THYAGO ESCODRO DÉRCOLI

Efeitos do anti-inflamatório inibidor COX 2 (meloxicam) associado ao uso da hCG na gestação, características de corpo lúteo, fertilidade e desenvolvimento embrionário em éguas receptoras

Pirassununga

2017

THYAGO ESCODRO DÉRCOLI

Efeitos do anti-inflamatório inibidor COX 2 (meloxicam) associado ao uso da hCG na gestação, características de corpo lúteo, fertilidade e desenvolvimento embrionário em éguas receptoras

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3500
FMVZ

Dercoli, Thyago Escodro

Efeitos do anti-inflamatório inibidor COX 2 (meloxicam) associado ao uso da hCG na gestação, características de corpo lúteo, fertilidade e desenvolvimento embrionário em éguas receptoras. / Thyago Escodro Dercoli. -- 2017.
63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Anti-inflamatório meloxicam. 2. Corpo lúteo. 3. Doppler. 4. Éguas receptoras.
5. Progesterona. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DO ANTI INFLAMATORIO INIBIDOR COX 2 (MELOXICAN) ASSOCIADO AO USO DA hCG NA GESTAÇÃO, CARACTERÍSTICAS DE CORPO LÚTEO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM ÉGUAS RECEPTORAS", protocolada sob o CEUA nº 4994091116, sob a responsabilidade de **Rubens Paes de Arruda e equipe; Thyago Escodro Dercoli** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 06/04/2017.

We certify that the proposal "Non-steroidal anti-inflammatory selective COX-2 inhibitors (Meloxican) effect in association with use of hCG in pregnancy tax, luteal characteristics and embryo development in recipient mares", utilizing 60 Equines (60 females), protocol number CEUA 4994091116, under the responsibility of **Rubens Paes de Arruda and team; Thyago Escodro Dercoli** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/06/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [09/2015](#) a [05/2016](#) Área: [Reprodução Animal](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Equídeos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [3 a 15 anos](#)

N: [60](#)

Linhagem: [mestiças](#)

Peso: [380 a 500 kg](#)

Resumo: A documentação solicitada foi apresentada de forma adequada.

Local do experimento: Sítio Boa Esperança no município de Elias fausto, central de reprodução vethy

São Paulo, 07 de abril de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Nome: DÉRCOLI, Thyago Escodro

Título: Efeitos do anti inflamatório inibidor COX 2 (meloxicam) associado ao uso da hCG na gestação, características de corpo lúteo, fertilidade e desenvolvimento embrionário em éguas receptoras.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof.(a)

Dr.(a).:

Instituição:

Julgamento:

Prof.(a)

Dr.(a).:

Instituição:

Julgamento:

Prof.(a)

Dr.(a).:

Instituição:

Julgamento:

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais Grafyr e Jeanete que possibilitaram meu ingressar nesta maravilhosa profissão e tiveram o desprendimento de permitir que minha formação universitária fosse distante do conforto e segurança de casa, na terra natal, e acontecesse de forma muito especial em solo mineiro, onde houve muito crescimento, sendo o início de uma carreira e uma vida de alegrias e conquistas, que não param de acontecer dia após dia, fruto certamente deste início com muito apoio por parte deles.

Em especial, a minha esposa Marcella, o porto seguro que agrega e cuida com tanto carinho da nossa família e nossos filhos Eduarda e Matheus, anjos abençoados, razão principal de nossas lutas, e me permite através do total apoio dispendido, alçar voos mais altos, além de suportar com sabedoria e paciência a falta e as pressões impostas pela rotina de trabalho e estudos, que de certa forma nos afastam do convívio familiar, mas nos permitiram a transposição de mais esta etapa de conquista contemplada com a conclusão deste mestrado.

Aos meus avós Ulderico (Neno), Therezinha, Olivio e Josephina (Lita) “in memoriam” que, com a simplicidade de cada um, mesmo sem formação acadêmica, mas com irrefutável sabedoria e exemplos de vida, muito nos influenciaram e influenciam até hoje em escolhas certas e nos encham de orgulho e de saudades.

Aos irmãos Cindy, Felipe, Beatriz e Rafaela, parte de nós que carregam DNAs comuns, e que, embora muitas vezes distantes fisicamente, sempre próximos no coração.

A todos os familiares e amigos por estarem presentes em nossa caminhada fazendo parte de nossas conquistas.

Ao meu orientador Prof. Rubens Paes de Arruda que por um acaso cruzou o meu caminho em uma carona em um dia chuvoso e esta sendo um mentor incontestável em minha formação profissional e pessoal, um exemplo como ser humano, além de profissional que nos inspira na militância no exercício e respeito com a profissão médico veterinário que tanto amamos.

E por fim uma dedicatória especial à energia tão especial que chamamos “DEUS” e que esta sempre ao nosso lado e nos move em boas direções.

AGRADECIMENTOS

A médica veterinária Caroline Oliveira pelo apoio sempre dado no trabalho dedicado, em especial no apoio na condução do experimento com as receptoras de embriões.

A minha querida tia e Prof^a Jane S. Escodro pelos conselhos, além de estar sempre pronta para ouvir e apoiar.

Ao Sergio Cardoso que se dedica dia a dia aos cuidados com os animais da Vethy e sua esposa Zoraide que cuida de nossos materiais e estrutura e que fizeram parte dos resultados obtidos nesta estação de monta que foi realizado o experimento

A toda equipe da Sexing Technologies, vizinhos mais que especiais em nossa central, e presentes em nosso convívio diário.

Ao Sr. Oswaldo que chegou no final da estação de monta, mas dando sua mão especial no trato e manejo dos animais.

Ao Prof. José Antonio Dell Aqua Junior e todo pessoal da Botupharma pelo apoio ao projeto.

A Dr^a. Ana Paula Dotoli e Alessandra Rodrigues do laboratório veterinário Indaiatuba por permitiram a utilização de seus equipamentos de laboratório no processamento de amostras para experimento.

A Faculdade Max Planck que nos apoiou e nos incentivou na realização deste mestrado.

A todos os colegas de trabalho da faculdade Max Planck, pois há uma energia muito boa em trabalhar com este grupo.

A coordenadora do curso de medicina veterinária da faculdade Max Planck Prof^a. Maria Fernanda Vianna Marvulo pelo apoio, principalmente neste período de mestrado.

A Priscilla Guasti, companheira recente na docência, e parceira em discussões na fase final do mestrado.

Agradecimento a todos que conviveram no VRA em momentos de muito aprendizado e sempre serão lembrados: Renata Lançoni ,Tiago Santin, Shirley Andrea Florez Rodriguez, Kleber Menegon Lemes, Gabriel de Carli dos Santos, Bernardo Marcozzi Bayeux, Octavio Fabián Bao Tarragó, Rodolfo Daniel Mingoti, Gabriela Zoca, Romulo Germano de Rezende, Prof. Pietro Sampaio Baruselli, Profa. Eneiva Carla Carvalho Celeghini , Prof. Ed Hoffmann Madureira, Prof. Mario Binelli, Profa. Anneliese de Souza Trald, Profa. Mayra Elena Ortiz D´Avila Assumpção, Prof. Ricardo José Garcia Pereira.

Ao Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira e Dr^a. Priscila Viau do laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP que sempre foram muito solícitos realizando as dosagens hormonais do experimento.

A paciência e profissionalismo da Harumi D. Shiraishi no apoio que sempre nos foi dado junto a secretaria do VRA.

Ao Sandro Revolti aluno e bibliotecário da faculdade Max Planck também pelo apoio na fase final deste projeto.

A professora Helena da Cruz Oliveira da faculdade Max Planck pela participação em minha qualificação.

Aos criadores, amigos e clientes, Julio, Matheus, José Afonso, Emerson, Camila, Willian, José, Luis Henrique, Nelson Jorge.

A aluna e estagiaria e futura médica veterinária Julia Gomide de Barros pela disciplina e apoio dispendido ao projeto.

“Tenha paciência. Tudo aquilo que você deseja, se for verdadeiro, e o mais importante: se for para ser seu, acontecerá.”

Willian Shakespeare.

RESUMO

DERCOLI, Thyago Escodro. **Efeitos do Anti-inflamatório inibidor cox2 (meloxicam) associado ao uso da hCG na gestação, características de corpo lúteo, fertilidade e desenvolvimento embrionário em éguas receptoras.** 2017. 63f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, Pirassununga (SP), 2017.

A transferência de embriões (TE) é uma biotecnologia amplamente utilizada na produção de equinos no Brasil, e a égua receptora exerce um papel fundamental nos resultados finais nos programas de reprodução. Alguns tratamentos têm sido preconizados com objetivo de exercer ação luteotrófica, melhorando a função luteal, e com isto aumentando os níveis sistêmicos de progesterona, como também o uso de drogas anti-inflamatórias, que evitam a perda da função luteal causada pela liberação de prostaglandina em processos inflamatórios prévios ou por manipulação na passagem transcervical do embrião no momento da TE. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do anti-inflamatório inibidor seletivo COX 2 (meloxicam) associado ao uso luteotrófico da hCG na gestação, características de corpo lúteo, fertilidade e desenvolvimento embrionário em éguas receptoras. Para isto, 60 éguas receptoras alojadas em central de reprodução foram aleatoriamente divididas em 4 grupos de 15 animais, de acordo com os seguintes tratamentos: aplicação de 5ml solução fisiológica no dia da ovulação (controle); aplicação de 2500 UI hCG no dia da ovulação; aplicação de 2500 UI hCG no dia da ovulação associado a 0,6 mg/kg de meloxicam; aplicação de 2500 UI hCG no momento da transferência do embrião associado a 0,6 mg/kg meloxicam. No dia da TE, 7 dias após a TE e 21 dias após a TE para as éguas que ficaram gestantes, foi avaliada a irrigação do corpo lúteo por ultrassonografia modo doppler colorido por meio de score do percentual de irrigação (0-100%), e a irrigação do útero avaliado por score (1-4). Por meio da ultrassonografia no modo B, a área do CL em mm² foi avaliada nos mesmos momentos, a área da vesícula em mm² aos 15 e 21 dias da gestação e o tamanho do embrião em cm aos 29 dias de gestação. Além disso, foi realizada dosagem plasmática de progesterona no dia da TE, 7 dias após a TE e 21 dias para as éguas gestantes. As comparações entre os grupos foram analisadas para efeitos principais de tratamento e tempo, assim como para efeito de interação tratamento x tempo. Não foi observado influencia da aplicação de hCG e/ou meloxicam nos animais tratados comparados ao controle ($P>0,05$). No entanto, foi observado um aumento numérico na taxa de gestação para os dois grupos de receptoras que receberam anti-inflamatório meloxicam, correspondendo a um índice superior em 13,3 % de gestação para éguas tratadas. Em conclusão, não há influencia da aplicação de hCG associado ou não meloxicam sobre a perfusão sanguínea uterina, do corpo lúteo, no desenvolvimento embrionário e nas concentrações plasmáticas de progesterona em receptoras de embriões. No entanto, existe, pela aplicação de meloxicam, evidência de melhora nos índices de gestação, podendo estar associado ao efeito anti-inflamatório seletivo COX-2, que pode melhorar resultados em programas comerciais de transferência de embriões em equinos.

Palavras chave: Éguas receptoras, corpo lúteo, doppler, anti-inflamatório meloxicam, progesterona.

ABSTRACT

DERCOLI, Thyago Escodro. **Effects of the anti-inflammatory cox2 inhibitor (meloxicam) associated with the use of hCG in gestation, corpus luteum characteristics, fertility and embryonic development in recipient mares.** 2017. 63 f. Dissertation (Master in Animal Reproduction) - Department of Animal Reproduction, University of São Paulo, Pirassununga (SP). 2017.

Embryo transfer (ET) is a biotechnology widely used in equine production in Brazil, and the recipient mare plays a key role in the final results of breeding programs. Several treatments have been advocated both for the purpose of exerting luteotrophic action, improving luteal function, and thereby increasing systemic levels of progesterone, such as the use of anti-inflammatory drugs, which prevent the loss of luteal function caused by the release of prostaglandin in previous inflammatory processes or by manipulation in the transcervical passage of the embryo at the time of ET. The objective of this study was to investigate the effects of the anti-inflammatory COX 2 inhibitor (meloxicam) associated with luteotrophic use of hCG in gestation, corpus luteum characteristics, fertility and embryonic development in recipient mares. For this, 60 receiving mares housed in a reproduction center were randomly divided into 4 groups of 15 animals, according to the following treatments: application of 5ml physiological solution on the day of ovulation (control group); application of 2500 IU hCG on ovulation day; application of 2500 IU hCG on the day of ovulation associated with 0.6 mg/kg of meloxicam; application of 2500 IU hCG at the time of embryo transfer associated with 0.6 mg/kg meloxicam. On the day of ET, 7 days after ET and 21 days after ET for pregnant mares, corpus luteum irrigation was evaluated by color Doppler ultrasonography using a score of the percentage of irrigation (0-100%), and irrigation of the uterus evaluated by score (1-4). Using B-mode ultrasonography, corpus luteum area in mm² was assessed at the same time points, the area of the embryonic vesicle in mm² at 15 and 29 days of gestation, and the size of the embryo in cm at 29 days of gestation. In addition, plasma progesterone dosage was performed on ET day 7 days after ET in all groups and 21 days after ET for pregnant mares. The comparisons between the groups were analyzed for main effects of treatment and time, as well as for interaction effect treatment x time. No influence of application of hCG and / or meloxicam was observed on treated animals compared to control ($P>0.05$). However, a numerical increase in gestation rate was observed for the two groups of recipients who received anti-inflammatory meloxicam, corresponding to an index higher than 13.3% of gestation for treated mares. In conclusion, there is no influence of the application of hCG associated or not to meloxicam on uterine irrigation, corpus luteum, embryo development and plasma concentrations of progesterone in embryo recipients. However, there is evidence of improvement in gestation rates due to the application of meloxicam, which may be associated with the COX-2 selective anti-inflammatory effect of this drug, improving results in commercial embryo transfer programs in horses.

Key words: anti-inflammatory, meloxicam, corpus luteum, Doppler, progesterone, recipients mares.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagens de Collor-Doppler ultrassom de éguas receptoras de embriões representando diferentes padrões da avaliação subjetiva do percentual de perfusão sanguínea do corpo lúteo de 0 a 100%. A=10%; B=20%; C=30%; D=40%; E=50%; F=60%; G=75%; H=85%; I=95%.....37

Figura 2 - Imagens de Collor-Doppler ultrassom de éguas receptoras de embriões representando diferentes padrões da avaliação subjetiva do escore de perfusão sanguínea do endométrio de 1 a 4 no dia da TE. A=1; B=2; C=3; D=4..38

Figura 3- Imagens de Collor-Doppler ultrassom de éguas receptoras de embriões representando diferentes padrões da avaliação subjetiva do escore de perfusão sanguínea do endométrio de 1 a 4 no 15º dia da gestação: A=2, B=3, C=4.....39

Figura 4- Imagens de Collor-Doppler ultrassom de éguas receptoras de embriões representando diferentes padrões da avaliação subjetiva do escore de perfusão sanguínea do endométrio de 1 a 4 no 29º dia da gestação. A=2, B=3 C=4.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 . Taxa de gestação (%) no sétimo dia (D7) após a transferência do embrião nas receptoras quando submetidas a diferentes tratamentos.	42
Tabela 2. Médias $\pm$ erro padrão da área (mm^2) do corpo lúteo nos dias zero (D0), sete (D7) e vinte (D21) após a transferência do embrião em receptoras, quando submetidas a diferentes tratamentos.....	43
Tabela 3. Médias $\pm$ erro padrão da perfusão sanguínea (%) do corpo lúteo nos dias zero (D0), sete (D7) e vinte um dia (D21) após a transferência do embrião em receptoras quando submetidas a diferentes tratamentos.....	44
Tabela 4. Médias $\pm$ erro padrão da perfusão sanguínea (%) do corpo lúteo no sétimo dia (D7) após a transferência do embrião nas receptoras gestantes e vazias quando submetidas a diferentes tratamentos	45
Tabela 5. Médias $\pm$ erro padrão da perfusão sanguínea uterina nos dias zero (D0), sete (D7) e vinte (D21) após a transferência do embrião em receptoras, quando submetidas a diferentes tratamentos.	45
Tabela 6. Médias $\pm$ erro padrão da área da vesícula embrionária (mm^2) nas receptoras no dia do diagnóstico de gestação (D7) e vinte um dia (D21) após a transferência, quando submetidas a diferentes tratamentos.....	46
Tabela 7. Médias $\pm$ erro padrão do tamanho do embrião (cm) nas receptoras no vigésimo primeiro dia após a TE quando submetidas a diferentes tratamentos.....	46
Tabela 8. Médias $\pm$ erro padrão da progesterona plasmática (ng/ml) em receptoras, nos dias zero (D0), sete (D7) e vinte um (D21) após a transferência do embrião, quando submetidas a diferentes tratamentos.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteróides
CL	Corpo lúteo
E ₂	Estrógeno
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IM	Intramuscular
Kg	Kilograma
LH	Hormônio luteinizante
Mg	Miligrama
ML	Mililitro
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
RNA _m	RNA mensageiro
ng	Nanograma
OV	Ovulação
P ₄	Progesterona
PCR	Dosagem de proteína C reativa
PGE	Prostaglandina E
PGF ₂ α	Prostaglandina F2 alfa
TE	Transferência de embrião
UI	Unidade internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Ciclo estral nas éguas	17
2.2 Corpo lúteo, funcionalidade, desenvolvimento e luteólise.	19
2.3 Perda embrionária.....	22
2.4 Transferência de embriões na espécie equina.....	23
2.5 Aplicação de fármacos para aumentar as taxas de gestação em éguas receptoras de embrião.....	24
2.5.1 Progesterona.....	25
2.5.2 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).....	26
2.5.3 Gonadotrofina coriônica humana (hCG) e análogos do GnRH.....	27
2.6 Avaliação ultrassonográfica com ultrassom Doppler colorido do trato reprodutivo em equinos	28
3 HIPÓTESES.....	31
4 OBJETIVOS.....	32
5 MATERIAS E MÉTODOS	33
5.1 Local e período do experimento	33
5.2 Animais	33
5.3 Manejo dos animais (nutricional e reprodutivo).....	33
5.4 Delineamento experimental	34
5.5 Colheita e avaliação dos embriões.....	35
5.6 Mensurações do corpo lúteo e do embrião	35
5.7 Avaliação da perfusão sanguínea do corpo lúteo e útero.....	36
5.8 Dosagens plasmática de progesterona	40
5.9 Análises estatísticas	41
6 RESULTADOS.....	42
6.1 Taxa de gestação	42
6.2 Área do corpo lúteo	43
6.3 Perfusão sanguínea do corpo Lúteo	43
6.4 Perfusão sanguínea do útero.....	45
6.5 Desenvolvimento embrionário.....	46
6.6 Concentrações plasmáticas de progesterona.....	47

7 DISCUSSÃO	48
8 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) tornou-se uma importante ferramenta em vários programas de melhoramento genético de equinos por todo o mundo. Thibier (2004) mostrou dados nos quais 11775 transferências de embriões em equinos foram realizadas no cenário mundial, sendo que 64% nos EUA e 31 % no Brasil, demonstrando a posição de destaque brasileira, e que vem se mantendo até os dias atuais. As vantagens desta biotecnologia como instrumento para acrescentar ganho genético em equinos são conhecidas e sedimentadas. Atualmente, a TE também representa a etapa final de algumas biotécnicas, como a ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoide) e a clonagem, nas quais o embrião resultante pode ser transferido de forma não cirúrgica para o útero da égua receptora. Como as éguas são, em sua maioria, animais monovulatórios e com ciclo estacional, o número de ciclos e ovulações utilizados por ano é limitado (GINTHER, 1992). Portanto, é de suma importância atingir a maior taxa de gestação possível, para cada embrião colhido.

A probabilidade de estabelecimento de uma prenhez após transferência depende de uma série de fatores inter-relacionados que incluem a qualidade do embrião, a experiência do técnico que realiza a transferência, a sincronia entre doadora e receptora e outros aspectos inerentes à receptora. Desta forma, fica clara a importância da seleção e manejo da receptora de embrião para obtenção de bons resultados. Alguns grupos vêm pesquisando a utilização de fármacos, principalmente nas receptoras de embrião, como anti-prostaglandínicos, progesterona, gonadotrofina coriônica humana (hCG) e análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) como a buserelina (NEWCOMBE; MARTINEZ; PETERS, 2001; FLEURY, 2004; SOUZA, 2006; FLEURY et al., 2007; MCCUE et al., 2012; KÖHNE et al., 2014a), com o objetivo de melhorar as taxas de gestação.

Os resultados encontrados com a utilização da hCG e da buserelina aplicados no momento de formação do CL nas taxas de gestação são promissores, entretanto, o mecanismo pelo qual este efeito ocorre ainda é desconhecido. Foi demonstrado que a aplicação da hCG um dia após a ovulação, causou aumento do número de éguas candidatas à receptoras de embrião, pois apresentaram características desejáveis de útero e cérvix no dia 6 após ovulação; provavelmente por um efeito luteotrófico da hCG sobre o corpo lúteo em formação (SOUZA, 2006).

Por outro lado, a aplicação de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) no período da manipulação do trato reprodutivo para transferência do embrião também é uma prática que busca melhorar os resultados, mas que mostram resultados controversos em estudos realizados, com melhora (KOBLSCHKE et al., 2008) e queda (CAIADO et al., 2005), na taxa de gestação de grupos de animais tratados com estas drogas.

Desta forma, estudos com o uso de drogas com efeitos luteotrófico e anti-inflamatórios, visando melhorar os índices de gestação de receptoras de embriões equinos são pertinentes e necessários, e este trabalho busca uma análise de resultados inserindo terapêutica com hCG e anti-inflamatório em um Centro de Reprodução com esquema comercial de transferência de embriões na espécie equina, pesquisando sobre a associação da utilização desta duas categorias de fármacos, que de forma empírica, muitas vezes, é utilizada por profissionais na rotina de campo e em centrais de reprodução equina. A hipótese aqui levantada é de que a aplicação de hCG no período da formação do corpo lúteo, associado ou não ao meloxicam melhorem características do corpo lúteo, o desenvolvimento do corpo lúteo, consequentemente a produção de P_4 , o desenvolvimento embrionário e melhore a taxa de gestação em receptoras de embriões, assim como o meloxicam no momento da transferência do embrião melhore a taxa de gestação em receptoras de embriões de equinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo estral nas éguas

Para realização de um programa de T.E., o conhecimento do ciclo estral é fator preponderante para obtenção de bons resultados. O ciclo estral na égua compreende o período de uma ovulação até outra ovulação subsequente; este intervalo é de 21 a 22 em cavalos e 24 dias em pôneis (GINTHER, 1992). As fêmeas equinas são animais poliétricos estacionais e os ciclos estrais regulares ocorrem em dias longos, onde a melatonina secretada pela glândula pineal (fator anti-gonadal) é diminuída. No período de inverno, com noites mais longas, a melatonina é secretada pela pineal em maiores quantidades, em decorrência da diminuição de estímulo luminoso na retina, promovendo bloqueio do GnRH levando ao anestro nestes períodos de dias curtos (MACKINNON et al., 2011).

O ciclo estral é regido por meio do sistema neurohipofisário-hipotalâmico-gonadal através da ação do GnRH, promovendo liberação do hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), influenciado pelo feedback exercido pelos hormônios esteroidais estrógeno (E_2) e progesterona (P_4) produzidos pelos folículos e corpos lúteos. Nos equinos não há evidências de que exista liberação específica de FSH, estando esta, associada também a liberação do LH. Na fase progesterônica, os pulsos de GnRH são menos frequentes e na fase estrogênica mais frequentes (IRVINE; ALEXANDER, 1987).

Nas éguas, normalmente ocorrem uma a duas ondas de crescimento folicular por ciclo, sendo que, um incremento inicial do nível de FSH, leva ao desenvolvimento do início da onda e chega a um platô quando o maior folículo tem cerca de 13 mm e o GnRH começa cair. Neste ponto, o folículo que ganha a dominância segue seu desenvolvimento respondendo a mais baixos níveis de FSH e os folículos menores, subordinados, passam a não ter a capacidade de responder aos níveis mais baixos de FSH (AURICH, 2011). O folículo dominante passará a aumentar a sua produção de estrógeno, o que por meio de sistema “feed back”, aumentará os níveis de LH, e ovulação em consequência da ligação do LH aos receptores presentes no folículo pré-ovulatório (MCKINNON et al., 2011).

Na maioria das espécies ocorre um pico de LH em um tempo curto na fase pré-ovulatória, já nos equinos o incremento de LH ocorre por vários dias da fase final do estro, sendo observado maior nível logo após a ovulação. (GINTHER et al., 2010).

Éguas jovens apresentam maiores concentrações de estrógeno e LH no período pré-ovulatório comparadas com éguas idosas e isto leva a uma duração maior do período interovulatório em éguas velhas comparado com éguas jovens (GINTHER et al., 2008).

Na espécie equina podemos definir quatro fases distintas relacionadas à sua condição reprodutiva e subdividi-las em fase reprodutiva ou estação de monta, caracterizada pela presença de ciclos regulares; transição de outono, onde se inicia falha no processo de ovulação com declínio do GnRH e falha de LH; anestro, no qual o ciclo estará completamente interrompido e com redução e perda da capacidade de produção do LH na pituitária, e a fase de transição de inverno, onde ocorre o retorno a ciclicidade em direção a fase da estação de monta. Neste período há a implementação e execução dos programas reprodutivos, onde ocorre uma busca pelo retorno rápido da condição de fertilidade das fêmeas. Ocorre então, de forma complexa, uma readequação para reestabelecimento dos perfis hormonais ligados a liberação de GnRH, FSH, produção de estrógeno pelos folículos e disponibilidade de LH, o que resulta em cios prolongados e irregulares com baixa fertilidade e muitas vezes com perdas embrionárias precoces por falha de produção P₄ (MCKINNON et al., 2011).

A fase de transição acaba sendo muitas vezes, a fase onde há uma grande expectativa em produzir prenhez e embriões de animais de esportes que acabarão se tornando potros bem nascidos no calendário hípico se forem gerados nesta fase, o que leva a maior utilização de recursos terapêuticos com intuito de melhorar os índices reprodutivos nesta fase.

Mesmo no período de estação de monta, com a presença de ciclos regulares, são encontradas variações raciais que resultam em diferentes padrões de características reprodutivas em fases similares do ciclo entre indivíduos de raças distintas. Em estudo com éguas das raças quarto de milha e árabe, foi demonstrado variação nas características reprodutivas, como função ovariana, em períodos similares do ciclo. As éguas árabes apresentaram estro mais longo e éguas quarto de milha com maiores folículos pré-ovulatórios, (DIMMICK, GIMENEZ E SCHLAGER 1993). Portanto o conhecimento das características reprodutivas, muitas vezes

influenciada por características raciais, deve ser considerado para aplicação das biotécnicas.

2.2 Corpo lúteo, funcionalidade, desenvolvimento e luteólise.

O corpo lúteo dos mamíferos exerce uma atividade de órgão endócrino responsável pela produção de progesterona, o qual será responsável pela manutenção da gestação. Antes da ovulação o folículo está organizado em camadas distintas, onde o antro está no lúmen, preenchido centralmente pela camada fluida, circundada pelas células da granulosa. A granulosa e o folículo estão separados pela membrana basal, e, fora da membrana, estão a teca interna e teca externa. Os capilares circundam os folículos presentes na teca interna e externa, e eritrócitos são vistos nesta região, porém, a membrana basal age como barreira vascular, o que torna ausente presença vascular na granulosa. O LH causa uma ruptura na parede folicular e liberação do oócito, e, em sequência, há uma invasão de capilares na membrana basal e granulosa, desenvolvendo o corpo lúteo, que irá conter uma população celular heterogênea incluindo células luteais esteroidogênicas grandes, células luteais esteroidogênicas pequenas (NISWENDER et al., 2000).

Antes de sofrer a luteinização, as células ovarianas da teca e da granulosa são também agentes secretores de estradiol, sendo que, as células da teca expressam enzimas necessárias para conversão de colesterol em andrógeno, mas não andrógeno em estradiol, o que ocorre nas células da granulosa, portanto, as células da teca produzem andrógenos que serão aromatizados pelas células da granulosa. O pico pré-ovulatório de LH resulta em luteinização das células da teca e da granulosa, mudando o caminho da esteroidogênese, sendo produzida então a progesterona pelas células foliculares residuais que formam o corpo lúteo (NISWENDER et al., 2000).

A diferenciação em células capazes de produzir progesterona é acompanhada de um aumento na expressão de enzimas necessárias para conversão do colesterol em P_4 . Pelo processo de luteinização, na maioria dos mamíferos, as células da teca e da granulosa, dão origem a dois tipos distintos de células luteais que diferem morfológica e fisiologicamente. As células originárias da granulosa são chamadas grandes células luteais, e as originadas da teca, pequenas células luteais, isto na maioria das espécies de mamíferos, porém nas éguas as células luteais derivam

exclusivamente das células da granulosa (VAN NIEKERK; MORGENTHAL; GERNEKE, 1975).

Uma complexa mudança na expressão genica é caracterizada na ovulação e fase inicial de formação do corpo lúteo (CL). A angiogênese é indispensável para estrutura e função do CL e requer a interação de diversos fatores pro angiogênicos e antiangiogênicos (WOAD; ROBINSON, 2016).

A importância da competência luteal é evidente para gestação e uma falha pode resultar em perda embrionária precoce (ALLEN, 2001). A função luteal nas éguas pode ser avaliada em diversas fases do ciclo de éguas não gestantes e gestantes por meio de teste de análise de ligação enzimática imuno específica (CELISA) encontrando valores aceitáveis de $P_4 < 4\text{ng/ml}$ para anestro, $< 1\text{ ng/ml}$ estro, entre 4 - 12 ng/ml no diestro, 9-30 ng/ml para gestações de 15 a 30 dias e 2,5 a 10 ng/ml dos 30 aos 110 dias de gestação (LOPATE; THRELFALL, 1991).

Nas éguas, uma relação pode ser observada ao se avaliar a perfusão sanguínea do corpo lúteo e os níveis de progesterona, porém não se observa uma relação de área do corpo lúteo e produção progesterona (BOLLWEIN et al., 2002).

O incremento de LH na fase de formação do CL, pela aplicação de hCG, pode influenciar na concentração da progesterona circulante em coelhos e bovinos (WILTBANK, et al 1989). Em éguas, com a aplicação de análogo GnRH no dia 10 do ciclo, observou-se aumento do fluxo sanguíneo ovariano e aumento da porcentagem de corpos lúteos com maior irrigação avaliados pelo sistema color doppler, embora não foi observado aumento de níveis de progesterona (CASTRO et al., 2016). Este fato evidencia uma influência positiva relacionada ao fluxo sanguíneo promovido pelo incremento de LH em consequência do estímulo da hCG.

Em éguas, Mccue et al. (2012) compararam a aplicação de deslorelina e hCG no momento da transferência de embrião com um grupo placebo e obteve uma menor taxa de gestação no grupo que recebeu hCG, resultado que contradiz o raciocínio de que um maior fluxo sanguíneo e possível influencia na concentração de progesterona, resultante de um melhor desenvolvimento do CL, observados em outras espécies, possam resultar melhor índice reprodutivo, necessitando mais estudos nesta área na espécie equina.

A luteólise corresponde à perda da funcionalidade e regressão do corpo lúteo com diminuição das concentrações circulantes de progesterona no final do diestro, e

assim como em outras espécies de produção, ocorre nas éguas. A luteólise pode ser constituída de três fases, pré-luteólise, luteólise e pós-luteólise (SANTOS et al., 2013).

Uma diminuição significativa nos níveis plasmáticos de progesterona é encontrada por volta do 14º ao 17º dia do ciclo devido a luteólise funcional onde há diminuição da expressão gênica para produção de progesterona, com consequente queda de progesterona circulante e fato este que ocorre anteriormente a regressão morfológica do corpo lúteo (GINTHER et al., 2007a).

O primeiro sinal da luteólise é a secreção uterina de $\text{PGF2}\alpha$, que nas éguas atingem a circulação periférica, diferentemente dos bovinos onde ocorre liberação por meio de circulação local e sistema contra corrente entre veias uterinas e artéria ovariana. A regulação pelo endométrio da expressão genica para COX-2 é a chave principal entre a indução da luteólise ou reconhecimento materno. A liberação de $\text{PGF2}\alpha$ ocorre também por influência da ocitocina que nas éguas são encontradas em células endometriais (SANTOS et al., 2015). Pode se dizer que um sistema parácrino-autócrino envolvido na liberação de ocitocina e prostaglandina uterina acelera a luteólise nas éguas não gestantes (AURICH, 2011).

Por volta de 12 horas de exposição a $\text{PGF2}\alpha$, o início da luteólise estrutural é resultante de desorganização vascular do CL e apoptose, resultado da diminuição no mRNA luteínico da proteína reguladora aguda esteroideogênica (StAR), e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), proteínas ligantes do IGF, IGF-R1, IGFBP, e consequente diminuição da P_4 (TREVISOL et al., 2013).

Interferências no processo normal da luteólise podem ocorrer devido liberação de prostaglandinas por processos inflamatórios e manipulação da genitália, adiantando seu início e diminuindo a fase luteal, bem como atrasando, por ação anti-inflamatória de fármacos que inibem a liberação das prostaglandinas, prolongando a fase luteal (SANTOS et al., 2013; KOBLISCHKE et al., 2008).

2.3 Perda embrionária

A perda ou morte embrionária é estudada a longa data como podemos observar em levantamento realizado na Alemanha com um total de 15.151 éguas servidas em 10 estações de monta de forma que, de 11.098 éguas gestantes 8,4% tiveram perda embrionária precoce e 7% perda no final da gestação. (MERKT; GUNZEL, 1979).

Cerca de 10 a 15 % das éguas apresentam perdas embrionárias ou abortos em alguma fase da gestação, sendo que a maioria destas perdas embrionárias ocorre dentro dos primeiros 40 dias de gestação, momento este em que o corpo lúteo primário é responsável pela manutenção dos níveis de progesterona. Uma falha no desenvolvimento ou na função do CL ou luteólise por uma liberação de endotoxina por cólica ou outra alteração sistêmica são causas comuns de perda de gestação precoce nas éguas (ALLEN, 2001).

A diminuição da progesterona sistêmica pode ser observada como consequência e não causa da perda embrionária (PAPA et al., 1998) sendo atribuída causas multifatoriais as perdas embrionárias, como alterações cromossômicas, processos inflamatórios, infecções bacterianas e fúngicas e endometrioses, e tais processos, podendo desta forma, levar a morte embrionária e consequente perda da função do corpo lúteo. Além disso, o processo inflamatório, em decorrência de infecção por leptospirose, embora mais comumente relatado em fase mais adiantada da gestação, pode ocorrer em fases iniciais, levando a perdas embrionárias precoces (PINNA et al., 2013).

Perdas embrionárias em éguas idosas podem ser também atribuídas à alterações endometriais crônicas (GINTHER, 1992); também por alterações no desenvolvimento embrionário, sendo que éguas mais velhas apresentam menor quantidade de cópias de DNA mitocondrial do que éguas jovens, quando comparados embriões de 7 dias (HENDRIKS et al., 2015). Assim, podendo haver uma menor taxa de gestação de embriões oriundos de éguas doadoras mais velhas.

2.4 Transferência de embriões na espécie equina

A transferência de embriões (T.E.) é uma tecnologia de reprodução assistida que há mais de 3 décadas foi implementada na espécie equina para obter-se produtos de éguas idosas que apresentavam problemas reprodutivos. A técnica evoluiu e se tornou uma biotecnologia hoje aplicada em éguas em diversos períodos da atividade reprodutiva (BRINSKO, 2011). Foi impulsionada no campo em decorrência do desenvolvimento obtido com a técnica de transferência do embrião não cirúrgica (FLEURY et al. 1987; IULANO; SQUIRE, 1985; CARNEY et al., 1991) que facilitou o processo e sua aplicabilidade.

A TE tornou-se uma importante ferramenta em vários programas de melhoramento genético de equinos por todo o mundo. Esta possibilita a obtenção de potros de éguas em campanhas esportivas e de éguas jovens, múltiplos potros da mesma égua por ano, potros de éguas com problemas musculoesqueléticos e/ou reprodutivos (BRINSKO, 2011; CAMPBELL, 2014).

Ainda, com o avanço das técnicas de criopreservação de embriões e utilização do sêmen congelado e refrigerado, permitiu-se a produção de potros até mesmo fora de estação de monta, aumentando o intercâmbio de material genético equino, o que proporcionou o incremento da utilização da técnica de TE (SCHERZER; DAVIS; HURLEY, 2011).

São diversos os fatores que podem influenciar no sucesso ou insucesso na implementação de um programa de transferência de embriões na espécie equina. Neste sentido, a qualidade do sêmen, a idade e saúde reprodutiva da doadora, a sincronia da receptora em relação doadora e a habilidade do técnico são pontos importantes (MCKINNON, 1993).

Baixos resultados após a utilização da técnica de TE podem impactar de forma significativa no resultado financeiro dos criatórios de equinos, pois, observa-se no mercado equestre, uma grande negociação de embriões e prenhez em várias raças no mercado nacional.

As taxas de sucesso em recuperação embrionária não variam muito se o lavado for realizado entre 7 e 10 dias pós ovulação da doadora, com taxas para o dia 7 (61%), dia 8 (66%), dia 9 (59%), e dia 10 (56%) segundo (JACOB et al., 2012) e 75,5 e 81,8% de embriões para colheitas realizadas no D7 ou D8 observado por Iulano e Squire (1985). Fleury et al. (2001) obtiveram taxas de 37,5 % no D7 e 62,8 % no D8.

A sincronia das receptoras de embriões para a transferência dos embriões recuperados 7 a 10 dias após a inseminação da doadora, também tem uma amplitude aceitável, com bons resultados, se os embriões forem transferidos em receptoras ovuladas de 3 a 8 dias anterior à data da T.E.

Mesmo com bons resultados obtidos com a flexibilização do sincronismo doadora receptora, no qual facilita o manejo e aproveitamento das receptoras, a busca por otimização de resultados é constante dentro da TE em equinos, sendo as receptoras um importante fator influenciando sobre resultados. A manipulação hormonal do ciclo estral pode facilitar o manejo de receptoras e doadoras na qual são induzidos períodos de sincronia levando a melhores taxas de gestação. O uso de prostaglandina para encurtar o ciclo, o uso de análogos GnRH e hCG para induzir ovulação bem como utilização de estrógeno e progesterona para promover ciclos artificiais, são ferramentas que buscam trazer mais eficiência aos programas de TE (LOPES, 2015).

Devido a uma possível liberação de PGF2 α pela manipulação da cervix na TE não cirúrgica, ou por processos inflamatórios uterinos nas receptoras de embriões, tem sido realizado estudos com anti-inflamatórios não esteroidais no momento da TE, buscando melhorias no índice reprodutivo (CAIADO et al., 2005; SOUZA, 2006; KOBLISCHKE et al., 2008).

É comum em encontros técnico-científicos discussões com exposição por parte de profissionais de campo e de Centros de Reprodução de protocolos associando drogas anti-inflamatórias e hormônios. Estes protocolos, muitas vezes, são apresentados sem embasamento científico comprovado. Isto indica que, pesquisas nesta área são necessárias, visando embasar a utilização destes recursos para melhoria de resultados na T.E. de equinos.

2.5 Aplicação de fármacos para aumentar as taxas de gestação em éguas receptoras de embrião

Na tentativa de melhorar as taxas de prenhez em éguas, alguns grupos vêm pesquisando a utilização de fármacos como anti-prostaglandínicos, progesterona, hCG e análogos do GnRH como a buserelina (NEWCOMBE; MARTINEZ; PETERS, 2001; FLEURY, 2004; SOUZA, 2006; FLEURY et al., 2007; KÖHNE et al., 2016;

CASTRO et al., 2016; BRITO et al., 2017). Sendo assim segue em forma de tópicos revisão dos principais medicamentos utilizados com o fim de uma resposta positiva nos índices de fertilidade das fêmeas receptoras de embriões .

2.5.1 Progesterona

Entre os tratamentos hormonais utilizados, a aplicação de progesterona exógena é uma prática comum e difundida, apesar de questionamentos sobre sua eficácia. Embora uma insuficiência luteal primária tenha sido proposta como uma das causas de perda embrionária precoce, sua ocorrência não está claramente documentada e trabalhos conflitantes foram publicados. Existem diversas discussões na literatura sobre o efeito dos níveis de progesterona e a taxa de concepção (HANSEL; BLAIR, 1996; ARRUDA, et al., 2001).

A aplicação de progesterona aumenta o número de receptoras aptas a receberem embrião, quanto à avaliação de tônus e características uterina e cervical, bem como permite a utilização de receptoras com maior assincronia da doadora. Caiado et al. (2007) aplicaram 200mg de P₄ oleosa do dia 0 ao 5 do ciclo estral para utilizar éguas receptoras mais cedo, e obteve bons resultados de fertilidade, o que também foi observado por Gomes Rodrigues et al. (2012).

Em estudo com aplicação de altrenogest, Panzani et al. (2009) observou tendência a menor perda embrionária no grupo de receptoras que receberam suplementação exógena de progesterona.

Na fase inicial pós-ovulação, não foi observada diferença nos índices de recuperação embrionária, bem como desenvolvimento e qualidade de embriões coletados 7 dias pós ovulação em doadoras que receberam suplementação com progesterona do dia da ovulação até os sete dias após (BALL; MILLER; DAELS, 1992).

Em receptoras de embriões Iuliano e Squires (1986) não observaram diferença nos índices reprodutivos em éguas suplementadas com progesterona exógena.

Podemos considerar questionável a utilização de progesterona, como demonstrado em algumas citações científicas. Queda nos níveis de progesterona pode ocorrer como consequência e não causa da perda embrionária, havendo muitas vezes a necessidade de aplicação de prostaglandina para que realmente ocorra a expulsão do feto quando ocorre a morte. Assim, a insuficiência luteal e consequente queda dos

níveis séricos de progesterona não podem ser atribuído como causa principal da perda embrionária precoce. (PAPA et al., 1998; ALLEN, 2001).

2.5.2 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os efeitos das drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) se dão pela inibição das cicloxigenases (COX) impedindo a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina. Duas isoformas são consideradas COX-1, que tem sido considerada como isoforma ligada a homeostase do organismo, e a COX-2 ligada a processos inflamatórios (BERETTA; GARAVAGLIA; CAVALLI, 2005); e também responsável a processos fisiológicos ligados a reprodução pela ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE.

Cada classe de AINEs tem ação específica, inibindo na maioria das vezes as duas isoformas causando efeitos colaterais indesejados, principalmente gastrointestinais e renais, pela inibição das COX-1, quando utilizado por longos períodos (KUMMER; COELHO, 2002).

Os processos inflamatórios, trauma e estímulos mecânicos podem promover liberação da cascata do ácido araquidônico devido a mediadores inflamatórios. A transferência do embrião pela técnica não cirúrgica pode estar associada à liberação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ e indução de luteólise (KASK; ODENSVIK; KINDAHL, 1997).

Nas receptoras de embriões, o efeito da manipulação uterina e cervical sobre a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é ponto de controvérsias. Para Daels, et al. (1989) está claro que a manipulação do trato genital, isto é, dilatação cervical, lavado uterino, transferência embrionária e palpação uterina, podem induzir a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$. No entanto, é impossível predizer qual é o impacto desta liberação sobre a função luteínica. Sirois, Betteridge e Goff (1987) mostraram que algumas, mas não todas as éguas, apresentaram aumento na secreção de prostaglandina durante a transferência de embriões pela técnica não cirúrgica, e Koblischke et al. (2008) observaram maiores quantidades de metabolitos de prostaglandinas em grupo controle de receptoras quando comparadas com que receberam drogas anti-inflamatórias.

A aplicação de inibidores seletivos de COX-2 influencia modificando a condição fisiológica reprodutiva, podendo esta condição ser positiva, pensando na ação de inibição de liberação precoce da prostaglandina, ou negativos, como foi observada a perda embrionária pré-implantação em ratas com diversas doses de anti-inflamatório

COX-2 seletivos (celocoxib, nimesulide), e perdas pós-implantação embrionária com as doses maiores e aumento no período gestacional de fêmeas tratadas com tais drogas (SHAFIQ; MALHOTRA; PANDHI, 2004).

Em humanos o tratamento com meloxicam antes ou depois do pico de LH causa disfunção no processo de ovulação (HESTER; HARPER; DUFFY, 2010), sendo esta droga pesquisada como contraceptivo.

Já em novilhas nelores receptoras de embriões, foi encontrado efeito positivo na taxa gestação com tratamento pré-transferência com meloxicam, diminuindo níveis séricos de prostaglandinas o que ocorreu por uma menor influência da prostaglandina liberada na manipulação do útero para transferência do embrião promovendo dano ao corpo lúteo (LOPES et al., 2015).

Em éguas, a aplicação de anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) no período da manipulação do trato reprodutivo para transferência do embrião mostram resultados controversos em estudos realizados, com melhora (KOBLSCHKE et al., 2008) e queda (CAIADO, 2005) nas taxas de gestação de grupos tratados com estas drogas. Panzani et al. (2009) não observaram diferença na taxa gestação em éguas tratadas com anti-inflamatório e antibióticos no momento da transferência.

Foi demonstrado também que produção de prostaglandina E₂ pelos embriões pode estar envolvida ao reconhecimento materno (VANDERWALL et al., 1993). Esta prostaglandina pode ser inibida pelo tratamento anti-inflamatório, podendo assim, diminuir a taxa de gestação, justificando os resultados controversos encontrados quanto aos efeitos na fertilidade (CAIADO, 2005; KOBLSCHKE et al., 2008; PANZANI et al., 2009).

Como anti-inflamatório para equinos, o meloxicam, um potente inibidor de tromboxanos e prostaglandinas, foi um dos primeiros inibidores seletivo da COX-2. Atualmente é classificado como inibidor preferencial da COX-2 (BERETTA, 2005). Não existe, até o momento, relato do uso do meloxicam no período de transferência de embriões em receptoras de embrião em equinos.

2.5.3 Gonadotrofina coriônica humana (hCG) e análogos do GnRH

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é uma proteína produzida pelos citotrofoblastos das vilosidades coriônicas da placenta humana que embora tenha características químicas diferente do LH exerce função biológica similar e é

geralmente utilizada para induzir a ovulação e promover sincronização do ciclo estral em éguas (MCKINNON; VOSS, 1993).

A hCG pode exercer influência no processo fisiológico da ovulação e formação do tecido luteal. No período de formação do corpo lúteo os fatores de crescimento endoteliais promovem a angiogênese e podem ser estimulados pela aplicação de hCG (KÖHNE et al., 2014; WOAD; ROBINSON, 2016; BRITO et al., 2017). Em estudos *In vitro* e *in vivo* há uma resposta celular do corpo lúteo ao LH e a hCG, estimulando a produção de progesterona. A hCG não altera os picos de liberação e ondas de LH pela glândula hipófise com isso podemos reforçar a ideia da ação da hCG direta nos receptores celulares do endotélio ovariano (KELLY; HOYER; WISE, 1988).

O tratamento com hCG no período da ovulação pode promover um incremento da progesterona por meio de estimulação do tecido luteal, ajudando desta forma prevenir perdas embrionárias precoces, além de influenciar positivamente no desenvolvimento embrionário (KÖHNE et al., 2014).

Com a aplicação de análogos GnRH foi observado o incremento do LH circulante não somente em período pré-ovulatório, mas em diversas fases do ciclo estral (KANITZ et al., 2007; CASTRO et al., 2016; BRITO et al., 2017).

A presença de receptores específicos ao GnRH foi observado em tecidos ovarianos, testicular, placentário, do oviduto são demonstrados em diversas espécies, ocorrendo uma resposta vascular direta a estes tecidos através do estímulo pela aplicação de hCG ou GnRH. Embora não haja relatos sobre tais receptores na espécie equina em tecidos do endotélio ovariano, estudos sugerem sua presença, e, novos estudos são necessários para sua identificação (BRITO et al., 2017).

Alonso et al. (2014) não encontraram diferenças em níveis de progesterona e irrigação do corpo lúteo e endométrio em éguas que receberam hCG para indução de ovulação, no dia da ovulação e 5 dias após. Turna Yilmaz et al. (2014) também não encontraram alterações em níveis de estrógeno no fluido folicular bem como no fluxo sanguíneo no ovário com a aplicação de hCG pré-ovulação.

2.6 Avaliação ultrassonográfica com ultrassom Doppler colorido do trato reprodutivo em equinos

A utilização da ultrasonografia como ferramenta no diagnóstico e reprodução dos eqüídeos pode ser vista como um divisor de águas e trouxe um impacto positivo

no estudo de patologias, do potencial reprodutivo e desenvolvimento das biotecnologias (FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2011).

No modo B, a apresentação da imagem ocorre bidimensional e são apresentadas em escalas de cinza. Já com a utilização do modo doppler colorido, o que se avalia é o fluxo sanguíneo através da velocidade da movimentação das hemácias, se distanciando ou se aproximando da probe. A imagem é processada e apresentada em cores, com imagens variando entre azul e vermelho formando pontos (pixel) marcados pelo fluxo sanguíneos. O doppler tem sido muito utilizada em diversos estudos recentes para avaliações uterinas, ovarianas, de corpo lúteo, oferecendo uma maior qualidade no diagnóstico de patologias, e no entendimento funcional e fisiológico do trato reprodutivo em equinos, bovinos cães e humanos (ACOSTA et al., 2004; GINTHER, 2007b; UTT, 2009; BATISTA, 2013).

Os estudos científicos com doppler iniciaram no final dos anos noventa com grande parte dos trabalhos focando avaliação uterina do folículo e do corpo lúteo. É uma importante ferramenta para o estudo da viabilidade endometrial, assim como para a interação conceito-maternal (FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2011).

Durante a fase de mobilidade embrionária em éguas Silva et al. (2005) estudaram as alterações na perfusão vascular endometrial que ocorrem de forma localizada em associação com mudanças da posição do conceito. De acordo com o mesmo estudo, éguas gestantes e não gestantes apresentam similar e baixa perfusão sanguínea endometrial nos oito primeiros dias pós-ovulação condição que muda com a presença do conceito.

A avaliação da perfusão sanguínea por meio de análises pelo sistema color doppler, pode ser mensurada em software de avaliação que mensuram os pontos e áreas coloridas (pixel) ou de forma subjetiva avaliando perfusão mínima e máxima como por escores de 1 a 4 por exemplo. Brogan et al. (2016) avaliaram perfusão sanguínea do corpo lúteo relacionada aos níveis de progesterona no dia 4 após a transferência do embrião em receptoras utilizando sistema da National Health Institutes, Bethesda, USA. A avaliação subjetiva por meio de escore de 1 a 4 ou por meio da avaliação do percentual de perfusão do folículo (0-100%) ou do corpo lúteo são métodos validos, segundo Ginther (2007b) e com boa aplicabilidade no campo.

Durante o ciclo estral, Bollwein (2002) pode observar que nos corpos lúteos há aumento no número de pixels, portanto de perfusão, que ocorre até o quinto dia após

a ovulação, mantendo-se até o sétimo dia, quando então, começa diminuir até aproximadamente o décimo quinto dia.

Cada vez mais a ultrassonografia doppler se estabelece como uma ferramenta importante e método diagnóstico auxiliar de grande valia em diversas fases na reprodução de equinos, como por exemplo, avaliando perfusão sanguínea do corpo lúteo e conseqüentemente sua funcionalidade e também avaliando perfusão vascular do endométrio que sofre alterações por fatores vasoativos em processos inflamatórios uterinos (FERREIRA; IGNÁCIO; MEIRA, 2011).

3 HIPÓTESES

- a) A administração de hCG, associada ou não ao meloxicam após a ovulação interfere na perfusão sanguínea uterina e do corpo lúteo, melhora as características e o desenvolvimento do corpo lúteo, consequentemente a produção de P_4 , o desenvolvimento embrionário e a taxa de gestação em éguas receptoras de embriões;
- b) A aplicação de hCG e meloxicam no momento da transferência do embrião interfere na perfusão sanguínea uterina e do corpo lúteo, no desenvolvimento e manutenção do corpo lúteo, consequentemente a produção de P_4 , o desenvolvimento embrionário e melhora a taxa gestação em receptoras de embriões;

4 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar se a aplicação de hCG associada ou não ao meloxicam no dia da ovulação influencia na perfusão sanguínea do corpo lúteo e no útero, no desenvolvimento do corpo lúteo, na taxa de gestação e no desenvolvimento embrionário nas éguas receptoras de embriões.
- Avaliar se a aplicação de hCG, associado ao meloxicam, no dia da transferência do embrião influencia na perfusão sanguínea do corpo lúteo e do útero, no desenvolvimento e manutenção do corpo lúteo, na taxa de gestação e no desenvolvimento embrionário nas éguas receptoras de embriões.

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 Local e período do experimento

O experimento foi realizado no município de Elias Fausto no Estado de São Paulo, no sítio Boa Esperança no qual foram mantidas as receptoras de embrião da empresa Vethy Serviços Veterinários Ltda. O período de execução do experimento foi de outubro de 2015 a março de 2016.

5.2 Animais

Neste experimento foram utilizadas como doadoras 40 fêmeas equinas com idades entre 3 e 18 anos das raças Mangalarga Marchador, Campolina, Quarto de Milha e Polo Argentina e, como receptoras, 60 fêmeas com idades entre 4 e 15 anos de raças variadas e na grande maioria mestiças SRDs (sem raças definidas).

As doadoras e receptoras aptas a serem incluídas no experimento, não apresentaram alterações de útero e de ovários detectáveis à palpação retal, e ao exame ultrassonográfico, boa condição de score corporal e ausência de alterações clínicas que poderiam comprometer o desempenho reprodutivo. Ainda, somente animais que apresentaram pelo menos dois ciclos estrais regulares foram incluídos no experimento. Os animais foram submetidos ao experimento dentro das normas de boas práticas de uso de animais e de acordo com autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, conforme certificado anexo no início desta Dissertação.

5.3 Manejo dos animais (nutricional e reprodutivo)

O manejo nutricional das receptoras foi feito em pastejo com esquema de rotação em piquetes de capim Mombaça (*Panicum maximum*), e suplementação com mineralização proteinada (KROMIUM PROTEICO® - Tortuga) “*ad libitum*”, e com 15 kg de cana de açúcar (*Saccharum spp*) picada divididos em dois tratos diários. Todas as receptoras estiveram sob rigoroso controle de Medicina Veterinária Preventiva (vacinações, vermifugações, etc.).

O manejo nutricional das doadoras, por se tratar de programa comercial de transferência de embriões, foi mantido em suas propriedades de origem e criatórios distintos, e esteve em manejos nutricionais e sanitários específicos. E da mesma forma sob rigoroso controle de medicina veterinária preventiva.

As doadoras foram avaliadas a cada 48 horas para detecção de folículos maiores que 35 mm, com edema uterino 2-3 (escala 1-4) (MCKINNON E SQUIRES 1988). A ovulação foi induzida com 250µg do análogo do GnRH Histrelina Acetato, (Strelin Botupharma, Botucatu, SP). Para a inseminação artificial com sêmen a fresco ou refrigerado, estes foram diluídos com meio diluente à base de leite em pó desnatado (Botusêmen®, Botupharma, Botucatu, SP.). A dose inseminante mínima foi 500 milhões de espermatozoides com motilidade. As colheitas de embriões foram realizadas 8 dias após a detecção da ovulação (D8) da doadora.

O manejo reprodutivo das receptoras foi realizado em dias alternados e, quando uma fêmea em estro apresentou um folículo ovariano de pelo menos de 35 mm e edema uterino 2-3 (escala 1-4), foi induzida à ovulação com 250 µg Histrelina Acetato, (Strelin - Botupharma, Botucatu, SP.), e avaliadas diariamente para detecção da ovulação (D0). Receberam embriões as receptoras que estavam entre os dias 4 e 8 após a ovulação (D4-D8), ainda, com boa avaliação quanto ao corpo lúteo e ao útero, ou seja, bom tônus uterino e cervical e sem presença de alterações na avaliação ultrassonográfica.

5.4 Delineamento experimental

❖ Tratamentos

As receptoras (n=60) foram aleatoriamente divididas em 4 grupos (G) e receberam os seguintes tratamentos:

- **T1 controle (n=15)** - Controle, Solução salina (Sanobiol®) 5 mL, IM no dia da ovulação;
- **T2 hCG OV (n=15)** – 2.500 UI de hCG (Vetecor®), IM no dia da ovulação da receptora;
- **T3 hCG/meloxicam OV (n=15)** – 2.500 UI de hCG, I.V. (Vetecor®) e 0,6 mg/kg de meloxicam, IM (Maxicam®) no dia da ovulação da receptora;

- **T4 hCG/meloxicam TE (n=15)** – 2.500 UI de hCG, I.V. (Vetecor®) e 0,6 mg/kg de meloxicam, IM (Maxicam®), no momento da transferência do embrião;

5.5 Colheita e avaliação dos embriões

As colheitas foram realizadas por meio de lavado uterino com cateter de silicone, modelo (Bivona®) nº 28 ou 30, esterilizada em autoclave e acoplada a equipo tipo Y e filtro coletores ambos esterilizados em oxido de etileno. O volume utilizado de 3 litros de solução Ringer com lactato (J. P. Indústria Farmacêutica), um litro por vez para lavagem uterina, realizando massagem durante recuperação do segundo e terceiro litro. Após a lavagem o conteúdo do filtro transferido para uma placa de “Petri” de 100 x 20 mm e avaliado em Lupa Estereoscópica com aumentos de 20 e 40 vezes para localização do embrião.

Após avaliação morfológica, os embriões classificados de grau 1 (ótimo) na escala de 1 a 4 (MCKINNON E SQUIRES,1988), receberam lavagens consecutivas em 10 gotas de solução “holding” (Botuembryo®, Botupharma, Botucatu, SP) para a retirada de possíveis contaminantes e sujidades para serem envasados. Os embriões a serem transferidos foram acondicionados em palhetas de inseminação artificial (0,50 ml), modelo francesa, respeitando-se a seguinte sequência: coluna de meio holding + coluna de ar + coluna de meio contendo o embrião + coluna de ar + coluna de meio. A transferência foi realizada pela técnica não cirúrgica transcervical (FLEURY et al. 1987).

Todas as colheitas, as avaliações e as transferências dos embriões foram realizadas por um mesmo técnico. Não houve conhecimento prévio do grupo de tratamento ao qual o animal pertence para evitar possíveis influências nas avaliações realizadas.

5.6 Mensurações do corpo lúteo e do embrião

A área do corpo lúteo de cada receptora de embrião foi mensurada no dia da transferência do embrião, dia do diagnóstico de gestação, ou seja, sete dias após a T.E., e 21 dias após a transferência, através da mensuração de imagem congelada com o maior corte do corpo lúteo e medida realizada na função elipse do ultrassom Mindray M5 VET® resultando em valor da área em mm². Ainda, a área da vesícula

embrionária foi mensurada no sétimo dia após a T.E., no qual foi o dia do diagnóstico de gestação. Da mesma forma no vigésimo primeiro dia após a transferência do embrião, o tamanho do embrião calculado levando-se em consideração a média da medida em duas imagens transversais congeladas. Todas as mensurações de corpo lúteo e embrião foram realizadas utilizando-se o modo B do aparelho de ultrassom doppler colorido (Mindray M5 VET®).

5.7 Avaliação da perfusão sanguínea do corpo lúteo e útero

O corpo lúteo de cada égua foi avaliado em gravações de 20 segundos realizadas pelo modo Doppler Colorido com frequência 4.2 mHz, ganho 62, IP7, velocidade de detecção de fluxo 4,1 cm/s, filtro 100Hz, no aparelho Mindray (M5 VET®), contendo corte central da maior área do mesmo e usando a graduação com escala percentual (0-100%) de perfusão da área do corpo lúteo de acordo com adaptação de Ginther (2007b). A mensuração ocorreu no momento da transferência do embrião, sete dias após a TE (diagnóstico da gestação) e também no dia 21 após a TE. (Figura 1).

No momento da transferência do embrião o útero foi avaliado, com mesmas configurações, em cine de 20 segundos em um mesmo local pré-estabelecido (corte realizado no corno direito próximo ao corpo do útero) utilizando graduações de 1 a 4 (1 pouca irrigação e 4 mais irrigado), conforme adaptação de Ginther (2007b). (Figura 2). A avaliação foi repetida no momento do diagnóstico 7 dias após a TE, da mesma forma, porém para as éguas com prenhes confirmada se estabeleceu o local de avaliação como sendo onde há presença da vesícula embrionária. (Figura 3). Da mesma forma se, mensurou no dia 21 após a TE, ou seja, no local da presença da vesícula. (Figura 4).

Figura 1 - Imagens de Collor-Doppler ultrassom de éguas receptoras de embriões representando diferentes padrões da avaliação subjetiva do percentual de perfusão sanguínea do corpo lúteo de 0 a 100%. A=10%; B=20%; C=30%; D=40%; E=50%; F=60%; G=75%; H=85%; I=95%.

Fonte: (DERCOLI,2017).

Figura 2- Imagens de Collor-Doppler ultrassom de éguas receptoras de embriões representando diferentes padrões da avaliação subjetiva do escore de perfusão sanguínea do endométrio de 1 a 4 no dia da TE. A=1; B=2; C=3; D=4.

Fonte: (DERCOLI,2017).

Figura 3- Imagens de Collor-Doppler ultrassom de éguas receptoras de embriões representando diferentes padrões da avaliação subjetiva do escore de perfusão sanguínea do endométrio de 1 a 4 no 15º dia da gestação: A=2, B=3, C=4.

*Não foi observado padrão 1 nas avaliações subjetivas.

Fonte: (DERCOLI,2017).

Figura 4- Imagens de Collor-Doppler ultrassom de éguas receptoras de embriões representando diferentes padrões da avaliação subjetiva do escore de perfusão sanguínea do endométrio de 1 a 4 no 29º dia da gestação. A=2, B=3, C=4.

*Não foi observado score 1 nas avaliações subjetivas.

Fonte: (DERCOLI,2017).

5.8 Dosagens plasmática de progesterona

Para as dosagens plasmáticas de progesterona, no dia da TE, no dia 7 após a TE, ou seja, dia do diagnóstico de gestação e no dia 21 após a TE (para as diagnosticadas prenhes no dia 7) foram colhidas amostras de sangue obtidas por punção da veia jugular, com auxílio de um tubo heparinizado “*vacutainer*”.

Após a colheita, as amostras de sangue foram mantidas a 4°C (no máximo três horas) até a centrifugação a 1000g por 5 minutos e extração do plasma, quando então foram armazenadas a -18°C em tubos plásticos de 1,5ml de modelo Ependorf, com volume de 1,5 mL, perfeitamente identificados para posteriores avaliações hormonais.

Foi utilizada a técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida o conjunto comercial Immunotech, Beckman Coulter, cód IM1118. Os ensaios de progesterona foram realizados no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo com padrões de rotina de controle de qualidade.

5.9 Análises estatísticas

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias. Quando a normalidade e/ou homogeneidade do teste foi significativa ($P < 0,05$), os dados foram transformados e reavaliados. Comparações entre os grupos foram analisadas para efeitos principais de tratamento e tempo, assim como para efeito de interação tratamento x tempo. As análises foram realizadas pelo procedimento misto (PROC MIXED) do SAS (Versão 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) utilizando a função *repeated* para a autocorrelação entre mensurações sequenciais. Quando o efeito principal de tratamento ou tempo foi significativo, as diferenças foram localizadas através do Teste de Tukey. Quando o efeito de interação foi significativo, as diferenças foram localizadas através do procedimento PDIFF do SAS. Dados que, mesmo após transformação, continuaram sendo significativos nos testes de normalidade e/ou homogeneidade, foram analisados por estatística não-paramétrica de ordem (Teste de Kruskal-Wallis). Dados com fator único foram avaliados por ANOVA. Dados de fertilidade foram avaliados pelo procedimento GLIMMIX (PROC GLIMMIX) do SAS. A probabilidade de $P \leq 0,05$ foi considerada como diferença significativa e probabilidade entre $P > 0,05$ e $\leq 0,1$ foi considerada como diferença aproximando-se de ser significativa (tendência estatística). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), a não ser por indicação contrária.

6 RESULTADOS

6.1 Taxa de gestação

Foram analisados os dados resultantes de 60 transferências de embriões pelo método não cirúrgico no qual resultaram em 44 receptoras gestantes (73.33%). Sendo, o diagnóstico de gestação realizado no sétimo dia após a transferência do embrião. (Tabela 1).

Não foram observadas diferenças significativas ($P>0,05$) na taxa de gestação entre os tratamentos utilizados. No entanto, os tratamentos 3 e 4, nos quais foi utilizado anti-inflamatório meloxicam, apresentaram 80.00% de taxa gestação enquanto os tratamentos 1 e 2, sem aplicação do meloxicam apresentaram 66,67%. Portanto, embora não tenhamos encontrado diferenças estatísticas, houve incremento de 13,33% nos índices de gestação para os tratamentos 3 e 4. (Tabela 1).

Tabela 1 – Taxa de gestação (%) no sétimo dia (D7) após a transferência do embrião nas receptoras quando submetidas a diferentes tratamentos.

	Tratamento				Média
	controle	hCG OV	hCG/Meloxicam OV	hCG/Meloxicam TE	
Gestação	66.67 (10/15)	66.67 (10/15)	80.00 (12/15)	80.00 (12/15)	73.33 (44/60)

$P>0,05$

controle = Controle, 2 ml de solução fisiologia intramuscular no dia da ovulação.

hCG OV = 2500 UI de hCG no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam OV = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam TE = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da TE.

6.2 Área do corpo lúteo

Os tratamentos realizados não exerceram influência significativa ($P > 0,05$) sobre a área do CL nos períodos analisados. (Tabela 2)

Houve um decréscimo na área mensurada em mm^2 , nos dias 7 e 21 após a TE ($P < 0,05$) no momento da transferência do embrião (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias $\pm$ erro padrão da área (mm^2) do corpo lúteo nos dias zero (D0), sete (D7) e vinte (D21) após a transferência do embrião em receptoras, quando submetidas a diferentes tratamentos.

Tempo	Tratamento				Média
	controle	hCG OV	hCG/Meloxicam OV	hCG/Meloxicam TE	
D0	55,4 $\pm$ 5	61,0 $\pm$ 4	68,4 $\pm$ 4	55,9 $\pm$ 4	60,2 $\pm$ 2 ^A
D7	43,2 $\pm$ 3	50,0 $\pm$ 4	51,4 $\pm$ 4	46,0 $\pm$ 3	47,6 $\pm$ 2 ^B
D21	42,7 $\pm$ 2	48,6 $\pm$ 6	43,4 $\pm$ 2	44,5 $\pm$ 3	44,7 $\pm$ 2 ^B
Geral	47,6 $\pm$ 2	53,8 $\pm$ 3	55,2 $\pm$ 3	49,2 $\pm$ 2	51,5 $\pm$ 1

A,B Colunas com letras sobrescritas maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

controle = 2 ml de solução fisiologia intramuscular no dia da ovulação.

hCG OV = 2500 UI de hCG no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam OV = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam TE = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da TE.

6.3 Perfusão sanguínea do corpo Lúteo

Não foi observado influência dos tratamentos propostos na perfusão sanguínea média dos corpos lúteos nos momentos avaliados (Tabela 3).

No entanto houve no tratamento controle (solução fisiológica no dia da ovulação) no momento do diagnóstico de gestação D7, uma diminuição significativa ($P < 0,05$) do percentual de perfusão sanguínea do CL, comparado aos outros momentos (D0 e D21) do mesmo tratamento.

No tratamento 4 (meloxicam e hCG no dia da TE) também houve diferença, mas neste caso, com aumento significativo na perfusão no momento D21 comparado ao D0 e D7 (Tabela 3).

Tabela 3. Médias $\pm$ erro padrão da perfusão sanguínea (%) do corpo lúteo nos dias zero (D0), sete (D7) e vinte um dia (D21) após a transferência do embrião em receptoras quando submetidas a diferentes tratamentos.

Tempo	Tratamento				Média
	Controle	hCG OV	hCG/Meloxicam OV	hCG/Meloxicam TE	
D0	75,00 $\pm$ 5,73 ^A	80,33 $\pm$ 3,50	81,33 $\pm$ 4,40	76,67 $\pm$ 4,59 ^B	78,33 $\pm$ 2,28
D7	61,67 $\pm$ 5,58 ^B	69,00 $\pm$ 6,40	78,33 $\pm$ 4,70	70,67 $\pm$ 6,15 ^B	69,92 $\pm$ 2,90
D21	81,11 $\pm$ 3,44 ^A	82,78 $\pm$ 5,53	78,33 $\pm$ 5,53	88,50 $\pm$ 4,60 ^A	82,50 $\pm$ 2,58
Geral	71,28 $\pm$ 3,44	76,54 $\pm$ 3,16	79,40 $\pm$ 2,73	77,38 $\pm$ 3,22	76,22 $\pm$ 1,57

A, B Colunas com letras sobscritas maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

controle = 2 ml de solução fisiologia intramuscular no dia da ovulação.

hCG OV = 2500 UI de hCG no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam OV = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam TE = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da TE.

Houve diferença ($P < 0,05$) com o percentual de perfusão sanguínea média menor para éguas vazias e maiores para as gestantes, porem de forma geral e sem que houvesse influência exercida pelos tratamentos nestes resultados. No entanto, os tratamentos 2 (hCG no momento da ovulação) 3 (hCG + meloxicam no momento da ovulação) e 4 (hCG + meloxicam no dia da TE) apresentaram uma diferença numérica interessante para os percentuais de perfusão sanguínea do corpo lúteo nas receptoras gestantes comparando com as do grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4 – Médias $\pm$ erro padrão da perfusão sanguínea (%) do corpo lúteo no sétimo dia (D7) após a transferência do embrião nas receptoras gestantes e vazias quando submetidas a diferentes tratamentos

Tempo	Tratamento				Média
	controle	hCG OV	hCG/Meloxicam OV	hCG/Meloxicam TE	
Vazia n (16)	53,00 $\pm$ 6,24 n (5)	54,00 $\pm$ 12,79 n (5)	53,33 $\pm$ 16,41 n (3)	71,67 $\pm$ 1,67 n (3)	56,88 $\pm$ 5,20 ^B
Gestantes n (44)	66,00 $\pm$ 7,59 n (10)	76,50 $\pm$ 6,37 n (10)	84,58 $\pm$ 2,26 n (12)	70,42 $\pm$ 7,75 n (12)	74,66 $\pm$ 3,22 ^A
Geral	61,67 $\pm$ 5,58	69,00 $\pm$ 6,40	78,33 $\pm$ 4,70	70,67 $\pm$ 6,15	69,92 $\pm$ 2,90

A,B Colunas com letras sobrescritas maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

controle = 2 ml de solução fisiologia intramuscular no dia da ovulação.

hCG OV = 2500 UI de hCG no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam OV = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam TE = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da TE.

6.4 Perfusão sanguínea do útero

Na avaliação do escore de perfusão sanguínea uterina no momento da transferência do embrião (D0) foi notado maior escore para os grupos tratados comparados com o controle. (Tabela 5)

Nos momentos subsequentes não houve interferência dos tratamentos na perfusão sanguínea uterina.

Tabela 5 – Médias $\pm$ erro padrão da perfusão sanguínea uterina nos dias zero (D0), sete (D7) e vinte (D21) após a transferência do embrião em receptoras, quando submetidas a diferentes tratamentos.

Tempo	Tratamento				Média
	controle	hCG OV	hCG/Meloxicam OV	hCG/Meloxicam TE	
D0	2.27 $\pm$ 0.31 ^{*Cb}	2.93 $\pm$ 0.27 ^{Bab}	3.17 $\pm$ 0.18 ^a	3.22 $\pm$ 0.19 ^{Ba}	2.90 $\pm$ 0.13
D7	2.97 $\pm$ 0.17 ^{*B}	3.30 $\pm$ 0.22 ^B	3.03 $\pm$ 0.19	3.00 $\pm$ 0.18 ^B	3.08 $\pm$ 0.09
D21	3.60 $\pm$ 0.12 ^A	3.89 $\pm$ 0.07 ^A	3.54 $\pm$ 0.11	3.77 $\pm$ 0.12 ^A	3.69 $\pm$ 0.06
Geral	2.86 $\pm$ 0.16	3.29 $\pm$ 0.14	3.23 $\pm$ 0.10	3.29 $\pm$ 0.11	3.17 $\pm$ 0.07

Médias na mesma coluna com letras sobrescritas maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Médias na mesma linha com letras sobrescritas minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis

* Colunas ou linhas com asterisco sobrescrito indicam tendência de diferença estatística ($P \leq 0,10$), pelo teste de Kruskal-Wallis, entre tratamentos ou dias especificados.

controle = 2 ml de solução fisiologia intramuscular no dia da ovulação.

hCG OV = 2500 UI de hCG no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam OV = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam TE = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da TE.

6.5 Desenvolvimento embrionário

Não foi observado efeito de tratamento ou interação tratamento x tempo no desenvolvimento embrionário nos dias 7 e 21 após a TE. Entretanto houve efeito de tempo ($P < 0,05$) como esperado para desenvolvimento da vesícula entre D7 e D21 (Tabela 6).

Tabela 6 - Médias $\pm$ erro padrão da área da vesícula (mm^2) embrionária nas receptoras no dia do diagnóstico de gestação (D7) e vinte um dia (D21) após a transferência, quando submetidas a diferentes tratamentos.

Tempo	Tratamento				Média
	controle	hCG OV	hCG/Meloxicam OV	hCG/Meloxicam TE	
D7	36,7 $\pm$ 0.4	30,1 $\pm$ 0.2	26,1 $\pm$ 0.3	29,5 $\pm$ 0.2	30,3 $\pm$ 0.2 ^B
D21	135,8 $\pm$ 0.6	153,9 $\pm$ 0.4	143,1 $\pm$ 0.5	144,7 $\pm$ 0.8	144,3 $\pm$ 0.3 ^A
Geral	8.63 $\pm$ 1.20	9.20 $\pm$ 1.44	8.46 $\pm$ 1.25	8.46 $\pm$ 1.29	8.67 $\pm$ 0.64

A,B,C Colunas com letras sobrescritas maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis

controle = 2 ml de solução fisiologia intramuscular no dia da ovulação.

hCG OV = 2500 UI de hCG no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam OV = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam TE = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da TE.

Não houve diferença no desenvolvimento embrionário avaliando o tamanho médio do embrião que foi de 1,23 cm entre os tratamentos no dia 21 após a TE (Tabela 7).

Tabela 7 – Médias $\pm$ erro padrão do tamanho do embrião (cm) nas receptoras no vigésimo primeiro dia após a TE quando submetidas a diferentes tratamentos.

Tempo	Tratamento				Média
	controle	hCG OV	hCG/Meloxicam OV	hCG/Meloxicam TE	
D21	1.24 $\pm$ 0.04	1.22 $\pm$ 0.04	1.23 $\pm$ 0.03	1.23 $\pm$ 0.03	1.23 $\pm$ 0.02

$P > 0.05$

controle = 2 ml de solução fisiologia intramuscular no dia da ovulação.

hCG OV = 2500 UI de hCG no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam OV = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam TE = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da TE.

Houve uma perda embrionária entre os dias sete (D7) e vinte e um (D21) de gestação em uma égua, portanto, não houve mensurações referentes à perfusão sanguínea do CL, perfusão sanguínea do útero, tamanho da vesícula e do embrião na última análise no D21 deste animal.

6.6 Concentrações plasmáticas de progesterona

Não foi encontrada diferença significativa ($P > 0,1$) nas concentrações de progesterona plasmática nos momentos avaliados independente do tratamento. No entanto, na média geral dos tratamentos foi observada redução da concentração plasmática de progesterona entre o D0, o D7 e o D21 (Tabela 8).

Tabela 8 - Médias $\pm$ erro padrão da progesterona plasmática (ng/ml) em receptoras, nos dias zero (D0), sete (D7) e vinte e um (D21) após a transferência do embrião, quando submetidas a diferentes tratamentos.

Tempo	Tratamento				Média
	controle	hCG OV	hCG/Meloxicam OV	hCG/Meloxicam TE	
D0	15.84 $\pm$ 1.16	14.56 $\pm$ 1.39	14.11 $\pm$ 0.91	11.26 $\pm$ 0.93	13.94 $\pm$ 0.59 ^A
D7	9.63 $\pm$ 1.18	10.67 $\pm$ 1.78	9.61 $\pm$ 0.69	10.05 $\pm$ 1.13	9.99 $\pm$ 0.61 ^B
D21	10.24 $\pm$ 0.94	10.31 $\pm$ 1.30	9.12 $\pm$ 0.97	10.8 $\pm$ 1.47	10.11 $\pm$ 0.59 ^B
Geral	12.11 $\pm$ 0.80	12.04 $\pm$ 0.94	11.13 $\pm$ 0.60	10.69 $\pm$ 0.65	11.49 $\pm$ 0.38

A,B,C Colunas com letras sobrescritas maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

controle = 2 ml de solução fisiologia intramuscular no dia da ovulação.

hCG OV = 2500 UI de hCG no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam OV = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da ovulação.

hCG/Meloxicam TE = 2500 UI de hCG e 6.6mg/kg de Meloxicam no dia da TE.

7 DISCUSSÃO

Na espécie equina, as taxas de gestação encontradas na literatura para receptoras de embriões que foram transferidas pela técnica não cirúrgica no período entre 3 e 9 dias de ovuladas, são descritas com variações entre 60 e 78% (CARNEY, 1991; FLEURY et al., 2001; JACOB et al., 2012; PEDERSEN, 2016), números estes que são condizentes com os encontrados em nosso experimento que apresentaram variação de 66,67% a 80% entre os grupos tratados.

A manipulação do trato reprodutivo em receptoras na espécie equina, no momento da transferência de embriões, pode promover, por estímulos mecânicos, liberação de prostaglandinas resultantes da ativação de mediadores inflamatórios e liberação da cascata do ácido araquidônico, resultando em um dano ao corpo lúteo, podendo refletir em menores taxas de gestação nos programas de transferência de embriões (SIROIS et al., 1987; KASH K, 1997; KOBLISCHKE et al., 2008; KOBLISCHKE et al., 2010).

A aplicação de anti-inflamatório para inibir a liberação de prostaglandina que pode ocorrer no ato da transferência vem sendo estudada em espécies animais que utilizam técnica de transferência não cirúrgica como nos bovinos e equinos, porém, até o momento não há relato na espécie equina, com a utilização de meloxicam neste período da transferência de embriões em receptoras. Na espécie bovina sua utilização resultou em melhora significativa nos índices de gestação de receptoras (LOPES, 2015). No mesmo estudo houve a melhora na taxa de gestação nas receptoras que foram tratadas com meloxicam no momento da TE, no entanto não foram encontradas diferenças nos níveis sistêmicos de prostaglandina por meio da dosagem do metabolito 13,14-dihidro-15-ceto-PGF₂ α (PGFM).

De acordo com os resultados obtidos nas éguas receptoras, o meloxicam pode da mesma forma, melhorar as taxas de gestação e, embora sem diferença estatística ($P>0,05$), houve diferença numérica com incremento de 13,3% na taxa de gestação, que corresponde a um grande incremento nos programas comerciais de TE, além disso, possivelmente, aumentando o número de animais por tratamento, se consiga ter suporte estatístico.

Da mesma forma, sem apontar uma diferença estatística, Koblischke et al. (2010) concluíram que o uso do anti-inflamatório flunixin meglumine e vedaprofeno, nas éguas receptoras, na dose de 1.1mg/Kg no dia da TE seguido de 3 dias de

tratamento com 2mg/kg de vedaprofeno duas vezes ao dia, contribuiu para obtenção de melhores índices de prenhez em programas de transferência de embriões em equinos, indicando este tratamento para rotinas de centrais e haras. Em outro estudo com o uso de ácido meclofenâmico e flunexin meglumine Koblischke et al., 2008 chegaram à mesma conclusão. Neste trabalho analisaram por meio de histologia endometrial, 4 dias após TE, as expressões para mRNA para COX-2, PGE, receptores de oxitocina, receptores de estrógeno e receptores de progesterona, por meio de imunohistoquímica e PCR nas éguas tratadas e controle. Ainda, o ácido meclofenâmico apresentou menor interferência na síntese de prostaglandinas (PGEs), assim, possivelmente, não inibiu a mobilidade embrionária que é importante para o reconhecimento materno da gestação, e que de certa forma, poderia ser um efeito colateral ao uso de anti-inflamatórios no período inicial da gestação.

Estudos que contradizem a utilização do anti-inflamatório flunexin meglumine como ferramenta para melhorar os índices de gestação, devido queda nas taxas de gestação em grupos de receptoras tratadas com esta droga, também atribuem esta interferência negativa ao fato da inibição da PGE (RENATO et al., 2005). A ação do flunexin meglumine e do meloxicam em inibir COX-1 ou COX -2 seletivamente ocorrem de forma diferente (BERETA et al., 2005), fato que pode influenciar de forma distinta no reconhecimento materno ou nos processos inflamatórios podendo levar a diferenças entre resultados. Possivelmente o aumento percentual de receptoras prenhes tratadas com meloxicam se deve a proteção contra os processos inflamatórios uterinos estimulados pela manipulação na TE e/ou prévios. Desta forma inflamações podem não ser detectáveis pelas avaliações de rotina das receptoras de embriões no entanto podem influenciar nos resultados finais.

O Estudo com a utilização da hCG para induzir a ovulação ou, no dia seguinte buscando o efeito luteotrófico, por conseguinte melhoras nas características reprodutivas, foi realizado por Fleury et al., (2007). Os resultados mostraram tendência de melhores taxas de gestação; contudo, os autores fazem referência ao pequeno número de repetições.

A diferença numérica para a taxa de gestação observadas no presente estudo ocorreram nos tratamentos que, como no trabalho de Fleury et al., (2007), receberam hCG no dia da ovulação e no dia da transferência do embrião. No entanto, foi observado que, somente os grupos três e quatro, nos quais houve a associação do meloxicam, foi notada diferença numérica. Sendo assim, fica sugerido que as

diferenças encontradas se devem pela ação anti-inflamatória do meloxicam e não pela ação luteotrófica da hCG.

Uma queda na taxa de gestação com a aplicação da hCG, no dia da TE foi observada por McCue et al (2014) comparando três tratamentos: 2.500UI de hCG, 50µg de deslorelina e controle 1 ml de solução fisiológica, perfazendo um total de 183 receptoras transferidas e foi atribuído pelos autores estes resultados possivelmente pela aplicação ter sido em fase tardia do diestro ou em múltiplos dias do diestro o que se assemelha ao que foi aplicado neste estudo no que diz respeito ao período das receptoras, também em múltiplos dias (4 a 8 dias do diestro), no entanto, ao associar o meloxicam com aplicação da hCG os resultados que obtivemos foram com taxa de gestação melhor e não pior, o que pode reforçar a hipótese do possível efeito benéfico do meloxicam na melhoria da taxa de gestação.

Não foi demonstrado interferência da hCG nas taxas de gestação no presente estudo já que nos tratamentos dois, três e quatro, ambos tratados com hCG, somente no três e quatro houve melhora numérica da taxa gestação, grupos estes tratados com meloxicam.

A taxa de gestação bem como o desenvolvimento e função do corpo lúteo não foram alterados durante a fase inicial da gestação pela indução da ovulação pela hCG em éguas puro-sangue de corrida, ocorrendo sim tendência a piora na taxa de gestação, justificada neste caso pelos autores ao número de animais incluídos no estudo (33 éguas) (URQUIETA et al., 2009).

Ao analisar a área do corpo lúteo, foi observada uma diminuição progressiva a partir do dia ovulação e foi atribuída à imaturidade e desorganização na fase inicial de formação do corpo lúteo (BROGAN et al., 2016). Tal fato foi observado nos resultados, nos quais as mensurações no momento da transferência, com o corpo lúteo de idade entre 4 e 8 dias apresentou média da área de 60,2 mm², baixando para 47,6 mm² de área no dia 7 após a TE e 44,7 mm² no dia 21 após a TE. A diminuição na área do CL foi acompanhada de diminuição do nível plasmático médio de progesterona.

Arruda et al. (2001), observaram também diminuição do corpo lúteo do D2, dia que o CL tem o seu maior tamanho, para o D8 pós-ovulação, resultado que já havia sido observado também previamente por Arruda, (1995) e relacionado a absorção dos coágulos e substituição por células luteais. Da mesma maneira, a diminuição da área foi observada por Šlichtař et al., (2013), condizendo com resultados observados neste estudo.

A aplicação da hCG estando ou não associado ao meloxicam, não exerceu influência na área do corpo lúteo, o mesmo foi observado por Köhne et al. (2014), na fase inicial de formação do CL. O efeito luteotrófico da hCG poderia estar relacionado, em tese, a um aumento de área funcional do corpo lúteo mas isto não pode ser observado neste experimento.

Ao mensurar a perfusão sanguínea do corpo lúteo Alonso, (2014) concluiu que não ocorreu diferença neste parâmetro pela aplicação da hCG usado como indutor de ovulação, no dia da ovulação ou cinco dias após; este resultado se equipara ao que foi encontrado com as aplicações da hCG no momento da ovulação e no dia da transferência do embrião, independente se associado ou não ao anti-inflamatório meloxicam.

Um decréscimo na perfusão sanguínea do CL no período pré-luteólise pode ser observado em estudos de Ginther et al., (2007a) em éguas não gestantes. Este fato pode estar associado ao início da perda funcional do CL neste período. Nos resultados do presente estudo foi observado decréscimo na perfusão sanguínea no grupo controle ($P < 0,05$) no dia do diagnóstico de gestação, fato que não ocorreu da mesma forma com os grupos dois, três e quatro do experimento que receberam tratamento. Desta maneira, podemos raciocinar que é possível que ocorra uma interferência na vascularização luteínica pela aplicação da hCG, porém estudos futuros são necessários para confirmar esta hipótese.

O possível incremento no fluxo sanguíneo do CL, exercido pela hCG, decorre da uma ação direta nos tecidos dos vasos sanguíneos no ovário, já observados em experimentos prévios que analisaram ação do LH diretamente nestes tecidos (BRITO et al., 2017).

Neste estudo o aumento da vascularização ocorreu em todos os grupos no segundo diagnóstico de gestação, independente dos tratamentos, podendo estar relacionado a funcionalidade do corpo lúteo nas éguas que se encontram gestantes neste período.

Brogan et al. (2016) não encontraram diferença para circulação do corpo lúteo entre éguas receptoras gestantes ou não gestantes no quarto dia após a transferência. Os autores atribuíram isto a uma pré-seleção das receptoras, número reduzido de animais por grupo estudado, também ao fato de que, geralmente as receptoras a serem usadas apresentam ovulação posterior à doadora, o que as distanciam mais de uma fase de pré-luteólise no dia da TE, período onde poderia estar havendo uma diminuição

de vascularização. Porém, embora em condições similares de avaliação, foi encontrado em contraste com a sua análise, diferença estatística no fluxo sanguíneo do CL entre os grupos de éguas prenhes e não prenhes. Isto pode ser explicado pelo fato de sua primeira análise ter sido feita 4 dias após a TE, o que neste estudo termos feito de maneira mais tardia, 7 dias após a TE, podendo receptoras não gestantes mais próximas de fase de luteólise terem influenciado neste resultado em nosso experimento. Já Šichtař et al. (2013) observaram uma diferença em éguas vazias no fluxo sanguíneo do corpo lúteo com início a partir do decimo sexto dia pós-ovulação.

As avaliações realizadas no corpo lúteo reforçam que, a avaliação da perfusão sanguínea pelo sistema Doppler colorido em determinados momentos, pode ser um parâmetro válido correlacionado a qualidade do corpo lúteo, como observado também por Ferreira; Meira, (2011) em revisão.

Avaliando a perfusão sanguínea da artéria uterina em éguas de diferentes idades e tratadas com hCG, Turna Yilmaz et al. (2014) não observaram diferenças consistentes relacionadas a este parâmetro, assim como em outro estudo com éguas tratadas com hCG em momentos diferentes (ALONSO et al., 2014). Foram observadas divergências com os resultados anteriores perante a análise da perfusão sanguínea do útero no momento da transferência do embrião, sendo que o grupo controle apresentou uma menor perfusão uterina frente aos demais grupos tratados. Já no terceiro momento de avaliação, vinte um dia após a transferência do embrião, um incremento da perfusão sanguínea uterina em todos os grupos foi observado, fato que podemos julgar como esperado, já que neste momento, todas as receptoras, independente do grupo, tem a presença do conceito e o incremento da perfusão pós-fixação ocorre de forma significativa (SILVA et al., 2011). Este parâmetro não foi influenciado pelos tratamentos utilizados neste experimento. Embora houvesse uma expectativa de que uma ação anti-inflamatória pudesse ocorrer pela aplicação do meloxicam e influenciar na perfusão sanguínea uterina, isto não foi observado. Não encontramos diferença na perfusão sanguínea do útero pela aplicação de meloxicam.

O desenvolvimento embrionário foi avaliado pela medida da área da vesícula no dia do diagnóstico de gestação, que correspondeu a diferença de tamanho entre 15 e 29 dias do crescimento do embrião não foi afetado pelos tratamentos, ou seja, a hCG e o meloxicam não influenciaram no crescimento embrionário. Tais achados diferem do que foi observado por Kohne et al. (2014) ao mensurar o tamanho do embrião entre 30 e 40 dias de idade em éguas tratadas com hCG onde embriões destes grupos eram

maiores. Neste sentido, pode ser que o maior tamanho dos embriões observado pelos autores seja pelo fato de que as mensurações terem sido realizadas posteriores aos 30 dias, diferente deste estudo. Vale citar que no estudo de Kohne et al. (2014) foram observados também aumento do nível de progesterona, diferente dos resultados por nós encontrado. Ainda, no mesmo experimento, Kohne et al. (2014) não observaram diferenças no desenvolvimento embrionário das éguas quando o tratamento foi realizado no dia 5 após ovulação com 5.000UI de hCG. Isto foi explicado devido ao estímulo e resposta das células luteais à aplicação da hCG deve ocorrer somente na fase de formação do corpo lúteo e não com o CL já formado. O maior desenvolvimento embrionário está baseado na influência da progesterona agindo nos receptores endometriais, e isto pode ocorrer por aplicação exógena de progesterona ou pelo efeito luteotrófico da hCG que aumentaram as concentrações da progesterona, o que foi visto em outro estudo onde éguas foram suplementadas com progesterona (WILLMAN, 2011).

As concentrações plasmáticas de progesterona para éguas gestantes variaram entre 3 e 12 ng/mL entre 24 horas e 21 dias respectivamente, após a ovulação (KRAKOWSKI et al., 2011). Allen (2001) encontrou concentrações de 10 a 15 ng/mL por volta dos 5 dias após ovulação e 3 a 5 ng/mL por volta dos 35 dias de gestação. Da mesma forma no presente estudo foi observada uma queda nos níveis de P_4 comparando as medias dos níveis do dia da transferência do embrião (13,94 ng/ml), onde as éguas estavam no momento entre 4 e 8 dias após a ovulação e o momento do diagnóstico onde estavam entre 11 e 15 dias após ovulação (9,99 ng/ml), e estavam mais baixos também na terceira avaliação (11,11 ng/ml). Por outro lado não ocorreu relação com aumento de progesterona para os grupos tratados. Brito et al. (2017), observaram tendência estatística para maior concentração de progesterona em grupos tratados com GnRH e hCG frente grupo controle, mas relacionou este fato às melhores concentrações prévias ao tratamento, não sendo no estudo citado por eles um aumento consistente de progesterona pela aplicação de GnRH ou hCG. Köhne et al. (2014) encontraram maiores concentrações plasmáticas de progesterona ($P < 0,05$) do dia 1 ao dia 5 pós ovulação para grupo de éguas induzidas com hCG.

Já ao aplicar a hCG para induzir a ovulação de receptoras, um dia após a ovulação e no dia da transferência do embrião, Fleury et al. (2007) observaram maiores concentrações de progesterona em grupo tratados frente ao controle quando a análise foi realizada no dia 4 após ovulação mas não nos demais dias analisados (0,

2, 6). No presente estudo foi realizada a primeira mensuração de progesterona plasmática no dia da transferência somente, onde as éguas estavam em dias entre 4 e 8 após ovulação, o que pode justificar a ausência de diferença estatística.

8 CONCLUSÃO

Com este estudo podemos concluir que:

- Não existe efeito na perfusão sanguínea uterina e do corpo lúteo, no desenvolvimento embrionário e nas concentrações plasmáticas de progesterona em receptoras de embriões equinos tratadas com hCG ou com hCG associado ao meloxicam no dia da ovulação e da transferência do embrião.
- Existem pela aplicação de meloxicam indícios de que haja melhora nos índices de gestação, podendo estar associado ao efeito anti-inflamatório seletivo COX-2 desta droga, o que pode melhorar os resultados em programas comerciais de transferência de embriões em equinos.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Differential blood flow changes between the future dominant and subordinate follicles precede diameter changes during follicle selection in Mares 1. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 502–507, 2004.
- ALLEN, W. R. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, Issue 3-4, p. 113-122, 2001.
- ALONSO, M. A.; SILVA, L. A.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; CELEGUINI, F. C. C.; LANÇONI, R.; CARVALHO, H. F.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; RODRIGUEZ, M. P.; LEITE, T. G.; ARRUDA, R. P. Effect of hCG application in three different moments of the estrous cycle on ovarian and uterine vascularization and serum progesterone concentration. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 154, 2014.
- ARRUDA, R. P.; VISINTIN, J. A.; FLEURY, J. J.; GARCIA, A. R.; MADUREIRA, E. H.; CELEGUINI, E. C. C.; NEVES NETO, J. R. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pela ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões equinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 5, p. 233–239, 2001.
- AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 220–228, 2011.
- BALL, B. A.; MILLER, P. G.; DAELS, P. F. Influence of exogenous progesterone on early embryonic development in the mare. **Theriogenology**, v. 38, n. 6, p. 1055-63, dez. 1992.
- BATISTA, P. R.; GOBELLO, C.; CORRADA, Y.; PONS, E.; ARIAS, D. O.; BLANCO, P. G. Doppler ultrasonographic assessment of uterine arteries during normal canine puerperium. **Animal Reproduction Science**, v. 141, n. 3-4, p. 172-176, out. 2013.
- BERETTA, C.; GARAVAGLIA, G.; CAVALLI, M. COX-1 and COX-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: an in vitro analysis. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 4, p. 302-306, Out. 2005.
- BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; WEBER, F.; STOLLA, R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 65, p. 2043-2051, 2002.
- BRINSKO, S. P. et. al. Embryo transfer. In: **Manual of equine reproduction**. 3.ed. USA: Mosby, 2011.
- BRITO, L. F. C.; BALDRIGUI, J. M.; WOLF, C. A.; GINTHER, O. J. Effect of GnRH and hCG on progesterone concentration and ovarian and luteal blood flow in diestrous mares. **Animal Reproduction Science**, v. 176, p. 64–69, 2017.

BROGAN, P. T.; HENNING, H.; STOUT, T. A.; RUIJTER-VILLANI M de. Relationship between colour flow Doppler sonographic assessment of corpus luteum activity and progesterone concentrations in mares after embryo transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 166, p. 22–27, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.12.010>>. Acesso em Ago. 2016.

CAIADO, J. R. C.; FONSECA, F. A.; SILVA, J. F. S.; FONTES, R. S. Tratamento de éguas receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 2, mar./abr., 2007.

CAIADO, J. R. C.; FONSECA, F. A.; SILVA, J. F. S.; FONTES, R. da S.; CAIADO, J. C. C. Aplicação do flunixin meglumine antes da transferência não-cirúrgica de embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 11–15, 2005.

CAMPBELL, M. L. H. Embryo transfer in competition horses: managing mares and expectations. **Equine Veterinary Education**, v. 26, n. 6, p. 322–327, 2014.

CARNEY, N. J.; SQUIRES, E. L.; COOK, V. M.; SEIDEL JR., G. E.; JASKO, D. J. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. **Theriogenology**, v. 36, n. 1, p. 23–32, 1991.

CASTRO, T.; OLIVEIRA, F. A.; SIDDIQUI, M. A.; BALDRIGHI, J. M.; WOLF, C. A.; GINHTER, O. J. Stimulation of LH, FSH, and luteal blood flow by GnRH during the luteal phase in mares. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 740–746, mar. 2016.

DAELS, P. F.; STABENFELDT, G. H.; KINDAHL, H.; HUGUES, J. P. Prostaglandin release and luteolysis associated with physiological and pathological conditions of reproductive cycle of the mare: a review. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, p. 29–34, 1989.

DIMMICK, M. A.; GIMENEZ, T.; SCHLAGER, R. L. Ovarian follicular dynamics and duration of estrus and diestrus in Arabian vs. Quarter Horse mares. **Animal Reproduction Science**, v. 31, issues 1-2, p. 123–129, mar. 1993.

FERREIRA, J. C.; IGNÁCIO, F. S.; MEIRA, C. de. Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 1, p. 105–111, 2011.

FERREIRA, J. C.; MEIRA, C. De. Aplicação da ultrassonografia colorida doppler em programas de transferência de embriões equinos. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1063–1069, 2011.

FLEURY, J. J.; PINTO, A. J.; MARQUES, A.; LIMA, C. G.; ARRUDA, R. P. de. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 29–33, 2001.

FLEURY, J. J.; ALVARENGA, M. A.; COSTA NETO, J. B. F.; PAPA, F. O. Transferência de embriões em eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, p. 485-487, 1987.

FLEURY, P. D. C.; ALONSO, M. A.; SOUSA, 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 equinos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 27–31, 2007.

FLEURY, P. D. C. Taxa de prenhez e concentrações plasmáticas de progesterona em éguas receptoras de embrião submetidas a diferentes tratamentos hormonais no dia da inovulação. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) - **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo**, Pirassununga, 2004.

GINTHER, O. J.; ALMAMUN, M.; SHAHIDUZZAMAN, A. K.; BEG, M. A. Disruption of the periovulatory LH surge by a transient increase in circulating 17?? - estradiol at the time of ovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 117, issues 1-2, p. 178-182, jan. 2010.

GINTHER, O. J.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; JACOB, J. C.; SIDDIQUI, M. A.; BEG, M. A. Effects of age on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20. N. 8, p. 955-963. Feb. 2008.

GINTHER, O. J.; GALTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; UTT, M. D.; BEG, M. A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 213-220, 2007a.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare**: basic and applied aspects. 2.ed. Cross Plains: EquiServices, 1992.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction**: color-doppler ultrasonography . Book 4. Cross Plains (WI): Equiservices, 2007b.

GOMES RODRIGUES, T.; CAIADO, J. R. C.; FAGUNDES, B.; STRAGGIOTTI, J. F. Uso de progesterona de longa ação e inovulação de éguas no segundo dia após a ovulação. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 3, n. 1, 2012.

HANSEL, W.; BLAIR, R. M. Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. **Theriogenology**, v. 45, p. 1267-1294, 1996.

HENDRIKS, W. K.; COLLEONI, S.; GALLI, C.; PARIS, D. B.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B. A.; STOUT, T. A. Maternal age and in vitro culture affect mitochondrial number and function in equine oocytes and embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 6, p. 957-968, jul. 2015.

HESTER, K. E.; HARPER, M. J. K.; DUFFY, D. M. Oral administration of the cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor meloxicam blocks ovulation in non-human primates when administered to simulate emergency contraception. **Human Reproduction**, v. 25, p. 360-367, 2010.

IRVINE, C. H. G.; ALEXANDER, S. L. A novel technique for measuring hypothalamic and pituitary hormone secretion rates from collection of pituitary venous effluent in the normal horse. **J. Endocrinol**, v. 113, p. 183–192, 1987.

IULANO, M. F.; SQUIRE, E. L. Embryo transfer in two-year-old donor mares. **Theriogenology**, v. 24, n. 6, p. 647–654, 1985.

IULIANO, M. F.; SQUIRES, E. L. Effect of exogenous progesterone on pregnancy rates after surgical embryo transfer in mares. **Theriogenology**, v. 26, n. 3, p. 291-298, set. 1986.

JACOB, J. C. F.; HAAQ, K. T.; SANTOS, G. O.; OLIVEIRA, J. P.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1159-1166, abr. 2012.

KANITZ, W.; SCHNEIDER, F.; HOPPEN, H. O.; UNGER, C.; NUMBERG, G.; BECKER, F. Pregnancy rates, LH and progesterone concentrations in mares treated with a GnRH agonist. **Animal Reproduction Science**, v. 97, n. 1-2, p. 55-62, jan. 2007.

KASK, K.; ODENSVIK, K.; KINDAHL, H. Prostaglandin F2 α release associated with an embryo transfer procedure in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 29. Issue 4, p. 286-289, Jul. 1997.

KELLY, C. M.; HOYER, P. B.; WISE, M. E. In-vitro and in-vivo responsiveness of the corpus luteum of the mare to gonadotrophin stimulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, p. 593-600, 1988.

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

KOBLISCHKE, P.; BUDIK, S.; MÜLLER, J.; AURICH, J. Practical experience with the treatment of recipient mares with a non-steroidal anti-inflammatory drug in an equine embryo transfer programme. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. 1039–1041, 2010.

KÖHNE, M.; ILLE, N.; ERBER, R.; ADIB RAZAVI, M. S.; WALTER, I.; AURICH, C. Effects of periovulatory gonadotrophin treatment on luteal function and endometrial expression of selected genes in cyclic pony mares. **Theriogenology**, v. 86, p. 2147–2155, 2016.

KÖHNE, M.; KUHL, J.; ILLE, N.; ERBER, R.; AURICH, C. Treatment with human chorionic gonadotrophin before ovulation increases progesterin concentration in early equine pregnancies. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 3–4, p. 187–193, 2014b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.002>>. Acesso em Ago. 2016.

KRAKOWSKI, L.; KRAWCZYK, C. H.; KOSTRO, K.; STEFANIAK, T.; NOVOTNY, F.; OBARA, J. Serum levels of acute phase proteins: SAA, Hp and progesterone (P₄) in mares with early embryonic death. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 4, p. 624-629, ago. 2011.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

LOPATE, C.; THRELFALL, W. R. Assessment of luteal function with progesterone enzyme immunoassays in the horse mare. **Theriogenology**, v. 35, n. 3, p. 583-590, mar. 1991.

LOPES, E. D. P. Transferência de embriões equinos : maximizando resultados com a escolha de receptoras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 223-229, jan./mar. 2015.

LOPES, L. M. J.; BALBINOT, M.; FONSECA, B. A.; ARAUJO, C. V. de.; MARTINS, L. R. Pregnancy rates and serum 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂α concentrations in recipient Nelore heifers treated with meloxicam after the transfer of invitro-produced embryos. **Theriogenology**, v. 84, n. 4, p. 553-558, 2015.

MCCUE, P. M.; ARNOLD, L. K.; CARROLL, B. S.; BURDEN, C. A.; GRAGG, D. M.; SCOFIELD, D. B.; HATZEL, J. N.; FERRIS, R. A. Administration of deslorelin or hCG at the time of embryo transfer: effect on pregnancy rates in recipient mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 7, p. 415, jul. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0737080612002651>>. Acesso em Set. 2016.

MCKINNON, A. O. et al. (edit.). **Equine reproduction**. 2.ed. USA: Wiley-Blackwell, 2011.

MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (edit.). **Equine reproduction**. USA: Lea & Febiger, 1993.

MERKT, H.; GUNZEL, A. R. A survey of early pregnancy losses in West German thoroughbred mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 11, n. 4, p. 256–258, 1979.

NEWCOMBE, J. R.; MARTINEZ, T. A.; PETERS, A. R. The effect of the gonadotropin-releasing hormone analog, buserelin, on pregnancy rates in horse and pony mares. **Theriogenology**, v. 55, n. 8, p. 1619-1631, mai. 2001.

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

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617764>>. Acesso em Set. 2016.

PANZANI, D.; CRISCI, A.; ROTA, A.; CAMILLO, F. Effect of day of transfer and treatment administration on the recipient on pregnancy rates after equine embryo transfer. **Veterinary Research Communications Supply**, v. 33, p. 113-116, 2009.

PAPA, F. O.; LOPES, M. D.; ALVARENGA, M. A.; MEIRA, C. de; LUVIZOTTO, M. C. R.; LANGONI, H.; RIBEIRO, E. F.; AZEDO, A. E.; BOMFIM, A. C. M. Early embryonic death in mares: clinical and hormonal aspects. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, p. 170–173, 1998.

PEDERSEN, H. G.; NIKLASSON, M.; VULLERS, A.; CHRISTOFFERSEN, M. Embryo quality grade and recipient ovulation rate affect pregnancy rates in embryo transfer recipient mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 41, n. 2016, p. 61–62, jun. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2016.04.040>>. Acesso em: Set. 2016.

PINNA, A.; MARTINS, G.; SOUZA, G.; LILENBAUM, W. Influence of seroreactivity to leptospira and reproductive failures in recipient mares of equine embryo transfer programmes. **Reproduction Domestic Animals**, v. 48, n. 4, p. 55-57, abr. 2013.

SANTOS, V. G.; CASTRO, T.; BETTENCOURT, E. M.; GINTHER, O. J. Oxytocin induction of pulses of a prostaglandin metabolite and luteolysis in mares. **Theriogenology**, v. 83, n. 4, p. 730-738, mar. 2015.

SANTOS, V. G.; BEG, M. A.; BETTENCOURT, E. M.; GINTHER, O. J. Role of PGF2 α in luteolysis based on inhibition of PGF2 α synthesis in the mare. **Theriogenology**, v. 80, n. 7, p. 812-820, out. 2013.

SCHERZER, J.; DAVIS, C.; HURLEY, D. J. Laser-assisted vitrification of large equine embryos. **Reproduction Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1104-1106, dez. 2011.

SHAFIQ, N.; MALHOTRA, S.; PANDHI, P. Comparison of nonselective cyclo-oxygenase (COX) inhibitor and selective COX-2 inhibitors on preimplantation loss, postimplantation loss and duration of gestation: an experimental study. **Contraception**, v. 69, n. 1, p. 71-75, jan. 2004.

ŠICHTAŘ, J.; RAJMON, R.; HOSKOVÁ, K.; REHÁK, K.; VOSTRÝ, L.; HÄRTLOVÁ, H. The luteal blood flow, area and pixel intensity of corpus luteum, levels of progesterone in pregnant and nonpregnant mares in the period of 16 days after ovulation. **Czech Journal of Animal Science**, v. 58, n. 11, p. 512–519, 2013.

SILVA, L. A.; GASTAL, E. L.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 3, p. 755-761, mar, 2005.

SILVA, L. A.; KLEIN, C.; EALY, A. D.; SHARP, D. C. Conceptus-mediated endometrial vascular changes during early pregnancy in mares: An anatomic, histomorphometric, and vascular endothelial growth factor receptor system immunolocalization and gene expression study. **Reproduction**, v. 142, n. 4, p. 593-603, out. 2011.

SIROIS, J.; BETTERIDGE, K. J.; GOFF, A. K. PGF2 α release, progesterone secretion and conceptus growth associated with successful and unsuccessful transcervical embryo transfer and reinsertion in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 35, p. 419-427, 1987.

SOUZA, F. A. C. S. Efeitos da gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre as características reprodutivas de fêmeas eqüinas candidatas a receptoras de embriões. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo**, Pirassununga, 2006.

THIBIER, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, p. 12-19, 2004.

TREVISOL, E.; FERREIRA, J. C. P.; ACKERMANN, C. L.; DESTRO, F. C.; AMARAL, J. B. Luteólise em bovinos : revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.29-36, jan./mar. 2013.

TURNA YILMAZ, O.; GUNDUZ, M. C.; EVKURAN DAL, G.; KURBAN, L.; ERZENGIN, O. M.; UCMAK, M. Is uterine blood flow influenced by hCG and mare age? **Animal Reproduction Science.**, v. 151, n. 3-4, p. 182-185, dez. 2014.

URQUIETA, B.; DURÁN, M. C.; COLOMA, I.; PARRAGUEZ, V. H. HCG-induced ovulation in thoroughbred mares does not affect corpus luteum development and function during early pregnancy. **Reproduction Domestic Animals**, v. 44, n. 6, p. 859-864, dez. 2009.

UTT, M. D.; JOHNSON, G. L.; BEAL, W. E. The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 707-715, mar. 2009.

VAN NIEKERK, C.H.; MORGENTHAU, J. C.; GERNEKE, W.H. Relationship between the morphology of and progesterone production by the corpus luteum in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 23, p. 171-175, 1975.

VANDERWALL, D. K. et al. PGE 2 secretion by the conceptus and binding by non-pregnant endometrium in the horse. **Equine Veterinary Journal Supplement**, n. 15, p. 24- 27, 1993.

WILLMANN, C.; BUDIK, S.; WALTER, I.; AURICH, C. Influences of treatment of early pregnant mares with the progestin altrenogest on embryonic development and gene expression in the endometrium and conceptus. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 61-73, jul. 2011.

WILTBANK, M. C.; GALLAGHER, K. P.; DYSKO, R. C.; KEYES, P. L. Regulation of blood flow to the rabbit corpus luteum: effects of estradiol and human chorionic gonadotropin. **Endocrinology**, v. 124, p. 605- 611, 1989.

WOAD, K. J.; ROBINSON, R. S. Luteal angiogenesis and its control. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 221-228, jul. 2016.