utilizada não foi eficiente em regredir o processo inflamatório neste grupo. Estes achados são conflitantes com os resultados de Koblishike et al. (2008) que concluíram que ácido meclofenâmico e FM inibiram o processo inflamatório endometrial sem efeitos negativos para o endométrio. Entretanto estes autores também concluíram em seu estudo que as concentrações de PGFM no plasma das éguas avaliadas eram significativamente mais baixas nos animais tratados com ácido meclofenâmico quando comparados com o grupo que recebeu FM ou salina. Aparentemente o ácido meclofenâmico foi mais eficiente na inibição de $PGF2\alpha$ que o FM, sendo mais recomendável para éguas receptoras de embrião.(Koblishike et al., 2008).

Existem evidências que células de mamíferos contem isoenzimas PGH sintase denominadas PGH sintases 1 e 2 (PGHs-1 e PGHs-2). As duas isoformas tem a mesma afinidade por ácido araquidônico e a mesma capacidade de converter ácido araquidônico para PGH. A diferença entre elas envolve regulação e expressão. A PGHs-1 é constitutiva, presente em muitos tecidos e sua atividade geralmente se mantém constante. Em contraste, PGHs2 não é detectável em muitos tecidos sob condições fisiológicas, mas sua expressão pode ser aumentada durante inflamação ou estímulos diversos (Meade et al., 1993; Dewitt et al., 1991). Estudos farmacológicos indicam que as duas isoenzimas tem sensibilidade farmacológica diferente (Meade et al., 1993). Já que isoformas

de PGH sintase não foram completamente identificadas no útero de éguas, provavelmente isto deve estar relacionado a diferença na resposta farmacológica a drogas antiinflamatórias e pode explicar a ausência de padrão de resposta do FM neste grupo de éguas.

O uso de anti-inflamatórios não esteroidais para aumentar as taxas de prenhez de receptoras de embrião tem sido investigado, e o FM é atualmente o antiinflamatório mais utilizado para este fim, provavelmente em razão do seu efeito antiendotóxico adicional (Jackman et al., 1994). Profissionais de campo utilizam este produto no momento da transferência de embrião em éguas que sofrem exagerada manipulação cervical ou são submetidas a fatores de stress e processos infecciosos. Estas ocorrências podem estimular a produção de PGS. Acredita-se que o uso de antiinflamatórios não esteróides pode inibir a liberação de PGF2 α .

Daels et al. (1995) em um estudo sobre efeito do FM na secreção de PGS induzidas por endotoxinas no início da gestação em éguas, concluíram que a ação inibitória de liberação das PGS pelo FM é rápida, podendo ocorrer em menos que 30 minutos. Giri et al. (1991) concluiu em um experimento que o uso de FM deve ser uma terapia promissora para diminuir as perdas gestacionais iniciais das vacas portadoras de infecção bacteriana uterina. Purcell et al. (2005) encontrou evidências que o uso de FM no momento da transferência de embrião melhorou as taxas de prenhez em gado de corte. Adicionalmente, eles relataram que estes resultados também foram influenciados pelo local do experimento. Diferente destes pesquisadores, neste experimento foi observado efeito deletério do uso de FM no momento da transferência de embrião nas éguas receptoras estudadas. O percentual de éguas gestantes foi inferior nos animais que receberam FM após os procedimentos de transferência, quando considerados os quatro haras estudados. Esta relação é evidente principalmente no haras A, sendo a maior proporção de éguas gestantes encontrada no grupo sem aplicação

do FM ($p = 0,036$) e no haras C com maior proporção de gestantes no grupo sem aplicação de FM ($p = 0,036$). O FM foi aplicado na dosagem terapêutica e via recomendada (Toutaim et al., 1994) logo após a transferência de embrião quando já tinha sido escolhida a receptora apta a receber o embrião. Existem evidências que o efeito do FM ocorre antes de trinta minutos após a injeção endovenosa (Daels et al., 1991a) o que pode garantir a ação desejada do medicamento de maneira rápida. Koblischike et al. (2008) concluíram que transferência de embrião induz uma resposta inflamatória subclínica do endométrio associada com um aumento de proteínas Cox-2 e liberação de $PGF2\alpha$ em éguas não tratadas. Esta resposta é independente da contaminação bacteriana do endométrio mas é associada com regressão prematura do corpo lúteo em 1/3 das éguas não tratadas. Tratamento com ácido meclofenâmico ou FM inibe esta resposta sem efeitos negativos no endométrio. Mas os autores alertaram que PGE produzida pelo concepto, além do efeito inflamatório, está envolvida com reconhecimento materno porque estimula mobilidade intrauterina do concepto equino (Ginther, 1983,1985a; Stout & Allen, 2001,2002). Tratamento de éguas com FM inibe liberação de PGE durante esta fase e bloqueia a mobilidade embrionária podendo inibir o reconhecimento materno de gestação (Mc Dowell et al., 1988). A redução das taxas de prenhez nas éguas receptoras tratadas com FM em nosso estudo pode estar relacionada a estes mecanismos, embora isto não possa ser comprovado neste experimento.

Segundo Koblischike et al. (2008) o ácido meclofenâmico interfere menos que o FM na síntese de PGE e conseqüentemente na mobilidade embrionária. Tratamento das receptoras com este antiinflamatório deve ser considerado.

Purcell et al. (2005) utilizaram FM no momento da transferência do embrião em bovinos de corte. Os autores relataram aumento das taxas de prenhez nos animais tratados, mas observaram uma relação importante destes

resultados com o local do experimento. Em nosso estudo não houve associação do local (haras) com aumento do percentual de prenhez das receptoras investigadas (tabela 3).

A utilização de progesterona em quase todas as receptoras do haras C, não demonstrou eficiência na melhora das taxas de prenhez deste haras (tabela 7). Kask et al. (1997) em um estudo após transferência de embrião obtiveram 3 padrões distintos de liberação de $\text{PGF2}\alpha$ e a concentração ou declínio de progesterona não foram correspondentes com estes padrões de $\text{PGF2}\alpha$. Alguns pesquisadores relacionam dilatação cervical com redução na secreção de progesterona, associada a liberação de $\text{PGF2}\alpha$, e recomendam a utilização de progesterona para incrementar as taxas de prenhez (Daels et al., 1987; Daels et al., 1989; Handler et al., 2003). Em nosso experimento os resultados do uso de progesterona exógena sugerem que este procedimento não determina a garantia de uma gestação bem sucedida. Provavelmente diversos outros fatores contribuem para a sobrevivência do embrião. Alguns estudos sugerem que dilatação cervical está associada a baixas concentrações de progesterona plasmática e que o FM influencia a produção de progesterona. O tecido do corpo lúteo possui a habilidade de sintetizar produtos pela via da ciclooxigenase, sendo assim, existe a possibilidade do FM afetar a síntese de prostaglandinas pelo corpo lúteo (Milvae et al., 1983). Prostaglandina I₂ causa um aumento dose-dependente na síntese de progesterona em células luteais de bovino in vivo (Milvae et al., 1980), consequentemente a inibição da via ciclooxigenase pode ter interferido na síntese de prostaglandinas luteotróficas (PGI₂ e PGE₂), com declínio na produção de progesterona luteal. Entretanto, o haras C no qual foi utilizada frequentemente a progesterona exógena não foram observado índices de gestação superiores, comparado com os demais.

Em nosso estudo, as receptoras com potro ao pé foram mais bem sucedidas na manutenção da gestação quando comparadas ao outro grupo de

éguas que não desenvolveram gestação na estação reprodutiva anterior. Provavelmente algumas destas receptoras não foram utilizadas na estação anterior, mas é possível que grande parte destas éguas falharam na manutenção do embrião transferido, em algum momento da gestação, demonstrando subfertilidade. Isto pode justificar as menores taxas de prenhez das receptoras sem potro ao pé. Sendo assim, éguas com histórico recente de gestação bem sucedida (potro ao pé) pode qualificar o animal como desejável para transferência de embrião, mas é evidente que outros fatores devem ser considerados.

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é bastante utilizada como medicamento hormonal para estimular a ovulação e assim maximizar a fertilidade nas inseminações programadas. Perla et al. (2007) estudaram o uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG), visando melhorar as características reprodutivas em receptoras. Aqueles autores observaram que a aplicação de hCG em éguas receptoras, tanto para indução de ovulação, como no dia seguinte da ovulação (d1), ou ainda no dia da transferência (d5 a d8), promoveu o aumento na concentração plasmática de progesterona, e uma tendência a melhores taxas de prenhez. Em conformidade com estas observações, o uso de hCG neste estudo demonstrou efeito benéfico considerando as melhores taxas de prenhez das éguas tratadas.

As éguas receptoras qualificadas como boas e médias apresentaram taxas de prenhez semelhantes após a transferência. Estes resultados são semelhantes às observações de Carnevale et al. (2000), em que melhores taxas de prenhez foram observadas em éguas qualificadas como aceitáveis. Os autores priorizaram a presença de tônus uterino na qualificação destas éguas. A avaliação de receptoras no momento da transferência parece ser um fator fundamental para se obter uma gestação bem sucedida.

Somente no haras C, foi observado efeito da duração do estro sobre a proporção de éguas gestantes, provavelmente porque a quase totalidade das éguas eram receptoras anovulatórias sob suplementação de progesterona exógena. O período de estro considerado compreendeu os dois dias de suplementação estrogênica inicial, o que justifica os períodos mais curtos de estros observados, em relação a literatura (Mc Kinnon & Voss, 1993).

CONCLUSÃO

Ficou demonstrado que os procedimentos de manipulação cervical ou passagem de pipeta transcervical estão associados a produção de PGFM. A manipulação cervical aparentemente oferece maior estímulo a liberação de PGFM.

A aplicação de FM influenciou os valores de PGFM, pois as éguas que receberam o medicamento apresentaram valores médios de concentração de PGFM menores.

Foi possível associar manipulação cervical com endometrite, não havendo, contudo, a inibição de inflamação do endométrio pelo FM.

A utilização do FM em éguas receptoras no momento da transferência de embrião está associada a menores taxas de gestação.

Folículos pré ovulatórios com maior diâmetro estão associados a melhores taxas de gestação das receptoras.

Não foi observado efeito do local nas taxas de gestação.

A presença de potro ao pé esteve associado a melhores taxas de gestação.

Receptoras medicadas com hCG apresentaram melhores taxas de gestação.

O uso da progesterona não incrementou as taxas de gestação neste experimento.

Quando analisadas as 165 transferências não houve efeito da duração do estro na proporção de éguas gestantes.

Quando submetidas a avaliação do trato genital as receptoras classificadas como boas e médias apresentaram taxas de gestação semelhantes. Receptoras classificadas como ruins não apresentaram gestação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABA, M. A.; KINDAHL, H.; FORSBERG, M.; QUIROGA, M.; AUZA, N. Levels of progesterone and changes in prostaglandin F2 α release during luteolysis and early pregnancy in llhamas and the effect of treatment with FM. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 59, n. 1/2, p. 87-97, Apr. 2000.

ADAMS, G. P.; KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Effect of uterine inflammation and ultrasonically detected uterine pathology on fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 35, p. 445-454, 1987. Supplement.

ALLEN, W. R.; COOPER, M. J. The use of synthetic analogues of prostaglandins for inducing luteolysis in mares. **Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique**, Paris, v. 15, n. 1, p. 461-469, Jan. 1975.

ALLEN, W. R.; ROWSON, L. E. A. Control of the mare's oestrus cycle by prostaglandins. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 33, n. 3, p. 539-543, June 1973.

ALLEN, W. R.; STEWART, F.; COOPER, M. J.; CROW-HURST, R. C. Further studies on the use of synthetic prostaglandin analogues for inducing luteolysis in mares. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 6, n. 1, p. 31-35, Nov. 1974.

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

BALL, B. A.; LITTLE, T. V.; WEBER, J. A.; WOODS, G. L. Viability of day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 85, n. 1, p. 187-194, Jan. 1989.

BALL, B. A.; SHIN, S. J.; PATTEN, V. H.; GARCIA, M. C.; WOODS, G. L. Embryonic loss in pony mares induced by intrauterine inoculation of candida parapsilosis. **Theriogenology**, Stoneham, v. 29, n.4,p.835-848, Apr.1988.

BAZER, F. W.; VALLET, J. P.; HARNEY, J. P.; GROSS, T. S.; THATCHER, W. W. Comparative aspects of maternal recognition of pregnancy between sheep and pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 37, n. 1, p. 85-89, Jan. 1989. Supplement.

BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine follicular fluid in the mare. **Theriogenology**, Stoneham, v. 24, n. 1, p. 99-108, July 1985.

BERGLUND, L. E.; SHARP, D. C.; VERNON, M. W.; THATCHER, W. W. Effect of pregnancy status and collection technique on prostaglandin F in the uterine lumen of pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 32, p. 335-341, 1982. Supplement.

BETTERIDGE, K. J.; EAGLESOME, M. D.; FLOOD, P. F. Embryo transport through the mare's oviduct depends on cleavage and is independent of the ipsilateral corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 27, p. 387-394, 1979. Supplement.

BETTERIDGE, K. J.; RENARD, A.; GOFF, A. K. Uterine prostaglandin release relative to embryo collection, transfer procedures and maintenance of the corpus luteum. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 3, p. 25-33, 1985. Supplement.

BOUSQUET, D.; GUILLOMOT, M.; BETTERIDGE, K. J. Equine zona pellucida capsule: some physicochemical and antigenic properties. **Gamete Research**, v. 16, n. 2, p. 121-132, Mar. 1987.

BOWEN, E. L. Breeding records. **The Blood Horse**, Lexington, v. 774, p. 41-43, 1990.

BRAND, A.; DROST, M.; AARTS, M. H.; GUNNINK, J. W. A device for nonsurgical transfer of bovine embryos and its effect on uterine contamination. **Theriogenology**, Stoneham, v. 6, n. 5, p. 509-514, Nov. 1976.

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

CAIADO, J. R. C.; FONSECA, F. A.; SILVA, J. F. S. Aplicação de Flunixin meglumine antes da transferência não cirúrgica de embriões em éguas da raça mangalarga marchador. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Niterói, v. 12, n. 1/3, p. 11-15, jan./dez. 2005.

COAKLEY, M. B. A.; PECK, K. E.; TAYLOR, T. S.; MATTHEWS, N. S.; MEALEY, K. L. Pharmacokinetics of FM in donkeys, mules, and horses. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 60, n. 11, p. 1441-1444, 1999.

COOKE, R. G.; HOMEIDA, A. M. Prevention of the luteolytic action of oxytocin in the goat by inhibition of prostaglandin synthesis. **Theriogenology**, Stoneham, v. 20, n. 3, p. 363-365, Sept. 1983.

DAELS, P. F.; AMMON, D. C.; STABENFELDT, G. T.; LIU, I. K. M.; HUGHES, J. P.; LASLEY, B. L. Urinary and plasma estrogen conjugates, estradiol and estrone concentrations in non-pregnant and early pregnant mares. **Theriogenology**, Stoneham, v. 35, n. 5, p. 1001-1017, May 1991a.

DAELS, P. F.; MOHAMMEND, H. O.; ODENSVICK, K. Effect of FM on endogenous prostaglandin F₂ α secretion during cloprostenol induced abortion in mares. **American Journal Veterinary Resident**, Chicago, 56, n. 12, p. 1603-1610, Dec. 1995.

DAELS, P. F.; STABENFELDT, G. H.; HUGHES, J. P.; ODENSVIK, K.; KINDAHL, H. Effects of FM on endotoxin-induced prostaglandin F₂ α secretion during early pregnancy in mares. **American Journal Veterinary Resident**, v. 52, n.1, p. 276-281, Aug. 1991b.

DAELS, P. F.; STABENFELDET, G. H.; KINDAHL, H.; HUGHES, J. P. Prostaglandin release and luteolysis associated with physiological and pathological conditions of the reproductive cycle of the mare: a review. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 8, p. 29-34, 1989. Supplement.

DAELS, P. F.; STARR, M.; KINDAHL, H.; FREDRIKSSON, G.; HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H. Effect of salmonella typhimurium endotoxin on prostaglandin release and early fetal death in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 35, p. 485-492, 1987. Supplement.

DARENIUS, K.; FREDRIKSSON, G.; KINDAHL, H. Allye trenbolone and FM treatment of mares with repeated embryonic loss. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge v. 8, p. 35-39, 1989. Supplement.

DEWITT, D. L.; KRAEMER, S. A.; MEADE, E. A. Serum induction and superincudtion of PGH synthase mRNA levels in 3T3 fibroblast. In: SAMUELSSON, B. (Ed.). **Prostaglandins and related compounds II**. 21. ed. New York: Raven, 1991. p. 75-90.

DOIG, P. A.; MC KNIGHT, J. D.; MILLER, R. B. the use of endometrial Biopsy in the infertile mare. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 22, n. 3, p. 72-76, Mar. 1981.

DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Concentrations of prostaglandin F in uterine venous plasma of anaesthetized mares during estrous cycle and early pregnancy. **Prostaglandins**, New York, v. 11, n. 2, p. 251-260, Aug. 1976.

DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Effect of prostaglandin F_{2α} on length of diestrus in mares. **Prostaglandins**, New York, v. 2 n. 4, p. 265-268, Oct. 1972.

EGBASE, P. E.; AL-SHARAN, M.; AL-OTHMAN, S.; AL-MUTAWA, M.; UDO, E. E.; GRUDZINSKAS, J. G. Incidende of microbial growth from the tip of the embryo catheter after embryo transfer in relation to clinical pregnancy rate following in-vitro fertilization and embryo transfer. **Human Reproduction**, Oxford, v. 11, n. 8, p. 1687-1689, Aug. 1996.

ELLSWORTH-SWIHART, M.; ARCHBALD, L. F.; INGRAHAM, R. H.; GODKE, R. A. Effect of phenylbutazone (PBZ) on luteolysis in the mare induced by uterine biopsy. **Theriogenology**, Stoneham, v. 23, n. 2, p. 381-387, Feb. 1985.

ENDERS, A. C.; LIU, I. K. M. Lodegment of the equine blastocyst in the uterus from fixation through endometrial cup formation. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 44, p. 427-438, 1991. Supplement.

EVANS, M. J.; IRVINE, C. H. G. Measurement of equine follicle stimulating hormone and luteinizing hormone: Response of anestrous mares to gonadotropin releasing hormone. **Biology of Reproduction**, Pittsburgh, v. 15, n. 4, p. 477-484, Nov. 1976.

EVANS, M. J.; IRVINE, C. H. G. Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in a mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 23, p. 193-200, 1975.

FLEURY, J. J.; COSTANETO, J. B. F.; ALVARENGA, M. A. Results from an embryo transfer program with mangalarga mares in Brasil. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 8, n. 1, p. 73-74. Nov. 1989.

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

FRANCHIN, R.; HARMAS, A.; BENAODIA, F.; LUNDKVIST, U.; OLIVENNES, F.; FRYDMAN, R. Microbial flora of the cervix assessed at the time of embryo transfer adversely affects in vitro fertilization outcome. **Fertility and Sterility**, v. 70, n. 5, p. 866-870, Oct. 1998.

GESCHWIND, I. I.; DEWEY, R.; HUGHES, J. P.; EVANS, J. W.; STABENFELDT, G. H. Plasma LH levels in the mare during the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 23, p. 207-212, 1975. Supplement.

GINTHER, O. J. Dynamical physical interactions between the equine embryo and uterus. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 38, p. 41-47, 1985a. Supplement.

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

GINTHER, O. J.; FIRST, N. L. Maintenance of the corpus luteum in hysterectomized mares. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 32, n. 11, p. 1687-1691, Nov. 1971.

GINTHER, O. J. Mobility of the conceptus. **Theriogenology**, Stoneham, v. 19, n. 4, p. 603-611, Apr. 1983.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. 2. ed. Cross Plains, WI: Equiservices, 1979. 642 p.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare.** Cross Plains, WI: Equiservices, 1986. 378 p.

GIRI, S. N.; STABENFELDT, G. H.; MOSELEY, T. A.; GRAHAM, T. W.; BRUSS, M. L.; BONDURANT R. H.; CULLOR, J. S.; OSBURN, B. I. Role of eicosanoids in abortion and its prevention by treatment with FM in cows during the first trimester of pregnancy. **Journal Veterinary Medicine**, Berlin, v. 38, n. 1, p. 445-459, July 1991.

HAFEZ, E. S. R. **Reprodução dos animais domésticos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. v. 6, 726 p.

HALUSKA, G. J.; CURRIE, W. B. Variation in plasma concentrations of oestradiol-17 B and their relationship to those of progesterone, 13, 14-dihydro 15-keto prostaglandin F₂ α and oxytocin across pregnancy and at parturition in pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 84, n. 2, p. 635-646, July 1988.

HANDLER, J.; KONIGSHOFER, M.; KINDAHL, H.; SCHAMS, D.; AURICH, C. Secretion patterns of oxytocin and PGF₂ alpha-metabolite in response to cervical dilatation in cyclic mares. **Theriogenology**, Stoneham, v. 59, n. 5/6, p. 1381- 1391, Mar. 2003.

HEAP, R. B.; HAMON, M.; ALLEN, W. R. Studies on estrogen synthesis by the preimplantation Equine conceptus. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 32, p. 343-352, 1982. Supplement.

HERSHMAN, E.; DOUGLAS, R. D. The critical period for the maternal recognition of pregnancy in pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 27, p. 395-401, 1979. Supplement.

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

HURTGEN, J. P.; CUMMINGS, M. R. Diagnosis and treatment of fungal endometritis in mares. Proceedings In: OF THE ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 38., 1982, Lexington. **Proceedings....** Lexington: AAEP, 1982. p. 18-22.

HURTGEN, J. P.; GANJAM, V. K. The effect of enterauterine and cervical manipulation on the equine oes trans cycle and hormone profiles. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 27, p. 191-197, 1979. Supplement.

HUGHES, J. P.; LOY, R. G. Investigations on the effect of intrauterine inoculation of streptococcus zooepidemicus in the mare. In: THE ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 49., 2003, New Orleans. **Proceedings**.... New Orleans: AAEP, 2003. p. 363-365.

HUGHES, J. P.; LOY, R. G. The relation of infection to infertility in the mare and stallion. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 7, n. 3, p. 155-159, July 1975.

INSEL, P. A. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory agents e drugs employed in the treatment of gout. In: RUDDON, R. W.; LIMBIRD, L. E.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; MILINOFF, P. B. (Ed.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. New York: MC Graaw-Hill, 1996. p. 617-657.

IRWIN, C. F. P. Early pregnancy testing and its relation-ship to abortion. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 23, p. 485-489, 1976. Supplement.

JACKMAN, B. R.; MOORE, J. N.; BARTON, M. H.; MORRIS, D. D. Comparison of the effects of ketoprofen and FM on the in vitro response of equine peripheral blood monocytes to bacterial endotoxin. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 58, n. 2, p. 138-143, Apr. 1994.

KASK, K.; MALMGREN, L.; ODENSVIK, K. Prostaglandin F2 α metabolite levels following an embryo transfer procedure in the mare. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 36, n. 1, p. 145-147, 1995.

KASK, K.; ODENSIVIK, K.; KINDAHL, H. Prostaglandin F2 α release associated with an embryo transfer procedure in the mare. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 29, n. 2, p. 286-289, Feb. 1997.

KASMAN, L. H.; HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; STARR, M. D.; LASLEY, B. D. Estrone sulfate concentrations as an indicator of fetal death in horses. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 49, n. 2, p. 184-187, Feb. 1988.

KENNEY, R. M. Cyclical and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 172, n. 3, p. 241-262, Feb. 1978.

KENNEY, R. M.; DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D. A. (Ed.). **Current therapy in theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p. 723-729.

KILMER, D. M.; EVANS, M. J.; IRVINE C. H. G. Melatonin rhythms in mares and foals. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 32, p. 303-307, 1982. Supplement.

KINDAHL, H.; EDQVIST, L. E.; GRANSTROM, E. The release of prostaglandin F_{2α} as reflected by 13,14-dihydroprostaglandin F_{2α} in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers. **Prostaglandins**, Los Altos, v.11, p. 871-878, 1976.

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

LASLEY, B.; HAGGERTY, M. A.; BRAVO, P. W. Estrogen conjugate concentrations in plasma and urine reflect estrogen secretion in the nonpregnant and pregnant mare: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 10, n. 2, p. 444-448, Dec.1990.

LONDONI, M. F.; LEES, P. Comparison of the anti-inflammatory action of FM and Celecoxib in horses applying PK/PD modeling. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 27, n. 1, p. 247-256. Nov. 1995.

MARSAN, C.; GOFF, A. K.; SIROIS, J.; BETTERIDGE, K. J. Steroid secretion by different cell types of the horse conceptus. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 35, p. 363-369, 1987. Supplement.

MC DOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; FAZLEABAS, A. T.; ROBERTS, R. M. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins synthesized and released by conceptuses and endometrial from pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 89, n. 1, p. 107-115, May 1990.

MC DOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; GRUBAUGH, W.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 39, n. 2, p. 340-348, Sept. 1988.

MC KINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.) **Equine reproduction**. London: Lea & Febiger, 1993. 1137.

MEAD, E. A.; SMITH, W. L.; DEWITT, D. L. Expression of the murine prostaglandin (PGH) synthase 1 and PGH synthase 2 isozymes in cos 1 cells. **Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling**, Netherlands, v. 6, n. 1/3, p. 119-129, Mar./Apr. 1993.

MILVAE, R. A.; HANSEL, W. The effects of prostacyclin (PGI₂) and 6-keto-PGF₁ α on bovine plasma progesterone and LH concentrations. **Prostaglandins**, Los Altos, v. 20, n. 4, p. 641-648, Oct. 1980.

MILVAE, R. A.; HANSEL, W. Prostacyclin, prostaglandin F₂ α and progesterone production by bovine luteal cells during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 29, n. 5, p. 1063-1068, Dec. 1983.

MITCHELL, J. A.; AKARASERENONT, P.; THIERMEMANN, C.; FLOWER, R. J.; VANE, J. R. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 24, p. 11693-11697, Dec. 1993.

MONTOVAN, S. M.; DAELS, P. P.; RIVIER, J.; HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; LASLEY, B. L. The effect of a potent GnRH Agonist on gonadal and sexual activity in the horse. **Theriogenology**, Stoneham, v. 33, n. 6, p. 1305-1321, June 1990.

MOREIRA, J. F.; FERNANDES, F. T.; QUEIROZ, F. J.; PINHO, T. G.; FERREIRA, A. R. Estudo comparativo de éguas repetidoras ou não de cio através da avaliação histológica do endométrio e das concentrações plasmáticas de progesterona. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 12, p. 506-512, dez. 2007.

NEELY, D. P.; KINDAHL, H.; STABENJELDT, G. H.; EDQUIST, L. E.; HUGHES, J. P. Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 27, p. 181-189, 1979.

NIEKERK, C. H.; NORGENTHAL, J. C. Fetal loss and the effect of stress on plasma progesterone levels in pregnant thoroughbred mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 32, p. 453-457, 1982. Supplement.

NIKOLAKOPOULOS, E.; KINDAHL, H.; GILBERT, C. L.; GOODE, J.; WATSON, E. D. Release of oxytocin and Prostaglandin F_{2α} around teasing, natural service and associated events the mare. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 63, n. 1/2, p. 89-99, Oct. 2000.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-Surgical recovery of equine eggs and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 31, n. 2, p. 187-195, Nov. 1972.

OSBORNE, V. E. Factors influencing foaling percentages in Australian mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 23, p. 477-486, 1975. Supplement.

OWENS, J. G.; KAMERLING, S. G.; STANTON, S. R., KEOWEN, M. L. Effects of pretreatment with ketoprofen and phenylbutazone on experimentally induced synovitis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 57, n. 2, p. 866-874, Dec. 1996.

PAPA, F. O.; LOPES, M. D.; ALVARENGA, M. A.; MEIR, C.; LUVIZZOTO, M. C. R.; LANGONI, H.; RIBEIRO, E. F.; AZEDO, A. E.; BONFIM, A. C. M. Early embryonic death in mares: clinical and hormonal aspects. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 170-173, 1978.

PASCOE, D. R.; STABENFELDT, G. H.; HUGHES, J. P.; KINDAHL, H. Endogenous prostaglandin F_{2α} release induced by physiologic saline solution infusion in utero in the mare: effect of temperature, osmolarity, and pH. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 50, n. 7, p. 1080-1083, July 1989.

PERLA, D. C.; FLEURY, M. A.; SOUZA, F. A. C.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões eqüinos. **Revista Brasileira Reprodução de Animais**, Belo Horizonte, v. 31, n. 1, p. 27-31, jan./mar. 2007.

PHARRIS, B. B.; WYNGARDEN, L. J. The effect of prostaglandin F₂ α on the progesterone content of ovaries from pseudopregnant rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 130, n. 2, p. 92-94, Apr. 1969.

PURCELL, S. H.; BEAL, W. E.; GRAY, K. R. Effect of a CIDR insert and FM, administered at the time of embryo transfer, on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v.64, n. 4, p. 1-12, 2005.

RICKETTS, A. P.; LUNDY, K. M.; SEIBEL, S. B. Evaluation of selective inhibition of canine cyclooxygenase 1 e 2 by carprofen and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 59, n. 2, p. 1441-1446, Dec. 1998.

RICKETTS, S. W.; ALONSO, S. Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 23, n. 3, p. 185-188, 1991.

RICKETTS, S. W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 23, p. 341-345, 1975a. Supplement.

RICKETTS, S. W. The technique and clinical application of endometrial biopsy in the mare. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 7, n. 2, p. 102-108, 1975b.

SAMUELSSON, B. Prostaglandins, thromboxanes and leucotrienes: formation and biological roles. **Harvey Lectures**, New York, v. 75, n. 1, p. 1-40, 1981.

SAMUELSSON, B. Structures, biosynthesis and metabolism of prostaglandins. In: WAKIL, S. J. (Ed.). **Lipid metabolism**. New York: Academic, 1970. p. 107-153.

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

SEMRAD, S. D.; HARDEE, G. E.; HARDEE, M. M.; MOORE, J. N. FM given in small doses: pharmacokinetics and prostaglandin inhibition in healthy horses. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 46, n. 12, p. 2474-2479, 1985.

SHARP, D. C.; THATHER, M. J.; SALUTE, M. E.; FUCHS, A. R. Relation ship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin-induced prostaglandin F_{2α} release during the oestrous cycle and early pregnancy in pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 109, n. 1, p. 137-144, Jan. 1997.

SHARP, P. C.; MC DOWELL, K. J.; WEITHENAUER, J.; TATCHER, W. W. The continuum of events leading to maternal recognition of pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 37, p. 101-107, 1989. Supplement.

SIROIS, J.; BETTERIDGE, K. J.; GOFF, A. K. PGF_{2α} release, progesterone secretion and conceptus growth associated with successful and unsuccessful transcervical embryo transfer and reinsertion in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 3, p. 419-427, 1987. Supplement.

SKIDMORE, J. A.; BILLAH, M.; ALLEN, W. R. Investigation of factors affecting pregnancy rate after embryo transfer in dromedary camels. **Reproduction fertility and Development**, Melbourne, v. 14, n. 2, p. 109-116, 2002.

SKIDMORE, J. A.; BILLAH, M. Embryo transfer in the dromedary camel (Camelus dromedarius) using asynchronous, meclofenamic acid-treated recipients. **Reproduction fertility and Development**, Melbourne, v. 17, n. 4, p. 417-421, 2005.

SKIDMORE, J. A.; STARBUCK, G. R.; LAMMING, G. E.; ALLEN, W. R. Control of luteolysis in the one-humped camel (Camelus dromedarius). **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 114, n. 2, p. 201-219, Nov. 1998.

SOMA, L. R.; BEHREND, E. N.; RUDY, J. A.; SWEENEY, R. W. Disposition and excretion of FM in horses. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 49, n. 1, p. 1894-1898, Dec. 1988.

SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; MC CUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, Stoneham, v. 59, n. 1, p. 151-170, Jan. 2003.

SQUIRES, E. L.; COOK, V. M.; VOSS, J. L. **Collection and transfer of equine embryos**. Fort Collins: Colorado State University/Animal Reproduction Laboratory, 1985. p. 1-38. (Bulletin, 1).

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

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **Software SAS**: version 9.1.3. Cary, NC, 2004. 1 CD-ROM.

STABENFELDT, G. H.; KINDAHL, H.; HUGHES, J. P.; ODENSVIK, K.; DAELS, P. F.; Endogenous and exogenous manipulation of the corpus luteum of the mare. In: PETHES, G.; FREYNO, V. L. (Ed.). **Twenty-eighth international congress of physiological sciences**. Budapest: Pergamon, 1981, p. 133-139.

STADLER, L.; KAPUI, Z.; AMBRUS, J. L. Study on the mechanisms of action of sodium meclofenamic acid (meclomen) a "double inhibitor" of the arachidonic acid cascade. **Journal of Medicine**, New York, v. 25, n. 6, p. 371-382, 1994.

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**, Cambridge, v. 123, n. 2, p. 261-268, Feb. 2002.

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

TOUTAIN, P. L.; AUTEFAGE, A.; LEGRAND, C.; ALVINERIE, M. Plasma concentrations and therapeutic efficacy of phenylbutazone and FM in the horse: pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 459-469, Dec. 1994.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflammation Research**, Basel, v. 44, n. 1, p. 1-10, Jan. 1995.

VOSS, J. L.; PICKETT, B. W.; BACK, D. G.; BURWASH, L. D. Effect of rectal palpation on pregnancy rate of nonlactating, normally cycling mares. **Journal Animal of Science**, Champaign, v. 41, n. 3, p. 829-834, Sept. 1975.

WAELCHLI, R. O. Endometrial biopsy in mares under non uniform breeding management conditions: prognostic value and relationship with age. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 31, n. 5, p. 379-384, May 1990.

WATSON, E. D.; STOKES, C. R.; BOURNE, F. J. Uterine cellular and humoral defence mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 16, n. 1/2, p. 107-121, Sept. 1987.

WEBER, J. A.; FREEMAN, D. A.; VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Prostaglandin E² hastens oviductal transport of equine embryos. **Biology of Reproduction**, Pittsburgh, v. 45, n. 1, p. 1-3, July 1991.

WILDE, M. H.; DINGER, J. E.; HOAGLAND, T. A.; GRAVES-HOAGLAND, R. L.; WOODY, C. C. The effects of cervical dilation on plasma PGFM, progesterone and the duration of luteal function in diestrous mares. **Theriogenology**, Stoneham, v. 32, n. 4, p. 675-681, Oct. 1989.

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

ZAVY, M. T.; BAZER, F. W.; SHARP, D. C.; WILCOX, C. J. Uterine luminal proteins in the cycling mare. **Biology of Reproduction**, Pittsburgh, v. 20, n. 4, p. 689-698, May 1979.

ZIEL, R.; KRUPP, P. The significance of inhibition of prostaglandin synthesis in the selection of non-steroidal anti-inflammatory agents. **International Journal of Clinical Pharmacology and Biopharmacy**, v.12, p.186-191, 1975.

ANEXO 1

Modelo de ficha para controle individual das receptoras no experimento 3.

FICHA INDIVIDUAL (EXPERIMENTO)

HARAS _____ ANIMAL _____
PELAGEM _____ POTRO AO PÉ _____

ESTRO

| DATA | OVÁRIO ESQUERDO | OVÁRIO DIREITO | TÔNUS UTERINO | EDEMA UTERINO | hCG |
|------|--------------------|-------------------|------------------|------------------|-----|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

OBS.: (Tônus uterino: 1 (flácido) – 3 (tônico). Edema uterina: 1 (presente), 2 (ausente)

INOVULAÇÃO: ___/___/___

BOA:

MÉDIA:

RUIM:

SINCRONICIDADE: D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9 (DIAS APÓS A OVULAÇÃO)

VETERINÁRIO RESPONSÁVEL: _____

APLICAÇÃO DE FLUNIXIM MEGLUMINE: SIM NÃO

DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO (12 DIAS)

| DATA | OVÁRIO ESQUERDO | OVÁRIO DIREITO | ÚTERO | OBSERVAÇÕES |
|------|--------------------|-------------------|-------|-------------|
| | | | | |
| | | | | |

DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO (60 DIAS)

| DATA | OVÁRIO ESQUERDO | OVÁRIO DIREITO | ÚTERO | OBSERVAÇÕES |
|------|--------------------|-------------------|-------|-------------|
| | | | | |

ANEXO 2

Principais alterações endometriais das éguas do experimento 2 submetidas à histologia de fragmento do corno uterino direito.

| Nº | Égua | Grupo | Inflamação | Dilatação glandular | Ninho glandular | Dilatação linfática | Atrofia | Fibrose |
|----|------|-------|------------|---------------------|-----------------|---------------------|---------|---------|
| 1 | 1 | 1 | | | | | P | |
| 2 | 2 | 1 | | P | | | | P |
| 3 | 9 | 1 | P | | | P | P | |
| 4 | 10 | 1 | P | | | | P | |
| 5 | 39 | 1 | | | P | P | P | |
| 6 | 41 | 1 | | | P | | | P |
| 7 | 42 | 1 | | | | | | |
| 8 | 3 | 2/M | | | | | P | |
| 9 | 4 | 2/M | P | | | | | P |
| 10 | 11 | 2/M | | | | | P | |
| 11 | 12 | 2/M | P | | | | | |
| 12 | 13 | 2/M | P | | | | | |
| 13 | 20 | 2/M | | | | | | |
| 14 | 24 | 2/M | P | | | | | |
| 15 | 27 | 2/M | P | P | | | | |
| 16 | 29 | 2/M | | P | P | P | | P |
| 17 | 5 | 3/MF | P | | | | P | |
| 18 | 6 | 3/MF | P | | | | P | P |
| 19 | 14 | 3/MF | P | | | | | |
| 20 | 15 | 3/MF | P | | | | | P |
| 21 | 19 | 3/MF | P | P | P | | | P |
| 22 | 21 | 3/MF | P | | | P | | |
| 23 | 22 | 3/MF | P | | | P | P | |
| 24 | 30 | 3/MF | | | | | | |
| 25 | 31 | 3/MF | P | | | | | |
| 26 | 32 | 3/MF | P | | | | | |
| 27 | 33 | 3/MF | | | | | | |
| 28 | 8 | 4/F | | | P | | | P |
| 29 | 16 | 4/F | P | | | | | |
| 30 | 17 | 4/F | | | | | | |
| 31 | 23 | 4/F | P | | | P | P | |
| 32 | 25 | 4/F | | | | | | P |
| 33 | 35 | 4/F | P | | | | | |
| | | TOTAL | 19 | 04 | 05 | 06 | 11 | 09 |

P - Presença / M - Manipulação Cervical / F - Aplicação de F

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](#)