

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

HÉCTOR JAVIER NARVÁEZ BEDOYA

**EFEITO DO IBUPROFENO ADMINISTRADO UMA HORA ANTES DA
INOVULAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Campos dos Goytacazes – RJ

2008

HÉCTOR JAVIER NARVÁEZ BEDOYA

**EFEITO DO IBUPROFENO ADMINISTRADO UMA HORA ANTES DA
INOVULAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS**

**Dissertação de mestrado apresentada ao
Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título de
mestre em Ciência Animal.**

ORIENTADOR: Prof. Reginaldo da Silva Fontes

Campos dos Goytacazes – RJ

2008

HÉCTOR JAVIER NARVÁEZ BEDOYA

**EFEITO DO IBUPROFENO ADMINISTRADO UMA HORA ANTES DA
INOVULAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Aprovada em 19 de setembro de 2008

BANCA EXAMINADORA:

Pesq. Ricardo Lopes Dias da Costa (Doutor, Produção Animal) – APTA

Prof. Francisco Aloizio da Fonseca (Doutor, Ciência Animal) – UENF

Prof. Ângelo José Burla Dias (Doutor, Biociências e Biotecnologia) – UENF
(Co-orientador)

Prof. Reginaldo da Silva Fontes (Doutor, Ciências Veterinárias) – UENF
(Orientador)

Dedico este momento tão importante a meu anjo e querida irmã Isabel Cristina Narváez Bedoya, viva nas minhas lembranças apesar da sua breve passagem pelo mundo;

Aos meus pais Héctor Narváez González e Maria Doris Bedoya de Narváez, por todo o amor, apoio e, principalmente fortaleza quando se vive longe das pessoas amadas;

À minha namorada Gina Marcela Micán Castiblanco por compartilhar sonhos, amor e compreensão;

Minha eterna gratidão e admiração a vocês, por deixarem percorrer os caminhos do meu futuro longe do seu lado, sacrificando seus sonhos em função dos meus.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente por ter me oferecido esta grande oportunidade de vida, por ter me protegido, orientado e proporcionado toda a força e dedicação que me fizeram chegar até aqui;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, pela oportunidade de realização do curso;

À Profa. Dra. Célia Raquel Quirino, do LRMGA/CCTA/UENF, por ter acreditado em mim, pelo inestimável carinho com que sempre me recebeu, minha gratidão, respeito e especialmente pela realização da análise estatística dos resultados;

Ao Prof. Dr. Reginaldo da Silva Fontes do LRMGA/CCTA/UENF, pela orientação, ensino e ajuda financeira para aquisição do material utilizado no desenvolvimento deste projeto;

À Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Polo Extremo Oeste por disponibilizar os animais e as instalações da Estação Experimental;

Ao Dr. Ricardo Lopes Dias da Costa, Pesquisador Científico da APTA Extremo Oeste, pela amizade, conselhos, grande disponibilidade e valiosa colaboração que sempre me deu para o desenvolvimento do projeto;

Aos funcionários da estação experimental da APTA Extremo Oeste: Adilson, Raimundo, Seu Jimenez, Seu Jurado e Aldemir, que participaram de forma ativa e desinteressada no desenvolvimento do projeto e me ofereceram sua amizade

e permitiram que fosse parte da família deles e a todos aqueles que me acolheram com grande carinho e respeito;

Aos estagiários de graduação e do Colégio Agrícola, presentes na Estação Experimental que colaboraram sempre com grande empenho e principalmente pela amizade;

Ao Prof. Dr. Ângelo José Burla Dias, do LRMGA/CCTA/UENF, pela atenção, amizade e esclarecimento de todas as dúvidas e sugestões;

Ao Dr. Luis Fonseca Matos pela participação efetiva no projeto;

Aos meus colegas do Laboratório Vitor, Carol, Mauricio, Bruno, Kelen e Fernanda pela colaboração na execução do projeto;

Ao estudante de Medicina Veterinária da UENF e amigo Leoni Zinni Moreira pelo apoio irrestrito na execução do trabalho;

Ao meu grande amigo Juan Pablo Molina, pela ajuda sempre, conselhos e amizade verdadeira;

À Médica Veterinária, Carla Sobrinho Paes de Carvalho do LRMGA/CCTA/UENF pela revisão deste trabalho;

Aos professores do curso pela minha formação;

Aos colegas do curso, pela convivência;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!!

RESUMO

BEDOYA, Héctor Javier Narváez, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Setembro de 2008. Efeito do Ibuprofeno administrado uma hora antes da inovulação de embriões bovinos. Professor Orientador: Reginaldo da Silva Fontes. Professor Conselheiro: Ângelo José Burla Dias.

Alguns estudos descreveram aumento nas taxas de prenhez em receptoras de embriões da espécie bovina após a administração de antiinflamatórios não esteróides, utilizados como estratégia para inibir a síntese de PGF_{2α}, que é induzida pela manipulação do trato reprodutivo durante a inovulação dos embriões. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do Ibuprofeno administrado uma hora antes da inovulação de embriões bovinos, visando melhorar as taxas de prenhez. Foram selecionadas 100 fêmeas solteiras e cíclicas da raça Nelore como receptoras de embriões e submetidas à sincronização do estro e da ovulação em dia aleatório do ciclo estral, receberam um dispositivo intravaginal contendo 1,9g de progesterona (CIDR[®], Pfizer, Brasil) + 2mg de benzoato de estradiol (i.m.) (Cronibest[®], Biogenesis, Brasil), sendo este considerado como o dia 0 (D₀). No dia 8 (D₈), o dispositivo intravaginal de progesterona foi removido e administrou-se 150µg de D-Cloprostenol (Cronibem[®], Biogenesis, Brasil). Após 24h todos os animais receberam uma aplicação de 1mg de benzoato de estradiol. A avaliação ultra-sonográfica do corpo lúteo foi realizada no 6º dia do ciclo estral. Foram inovuladas 76 receptoras no 7º dia do ciclo estral pelo método não cirúrgico, sempre realizado por um mesmo técnico treinado. Foram utilizados embriões congelados do banco genético da Agência

Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) e classificados de acordo com a qualidade em grau I, II e III, segundo a IETS. Uma hora antes da inovulação dos embriões as receptoras foram distribuídas ao acaso em três grupos experimentais, G1 (n=25)-controle, G2 (n=30)-fêmeas tratadas com 5mg/kg (i.m.) de Ibuprofeno[®] (Henrifarma, Brasil) e G3 (n=21)-fêmeas tratadas com polímero de liberação controlada de Ibuprofeno administrado por via subcutânea. O diagnóstico da gestação foi realizado por meio de ultra-sonografia transretal aproximadamente 35 dias após a inovulação dos embriões. Para comparar as taxas de prenhez entre os grupos experimentais, efetuou-se um estudo de dispersão de frequência pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) com a utilização do programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*). As taxas de prenhez foram de 16% (4/25), 43,3% (13/30) e 14,2% (3/21) para G1, G2 e G3, respectivamente. Observou-se diferença estatística ($P<0,024$) na taxa de prenhez do G2 quando comparado o G1 e G3. A administração de Ibuprofeno por via intramuscular uma hora antes da inovulação dos embriões resultou em melhores taxas de prenhez em receptoras da raça Nelore.

Palavras-chave: transferência de embriões, antiinflamatórios, prostaglandinas, taxa de prenhez, *Bos indicus*.

ABSTRACT

BEDOYA, Héctor Javier Narváez, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. September 2008. Effect of ibuprofen administered one hour before bovine embryo transfer. Supervisor: Prof. Reginaldo da Silva Fontes. Counselor: Prof. Ângelo José Burla Dias.

Some studies have described increase in pregnancy rates in embryo recipients in cattle after administration of non-steroidal anti-inflammatory drug, used as strategies to inhibit the synthesis of the $PGF_{2\alpha}$, induced by manipulation of the reproductive tract during embryo transfer. The objective of the present study was to evaluate the effect of Ibuprofen administered one hour before bovine embryo transfer, seeking increase pregnancy rates. They were selected 100 females non-lactating, Nelore as embryo recipients and submitted to estrous synchronization and ovulation in random day of estral cycle, received an intravaginal device containing 1,9g of progesterone (CIDR[®], Pfizer, Brazil) + 2mg of estradiol benzoate (i.m.) (Cronibest[®], Biogenesis, Brazil) this being considered day 0 (D₀). In the 8th day (D₈), the intravaginal device of progesterone was removed and 150 μ g of D-Cloprostenol (Cronibem[®], Biogenesis, Brazil) were administered. Twenty - four hours later, each animal received 1mg (i.m.) of estradiol benzoate. The Corpus Luteum ultrasound assessment was performed in the 6th day of estral cycle. They were transferred 76 recipients in the 7th day of estral cycle by non surgical method, done by a same trained technician. They were used frozen/thawed embryos the genetic bank of Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) and classified as quality grade I, II and III, according to the

standards of the IEST. One hour before embryo transfer the recipients were randomly distributed in 3 experimental groups, G1 (n=25) control group, G2 (n=30) treatment female received 5mg/kg (i.m.) Ibuprofen[®] (Henrifarma, Brazil) and G3 (n=21) treatment female with polymer of controlled release of ibuprofen administered subcutaneous. Pregnancy diagnosis was determined 35 days following transfer by trans rectum ultrasonography. To compare pregnancy rates among experimental groups, it was carrying out a study of frequency dispersion for the Chi-Square test (χ^2), statistical program used SAS (*Statistical Analysis System*). The pregnancy rates were of 16% (4/25), 43,3% (13/30) e 14,2% (3/21) for G1, G2 and G3, respectively. It was observed the statistic difference ($P<0,024$) in the pregnancy rates for G2 compared with G1 and G3. The Ibuprofen intramuscularly administration one hour before embryos transfer improved pregnancy rates in Nelore recipients.

Keywords: embryo transfer, anti-inflammatory drug, prostaglandin, pregnancy rates, *Bos indicus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Síntese dos ácidos graxos poliinsaturados Omega-6 e Omega-3.....	29
Figura 2- Biossíntese de PGF ₂ α a partir da cascata do ácido araquidônico.....	31
Figura 3- Caracterização das perdas da gestação em vacas de alta produção leiteira.....	33
Figura 4- Mecanismo de ação dos AINEs no bloqueio da ciclooxigenase.....	36
Figura 5- Variação da concentração plasmática efetiva de compostos farmacológicos em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada.....	41
Figura 6- Escore corporal do rebanho de novilhas (A) e vacas (B) da Fazenda Experimental da APTA, Extremo Oeste.....	47
Figura 7- Protocolo hormonal de sincronização do estro realizado em receptoras da raça Nelore.....	48
Figura 8- Esquema utilizado nos 3 grupos experimentais.....	50

Figura 9- Taxa de prenhez de receptoras da raça Nelore conforme o grupo experimental.....	55
Figura 10- Efeito do diâmetro do CL sobre as taxas de prenhez, independente do grupo experimental.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição da classificação e qualidade embrionária.....	45
Tabela 2- Descrição dos parâmetros utilizados para avaliar o grau de manipulação do trato reprodutivo realizado nas receptoras durante a inovulação dos embriões.....	49
Tabela 3- Valores médios (média± E.P.M) do diâmetro do CL (mm), peso vivo (kg) e condição corporal, das receptoras inovuladas após o tratamento de sincronização do estro.....	53
Tabela 4- Taxa de aproveitamento e classificação do diâmetro do corpo lúteo conforme a resposta após o protocolo de sincronização do estro.....	54
Tabela 5- Efeito da qualidade do embrião (média ± E.P.M) sobre as taxas de prenhez (%) para cada grupo experimental.....	57
Tabela 6- Efeito do grau de manipulação do trato reprodutivo (média ± E.P.M) sobre as taxas de prenhez (%) para cada grupo experimental.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AA = Ácido araquidônico

AINEs = Antiinflamatórios não esteróides

BE = Benzoato de estradiol

bIFN-t = Interferon tau bovino

CIDR = “*Controlled Internal Drug Release*” Dispositivo intravaginal de liberação de progesterona

CL = Corpo lúteo

COX = Ciclooxigenase

COX-1 = Ciclooxigenase 1

COX-2 = Ciclooxigenase 2

EPM = Erro padrão da média

FIV = Fertilização *in vitro*

FM = Flunixin meglumine

FSH = Hormônio folículo estimulante

GnRH = Hormônio liberador das gonadotrofinas

IETS = Sociedade internacional de transferência de embriões

IFN-t = Interferon tau

IGF-1 = Fator de crescimento semelhante à insulina

LH = Hormônio luteinizante

oIFN-t = Interferon tau ovino

OTR = Receptores da oxitocina

PGE2 = Prostaglandina E2

PGF₂α = Prostaglandina F 2 alfa
PGG₂ = Prostaglandina G₂
PGH₂ = Prostaglandina H₂
PGH₂S = Prostaglandina H 2 sintase
PGHS = Prostaglandina H sintase
PGI₂ = Prostaciclina
PIVE = Produção *in vitro* de embriões
PLA 2 = Fosfolipase A 2
PLGA = Poli(ácido láctico co – glicólico)
TCM = temperatura micelar crítica
TE = Transferência de embriões
TETF = Transferência de embriões em tempo fixo
TNF-α = Fator de necrose tumoral - α
TXA₂ = Tromboxanos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Controle endócrino do ciclo estral	20
2.1.1 Controle da regulação do ciclo estral	21
2.2 Foliculogênese	22
2.2.1 Fases do crescimento folicular	23
2.2.2 Desenvolvimento do corpo lúteo	23
2.3 Sincronização do estro e da ovulação	24
2.3.1 Sincronização com prostaglandina	25
2.3.2 Sincronização com dispositivo liberador de progesterona e estradiol ...	26
2.4 Reconhecimento materno da gestação	27
2.5 Síntese de PGF₂α e luteólise	27
2.5.1 Cascata da síntese de PGF₂α a partir dos ácidos graxos poliinsaturados	28
2.5.2 Mecanismo de liberação de PGF₂α	29
2.6 Fatores que afetam os programas de TE	32
2.7 Uso de antiinflamatórios como estratégia anti-prostaglandínica	35
2.7.1 Antiinflamatórios não seletivos	37
2.7.2 Antiinflamatórios seletivos da COX-2	40
2.8 Dispositivos de liberação controlada	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 Local	44
3.2 Embriões	44
3.3 Receptoras	45
3.4 Sincronização do estro das receptoras	47
3.5 Seleção das receptoras	48
3.6 Descongelamento e Inovulação dos embriões	48
3.7 Variáveis avaliadas	49

3.7.1	Qualidade dos embriões.....	49
3.7.2	Grau de manipulação do trato reprodutivo.....	49
3.8	Grupos experimentais.....	50
3.7	Diagnóstico da gestação.....	48
3.9	Preparação do dispositivo de liberação controlada de Ibuprofeno e da solução injetável de Ibuprofeno.....	51
3.10	Diagnóstico da gestação.....	51
3.11	Análise estatística.....	52
4	RESULTADOS.....	53
4.1	Sincronização do estro das receptoras.....	53
4.2	Taxa de prenhez das receptoras.....	55
4.3	Qualidade dos embriões.....	56
4.4	Grau de manipulação do trato reprodutivo.....	57
5	DISCUSSÃO.....	59
6	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A atual situação econômica da pecuária mundial exige máxima eficiência produtiva e reprodutiva dos rebanhos bovinos para garantia de satisfatório retorno econômico. Desta forma, o Brasil tem demonstrado nos últimos anos um aumento significativo nos índices de produtividade.

Estima-se que o Brasil possui aproximadamente 205 milhões de cabeças, composto principalmente pela raça Nelore (*Bos indicus*) e seus cruzamentos, que corresponde a 80% do rebanho bovino nacional, constituindo-se no maior rebanho de corte comercial do mundo (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2007).

Paralelamente ao crescimento da pecuária bovina nacional, na década de 70 aconteceu no Brasil, o início da técnica de transferência de embriões em bovinos (TE), quando foi registrado o primeiro nascimento de um produto gerado da TE com embrião congelado importado e, pouco tempo depois, o primeiro nascimento a partir de um embrião coletado e transferido no país (Viana e Camargo, 2007).

Com os recentes conhecimentos sobre a fisiologia da reprodução em bovinos, novas técnicas da reprodução surgiram, tornando-se viável a aplicação e proporcionando resultados favoráveis com satisfatório retorno econômico (Ginther et al., 1997 e Fortune et al., 2001). Segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), o Brasil ocupa a segunda posição na aplicação da técnica de TE e primeiro lugar na produção *in vitro* de embriões (PIV), como conseqüência, os Programas de Melhoramento Genético podem ser avaliados com maior rapidez e eficiência, mesmo em pequenas populações de animais (Christiansen, 1991).

Embora a técnica de transferência de embriões em bovinos tenha evoluído nos últimos anos no país e no mundo, os resultados ainda são considerados baixos com uma participação pouco expressiva nos rebanhos bovinos leiteiros.

Segundo Fernandes e Oba (2007), a produção média de embriões viáveis por colheita é considerada variável, porém, situa-se em torno de 5,5 a 6,0 embriões, com taxa média de prenhez de 50%, ou seja, 2,5 a 3,0 gestações/colheita e um total de 2,0 a 2,5 bezerros nascidos por colheita.

Já nos últimos anos com a incorporação da técnica de fertilização *in vitro* (FIV) ou produção *in vitro* de embriões (PIV) o Brasil apresentou uma mudança no mercado da TE. A produção de embriões cresceu significativamente e o país tornou-se maior produtor mundial de embriões bovinos, respondendo por aproximadamente 25% do total de transferências realizadas no mundo, sendo que a atividade concentrou-se, principalmente, nas raças zebuínas e taurinas de corte, com as transferências realizadas preferencialmente com embrião a fresco (Viana e Camargo, 2007).

Dos grandes desafios na produção de embriões tanto *in vitro* quanto *in vivo*, refere-se principalmente, ao conhecimento dos fatores associados à mortalidade embrionária, apresentados principalmente no período compreendido desde a inovulação do embrião até o período de diferenciação dos tecidos, em torno do 42º dia da gestação (Dunne et al., 2000). Vanrose et al. (2000) e Santos et al. (2004) e Sartori. (2004) em extensa revisão, concluíram que a maioria destas perdas ocorre principalmente desde os primeiros dias da prenhez até o mecanismo de reconhecimento materno da gestação (entre o 15º e 19º dia de gestação), podendo atingir valores de 20 a 40%.

No entanto, um dos eventos que poderia estar relacionado às altas taxas de mortalidade embrionária em programas de TE está associado à liberação precoce de PGF_{2α} causada pela manipulação inadequada e excessiva do trato reprodutivo da receptora durante a inovulação dos embriões, comprometendo possivelmente, a gestação devido a efeitos nocivos de PGF_{2α} sobre o desenvolvimento embrionário, além de ocasionar regressão prematura do corpo lúteo (CL) (Scenna et al., 2005). Considerando este evento dentre os múltiplos fatores que levam a apresentar perda da gestação e, como consequência, baixos índices produtivos e reprodutivos dos programas TE, é importante a adoção de novas tecnologias que contribuam com o melhoramento da eficiência da técnica. Portanto, uma alternativa que poderia

proporcionar melhores resultados nos programas de TE refere-se à administração de Ibuprofeno uma hora antes da inovulação dos embriões (considerando o tempo que tarda o antiinflamatório em atingir níveis plasmáticos), potente antiinflamatório não esteróide, que tem como função principal a inibição da síntese das prostaglandinas, incluindo $\text{PGF}_{2\alpha}$. Desta forma, o Ibuprofeno poderia inibir a atividade de $\text{PGF}_{2\alpha}$, minimizando assim os efeitos nocivos que tem sobre o embrião, proporcionando provavelmente, melhoria nas taxas de prenhez e a obtenção de um número maior de animais geneticamente superiores, sendo de grande importância econômica para o produtor.

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito do Ibuprofeno administrado uma hora antes da inovulação de embriões bovinos, visando melhorar as taxas de prenhez.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle endócrino do ciclo estral

O ciclo estral bovino é um ritmo funcional dos órgãos reprodutivos das fêmeas que se estabelece a partir da puberdade. Compreende modificações cíclicas na fisiologia e morfologia dos órgãos reprodutivos e principalmente mudanças nas concentrações dos hormônios da reprodução. A duração média do ciclo estral é de 21 dias, com variação de 16 a 24 dias e é regido por interações e antagonismos endocrinológicos de hormônios secretados pelo hipotálamo, hipófise, gônadas e útero (MacMillan e Burke, 1996). O ciclo estral pode ser dividido em duas fases distintas: a fase folicular ou estrogênica, que se estende do proestro ao estro culminando na ovulação e a fase luteínica ou progesterônica, que compreende o metaestro e o diestro terminando com a luteólise (MacMillan e Burke, 1996). De acordo com Rathbone et al. (2001), as características próprias de cada fase são assim divididas:

1. Estro: período que se caracteriza pela aceitação do macho. O estradiol liberado pelo folículo pré-ovulatório leva a apresentação de mudanças estruturais nos cornos uterinos como turgidez, relaxamento da cérvix, vagina e vulva com sinais de hiperemia e presença de muco de origem cervical. Este período tem uma duração de 10 a 18 horas aproximadamente;

2. Metaestro: período de cessão do estro, desenvolvimento do CL e liberação de progesterona. A duração média é de 2 a 3 dias até o CL atingir a maturidade e o pico de produção de progesterona;

3. Diestro: período de maior duração que ocorre sob o predomínio de progesterona, produzida pelo CL. A duração aproximada é de 10 a 16 dias e culmina com a regressão do CL;

4. Proestro: período que antecede ao estro, marcado pelo aumento crescente dos estrógenos, com duração média de 2 a 3 dias.

2.1.1 Controle da regulação do ciclo estral

A regulação do ciclo estral é feita por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos por meio do eixo porta-hipotalâmico-hipofisário, com a síntese e liberação de hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) secretado pelo hipotálamo, o qual atinge a adenohipófise e estimula a produção do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH). O FSH é o hormônio responsável pelo recrutamento folicular, crescimento dos folículos antes da divergência folicular com posterior desenvolvimento do folículo dominante e também estimula a expansão das células do cúmulus do ovócito. Com base em estudos *in vitro*, o FSH estimula a produção de estradiol, inibina, ativina e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (Ginther et al., 2003). O LH está envolvido no mecanismo de divergência folicular por meio da expressão de receptores para o LH nas células da granulosa do futuro folículo dominante, além de outras ações como o estímulo à produção de esteróides e fatores do crescimento intrafoliculares que também estão envolvidos na divergência folicular, além de desencadear o mecanismo da ovulação (Ginther et al., 2003 e Binelli et al., 2006).

A inibina é secretada principalmente pelas células da granulosa; tem sua concentração aumentada com a emergência da onda folicular e reduzida após a seleção do folículo dominante, para novamente aumentar, possivelmente, devido ao estímulo do folículo dominante (Bleach et al., 2001). A inibina pode estar envolvida no estímulo da produção de andrógenos pelas células da teca e na produção de estrógenos, pelas células da granulosa do folículo dominante (Ginther et al., 2003).

2.2 Foliculogênese

Refere-se ao crescimento dos folículos ovarianos envolvendo uma série de eventos ou mudanças seqüenciais no crescimento e desenvolvimento dos folículos até a ovulação do ovócito maduro.

Nos ruminantes e na maioria das espécies domésticas a foliculogênese inicia-se nas primeiras etapas de vida embrionária a partir de estruturas denominadas ovogônias. Estas estão presentes nos folículos primários que são os folículos de menor tamanho observados no ovário, sendo constituídos pelo ovócito rodeado por algumas células somáticas achatadas, com seu crescimento começando ainda antes do nascimento da fêmea. As ovogônias são células diplóides que, antes do nascimento, multiplicam-se por mitose, depois sofrem um período de crescimento para iniciar a primeira divisão meiótica, as quais são denominadas ovócitos primários. Cada ovócito primário encontra-se desprovido de zona pelúcida, rodeado de células precursoras das células da granulosa e membrana basal (Picazo e López, 1995).

O folículo secundário, normalmente conhecido como folículo pré-antral, apresenta formação da zona pelúcida, teca interna, externa e mais de uma camada de células da granulosa, o folículo secundário apresenta também vascularização independente e não é dependente de gonadotrofinas, as células da granulosa emitem projeções que atravessam a zona pelúcida tendo contato com o ovócito passando os nutrientes e eletrólitos que participam diretamente do crescimento do ovócito (Hirshfield, 1991).

O folículo terciário apresenta formação do antro folicular, devido ao acúmulo de secreção das células da granulosa e do folículo pré-ovulatório caracterizado por uma cavidade central que contém grande quantidade de líquido, sendo considerado o ponto de partida da estereidogênese (Hirshfield, 1991).

2.2.1 Fases do crescimento folicular

Existem duas vias de crescimento folicular: foliculogênese tônica, regulada pelo próprio ovário com ausência das gonadotrofinas, ou seja, por proteínas que têm efeito direto ou indireto nas células da granulosa e da teca e pode modular o desenvolvimento folicular e produção de estradiol; e a foliculogênese exponencial, processo regulado totalmente pelas gonadotrofinas (Driancourt e Fry, 1988).

O crescimento folicular em bovinos desenvolve-se principalmente em forma de ondas foliculares em resposta ao aumento do FSH circulante, no qual um grupo de pequenos folículos antrais é recrutado rapidamente em uma onda folicular. Cada onda é composta de um grupo de pequenos folículos antrais (fase de recrutamento folicular) que passa a se desenvolver concomitantemente; fase de crescimento folicular dependente do FSH.

Na fase de seleção e dominância, um folículo cresce mais que os outros, tornando-se dominante e inibindo o crescimento dos demais (folículos subordinados) (Fortune et al., 2004) que entram em atresia pela baixa produção de estrógenos e pela ação da inibina, ativina e IGF-1. Este fenômeno é conhecido também como divergência folicular. Após a divergência folicular e na presença de altos níveis de progesterona, que promove a redução pulsátil do LH, o folículo dominante torna-se anovulatório. A partir desse momento inicia-se o mecanismo de atresia e perda de dominância folicular, promovendo o começo de uma nova onda de crescimento folicular (Ginther et al., 1989).

2.2.2 Desenvolvimento do corpo lúteo

O corpo lúteo é uma estrutura ovárica que tem função endócrina (Sangha et al., 2002) e é formado a partir da hiperplasia e diferenciação das células da granulosa e da teca do folículo ovulatório. O CL através da síntese e secreção de progesterona regula em forma determinante a duração do ciclo estral e é essencial para o estabelecimento e manutenção da prenhez. A formação do CL inicia-se a partir do pico pré-ovulatório do LH secretado pela hipófise, quando por influência do

LH as células da granulosa e da teca sofrem uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas que têm como resultado o processo de luteinização.

Na maioria dos mamíferos as células da granulosa remanescentes formam as células luteais grandes (Sangha et al., 2002) e as células da teca dão origem às células luteais pequenas (Sangha et al., 2002). As células luteais pequenas (menores do que 20 μ m) liberam baixas concentrações de progesterona e têm afinidade pelo LH. As células luteais grandes (20-30 μ m) produzem altas quantidades de progesterona e não respondem a estímulos do LH. Os principais efeitos da progesterona produzida pelo CL são observados no sistema reprodutivo e no eixo hipotálamo-hipofisário. Em geral, a ação da progesterona no trato reprodutivo está relacionada com a preparação do mesmo para o desenvolvimento do conceito. Em fêmeas bovinas, o CL funcional está presente em média do 4º ao 17º dia do ciclo estral. Caso não ocorra prenhez, torna-se necessária a regressão do CL. Tal processo fisiológico determina uma queda nas concentrações plasmáticas de progesterona, possibilitando um aumento na frequência dos pulsos do LH nos últimos dias do ciclo estral (Hafez e Hafez, 2004).

A caracterização do CL fornece informações importantes sobre o estado reprodutivo da fêmea (Viana et al., 1999) e possibilita a seleção das receptoras no dia da inovulação do embrião, geralmente realizada levando-se em consideração o tamanho do CL por palpação retal ou o diâmetro por meio de ultra-sonografia. O método de palpação retal apesar da praticidade e facilidade de execução, apresenta limitação na avaliação devido à sua baixa sensibilidade e especificidade (Sprecher et al., 1989). A ultra-sonografia é um meio tecnológico que permite a completa visualização do tecido luteal possibilitando maior precisão na avaliação do diâmetro ou área do CL (Ribadu et al., 1994).

2.3 Sincronização do estro e da ovulação

Considerando as dificuldades existentes para a detecção do estro, atualmente vêm se desenvolvendo protocolos que sincronizam o estro e a ovulação,

possibilitando o emprego da transferência de embriões em tempo fixo (TETF), independente da manifestação do estro.

As formas de controle do ciclo estral em bovinos são baseadas no alongamento e redução da fase luteínica com a utilização de progestágenos ou prostaglandinas e a modificação dos padrões da onda folicular através da administração de estrógenos (Rathbone et al., 2001).

2.3.1 Sincronização com prostaglandina

Um dos tratamentos utilizados para a sincronização de receptoras constitui na administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$, mas, o sucesso da utilização depende principalmente, da presença de um CL maduro, uma vez que o mecanismo de ação da mesma é provocar a regressão morfológica e funcional da estrutura celular e a queda dos níveis endógenos de progesterona do CL (Rathbone et al., 2001).

A resposta ao tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$ é influenciada pela maturidade do CL, desta forma, os tratamentos realizados nos primeiros cinco dias após o estro não induzem efetivamente a luteólise. Entretanto, determinou-se que o CL maduro possui um sistema de retroalimentação positiva que resulta na produção intraluteínica de $\text{PGF}_{2\alpha}$, o que possibilita a continuidade do processo luteolítico iniciado por uma única aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Wiltbank, 1997).

Observou-se que, aproximadamente 70% das vacas cíclicas manifestam estro com a administração de um único tratamento de $\text{PGF}_{2\alpha}$, mas os melhores resultados são apresentados com a administração de duas doses a intervalos de 11 a 14 dias (Rathbone, et al., 2001). No entanto, devido à baixa precisão na detecção de cio, em torno de 50%, o tratamento torna-se ineficiente e com grande impacto na viabilidade deste tipo de programa, principalmente, quando são usadas receptoras *Bos indicus* ou seus cruzamentos (Bó et al., 2006)

2.3.2 Sincronização com dispositivo liberador de progesterona e estradiol

Os estrógenos quando são administrados na presença de progesterona endógena (CL) ou exógena, causam diminuição dos níveis circulantes do FSH e do LH, provocando a regressão dos folículos gonadotrófico-dependentes. Após a metabolização e diminuição das concentrações plasmáticas de estradiol verifica-se o surgimento de um pico do FSH e a emergência de uma nova onda de crescimento folicular. O tratamento com progesterona exógena bloqueia o pico do LH (Kinder et al., 1996) evitando a ovulação do folículo dominante em animais tratados com estrógeno (Benzoato, Estradiol 17 β , Valerato ou Cipionato). O Valerato de Estradiol (Bó et al., 1995) e o Cipionato de Estradiol (Colazzo et al., 2003) na presença de progesterona, causam a regressão dos folículos antrais presentes no ovário, no entanto a meia vida longa desses ésteres de estradiol, pela baixa solubilidade em água, leva a um atraso e a uma alta dispersão do dia da emergência da onda de crescimento folicular. O Benzoato de Estradiol (B.E) (Caccia e Bó, 1998) e o Estradiol 17 β (Bó et al., 1994) apresentam meia vida curta, induzindo eficazmente a emergência sincronizada de uma nova onda de crescimento folicular.

Com a finalidade de manter as concentrações médias de progesterona no plasma e suprimir a liberação do LH endógeno, foi desenvolvido um sistema de liberação lenta de progesterona chamado CIDR[®] (*Controlled Internal Drug Release*), que consiste em um dispositivo de silicone intravaginal impregnado com progesterona mais uma cápsula de gelatina contendo 10mg de BE inserida junto ao CIDR[®] (MacMillan et al., 1991).

A maioria dos protocolos de sincronização do estro e da ovulação para programas de TETF usados em *Bos taurus* é similar aos protocolos utilizados em *Bos indicus* e seus cruzamentos. As receptoras recebem o dispositivo liberador de progesterona, mais uma injeção de 2mg de BE i.m., no D₀. O dispositivo liberador de progesterona é removido no dia 7 ou 8 e é administrada uma dose de 150 μ g de PGF₂ α . Após 24 horas da aplicação de PGF₂ α é aplicada a última dose de 1mg de BE. O dia seguinte (Dia 10) é considerado como o dia do estro e, portanto, os embriões são transferidos no dia 17 do protocolo hormonal ou dia 7 do ciclo estral, para todas as receptoras com CL presente maior ou igual a 10 mm de diâmetro (Cavaliere et al., 2002).

2.4 Reconhecimento materno da gestação

O mecanismo de reconhecimento materno da gestação é o processo pelo qual o concepto sinaliza bioquimicamente sua presença ao útero através da liberação do interferon tau (IFN-t), prolongando a funcionalidade do CL e mantendo a gestação em diferentes espécies mamíferas (Takahashi et al., 2003). Este evento é realizado em resposta à implantação do blastocisto junto ao útero materno, adaptação requerida para sustentar a nutrição e a proteção do concepto durante a gestação (Spencer et al., 2004).

Em geral, a função do interferon tau (IFN-t), tanto do bovino (bIFN-t) quanto do ovino (oIFN-t), é inibir a secreção pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Demmers et al., 2001). O bIFN-t é liberado pelas células do trofoblasto embrionário entre os dias 9 e 14 da gestação pela expansão do embrião até os pontos de adesão: o epitélio endometrial e as glândulas endometriais. O pico máximo de expressão do IFN-t apresenta-se entre os dias 15 - 17 até o dia 24 da gestação. Este se liga a receptores específicos nas células endometriais, ativando intracelularmente, proteínas de transcrição (JAKs e STATs) que resultam na expressão dos genes IRF-1 e IRF-2 (Demmers et al., 2001). A ativação do gene IRF-2 conduz ao bloqueio na formação dos receptores específicos para estradiol e oxitocina, impedindo assim a ligação destes hormônios a seus receptores, inibindo a produção e liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pela falta de estímulo da oxitocina; dessa maneira o IFN-t consegue ação anti-luteolítica protegendo a funcionalidade do corpo lúteo (Mann e Laming, 1999).

2.5 Síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e luteólise

Caso não ocorra prenhez, a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é desencadeada por diferentes mecanismos. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ é a substância responsável pela regressão natural do corpo lúteo entre o 15º e 19º dia do ciclo estral em bovinos. A regressão do CL é caracterizada pela perda de funcionalidade da estrutura celular do CL. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ é produzida pelas células endometriais, sendo o principal agente luteolítico liberado de

forma pulsátil, produto final de um processo de cascata iniciado pelo ácido araquidônico (Salfen et al., 1999).

2.5.1 Cascata da síntese de PGF₂ α a partir dos ácidos graxos poliinsaturados

A maioria dos eventos metabólicos e os sinais endócrinos envolvidos na reprodução dependem do estado nutricional das fêmeas. O metabolismo das gorduras na dieta tanto para vacas de corte quanto para vacas de leite, proporciona a energia necessária para manutenção, produção e reprodução (Staples et al., 1998). Dentro da nutrição o metabolismo dos ácidos graxos está relacionado com importantes eventos de eficiência reprodutiva como, por exemplo, no melhoramento dos índices reprodutivos em bovinos e ovinos (Mattos et al., 2000).

As gorduras e o colesterol são classificados como lipídios, compostos biológicos solúveis em solventes orgânicos. Dentro do grupo dos lipídios têm-se os triglicerídios e fosfolipídios. Os fosfolipídios são os maiores componentes da membrana celular e é a fonte dos ácidos graxos para a síntese dos eicosanóides: grupo composto pelas prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (Wathes et al., 2007).

O ambiente ruminal é responsável por algumas transformações nos lipídios da dieta, alterando assim a composição e perfil de ácidos graxos que chegam ao duodeno. Estas alterações são decorrentes principalmente da lipólise e biohidrogenação.

Os ácidos graxos linoléico e α -linolênico são precursores dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) ômega 6 (ω -6) e ômega 3 (ω -3) de cadeia mais longa, respectivamente. Estes ácidos, não podendo ser biossintetizados em animais, incluindo o homem e sendo necessários para a saúde, são considerados essenciais (EFA – do inglês “essential fatty acids”) (Hornstra, 2001). No entanto, uma vez consumidos, os ácidos linoléico e α -linolênico podem ser alongados até cadeias de pelo menos 20 ou 22 carbonos. O ácido linoléico pode ser metabolizado em outros ácidos ω -6, incluindo os ácidos γ -linolênico, dihomo- γ -linolênico e araquidônico. Do mesmo modo, o ácido α -linolênico é metabolizado em outros da série ω -3, entre eles

o ácido eicosapentaenóico (EPA – C20:5) e o ácido docosahexaenóico (DHA – C22:6) (Mattos et al., 2000).

Contudo, sabe-se que a partir do ácido linoléico tem-se a formação do ácido araquidônico, o qual é o precursor das prostaglandinas da série 2, como por exemplo a PGF₂ α , substância encarregada do mecanismo luteolítico (Figura 1).

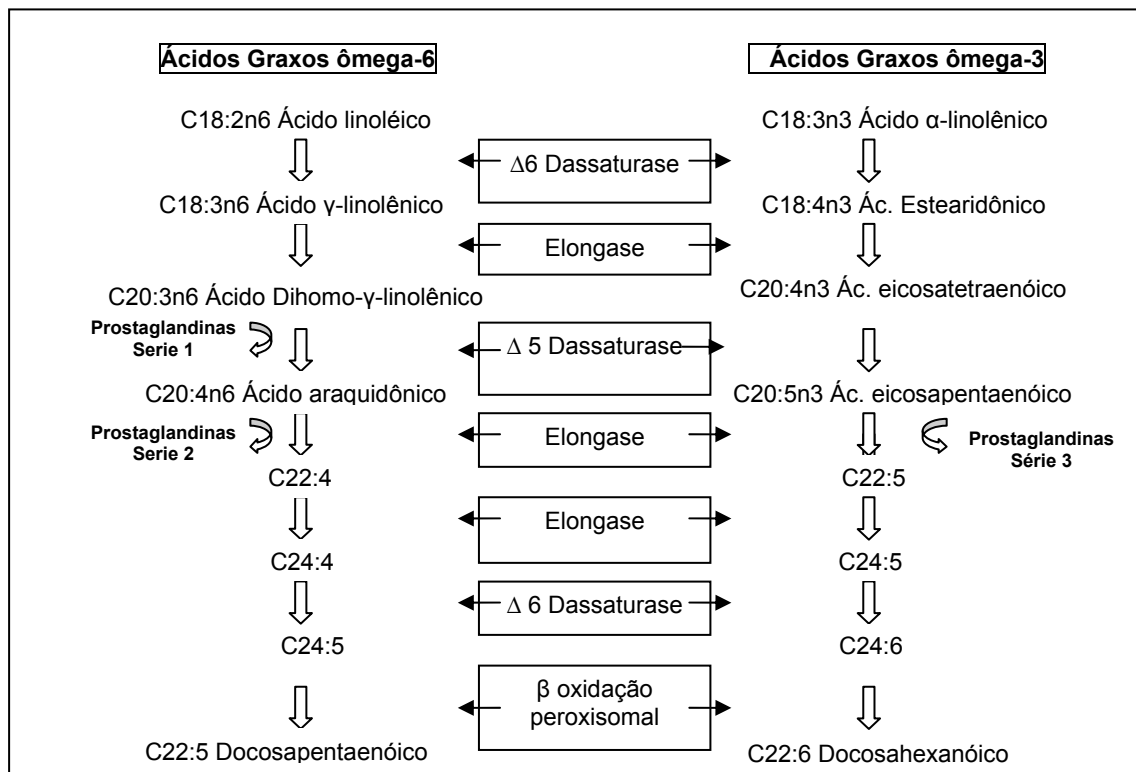


Figura 1- Síntese dos ácidos graxos poliinsaturados Omega-6 e Omega-3 (Mattos et al., 2000 e Wathes et al., 2007).

2.5.2 Mecanismo de liberação de PGF₂ α

As prostaglandinas são substâncias que pertencem à classe bioquímica dos lipídios, subclasse dos eicosanóides e são ácidos graxos poliinsaturados com 20 átomos de carbono em sua estrutura básica. São moléculas bioativas que atuam como mensageiros de curta distância, afetando os tecidos próximos das células que as produzem. Sabe-se que as prostaglandinas apresentam uma meia vida curta *in*

vivo, devido à sua instabilidade química e inativação local e pulmonar pela hidroxiprostaglandina dehidrogenase (PGDHs) (Pace-Asciak, 1980). O catabolismo de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é realizado primariamente nos pulmões, mas a expressão de 15-hidroxiprostaglandina dehidrogenase (PGDH), enzima catalisadora de $\text{PGF}_{2\alpha}$, também conhecida como 15-PGDH, em tecidos periféricos, sugere que um catabolismo local pode contribuir para a regulação periférica da ação de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

A síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ começa em resposta a estímulos hormonais da oxitocina que estão associados com a atividade da proteína quinase C (Asselin et al., 1998), que se liga a seu receptor (OTR) transmembrânico localizado na célula endometrial. Intracelularmente é ativada a fosfolipase A2 (PLA2) que se transloca para onde estão localizados seus substratos lipídicos (Clark et al., 1991). A PLA2 está presente na maioria das células dos mamíferos, liberando ácido araquidônico a partir dos fosfolipídios da membrana celular. Enzimas presentes no retículo endoplasmático liso (ciclooxigenase) convertem o ácido araquidônico em prostaglandinas, em um processo que se inicia com a formação de prostaglandina H2 (PGH2), o precursor imediato das prostaglandinas (Cruz, 2005).

As duas reações que levam até a formação de PGH2 envolvem a adição de oxigênio molecular, o qual é catalisado por uma enzima bifuncional, chamada ciclooxigenase (COX), também conhecida como prostaglandina H2 sintase (PGH2S). Existem duas isoformas da COX: COX-1 e COX-2 que catalisam o ácido araquidônico em prostaglandina G2 (PGG2). A ciclooxigenase 1 (COX-1) é expressa constitutivamente, enquanto a ciclooxigenase 2 (COX-2) é expressa de maneira induzida em vários tecidos do organismo (Cruz, 2005). A atividade da COX é introduzir oxigênio molecular convertendo o ácido araquidônico em PGG2, que, por ação enzimática é catalisada de PGG2 em PGH2. Finalmente, por ação de outro mecanismo enzimático especializado, o endoperóxido reductase (Xiao et al., 1998), a PGH2 é convertida a $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Smith et al., 1991) (Figura 2).

Além da formação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a partir do ácido araquidônico, também são sintetizados outros tipos de prostanoides, denominados, assim, devido à utilização de PGH2 como substrato. São eles: PGE2, PGE1, PGD2, prostaciclina (PGI2) e tromboxanos (TXA2) (Funk, 2001).

Apesar da reconhecida importância do controle da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ na luteólise, existem outros mecanismos pelo qual este controle endometrial é realizado. Hormônios como estradiol, progesterona, oxitocina (Silvia et al., 1991) e

LH (Canino et al., 1999) entre outros, parecem, também, estar envolvidos na regulação da luteólise.

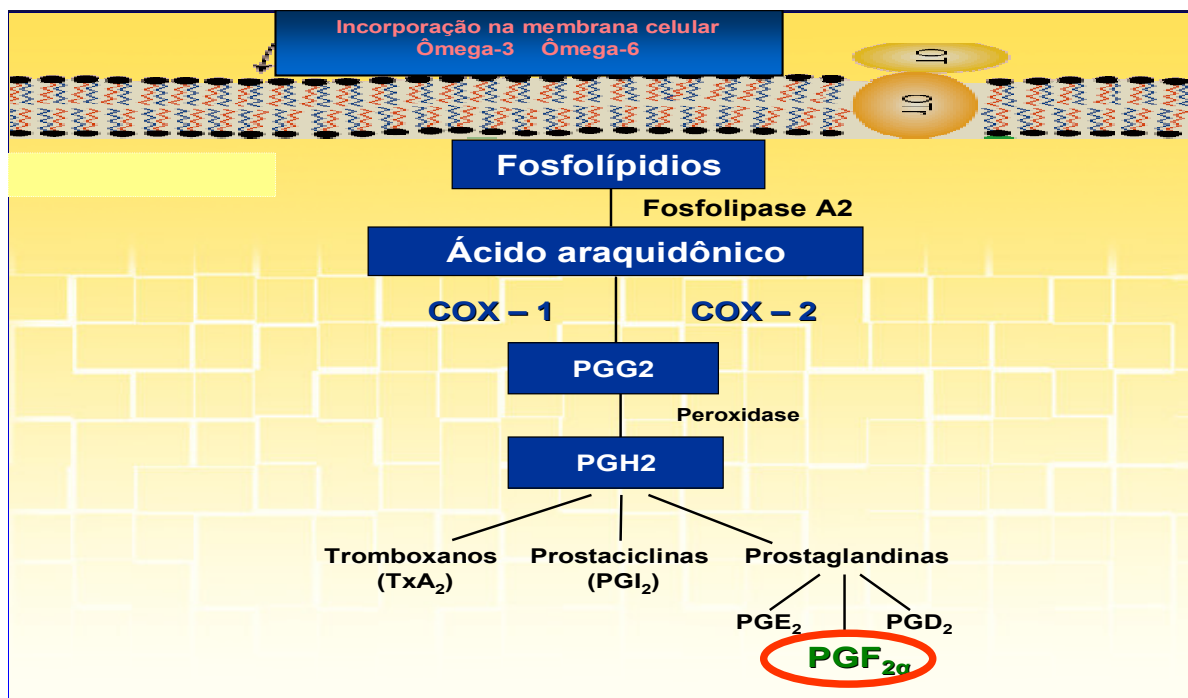


Figura 2- Biossíntese de $PGF_{2\alpha}$ a partir da cascata do ácido araquidônico (Oliveira, 2007).

Com relação à COX-1 e COX-2, são isoenzimas estruturalmente distintas e sua diferenciação está determinada pela atividade e localização. A COX-1 é sintetizada constitutivamente na maioria dos tecidos como o colo, rins, baço, estômago, fígado, pulmão, coração e cérebro. A COX-2 é uma enzima formada, principalmente, de maneira induzida por diferentes estímulos intra e extracelulares, como lipopolissacarídeos, interleucinas ($IL-1\beta$ e $IL-2$), fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$), fator ativador de plaquetas (PAF), fator de crescimento (EGF e PDGF), interferon gama ($IF-\gamma$), endotelinas, citoquinas e alguns oncogenes (Diaz et al., 1992). Em condições fisiológicas normais é expressa em tecido gástrico, ovárico, uterino, renal, medula espinal, sistema nervoso central e, no sistema reprodutivo está implicada em eventos como: ovulação, implantação embrionária, eclosão do blastocisto e parto (Sirois, 1994). Xie et al. (1992) conseguiram determinar a seqüência de aminoácidos demonstrando aproximadamente 60% de homogeneidade entre as duas isoformas

em diferentes espécies e, 90% de homogeneidade observada na COX-2 em diferentes espécies.

A diferença estrutural das duas isoformas está determinada pela seqüência de aminoácidos que as compõem. A COX-1 é formada por uma seqüência de 17 aminoácidos no domínio N-terminal, enquanto que, a COX-2 é composta por uma seqüência de 18 aminoácidos no domínio C-terminal (Creminon et al., 1995). No entanto, as duas isoformas apresentam em sua estrutura um lugar chamado de local ativo da ciclooxigenase, formado por um canal hidrofóbico de aminoácidos (Arginina-120 e Tirosina-355), o qual tem a capacidade de interagir com o grupo carboxílico dos antiinflamatórios, formando uma ligação iônica no local ativo da COX, desencadeando-se o mecanismo de ação dos AINEs (Flower, 2003).

Alguns estudos mais recentes demonstraram outro mecanismo que conduz à liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, desencadeado pela manipulação inadequada do trato uterino durante a inovulação do embrião (Purcell et al., 2005), ocasionando um trauma da parede endometrial seguido de uma reação inflamatória local, que poderia levar à ativação de alguns mediadores químicos como o $\text{TNF-}\alpha$ e algumas células epiteliais que são liberadas a partir da ativação da PLA_2 e síntese do óxido nítrico (Scenna et al., 2005). Este reconhecido processo é capaz de produzir síntese das prostaglandinas, incluindo a $\text{PGF}_{2\alpha}$, afetando ou retardando o desenvolvimento do embrião e provavelmente ocasionando morte embrionária (Scenna et al., 2004).

2.6 Fatores que afetam os programas de TE

Um dos grandes desafios na aplicação de biotecnologias na reprodução bovina refere-se principalmente ao conhecimento das causas multifatoriais que afetam os programas de TE (Bényei et al., 2006) que, geralmente, são de difícil diagnóstico (Vanroose et al., 2000). Segundo Labérnia et al. (1996), existem diversos fatores que afetam este tipo de programa, na maioria das vezes, relacionados a fatores infecciosos, não infecciosos, genéticos, maternos e ambientais.

A interação desses fatores leva a apresentar, na maioria das vezes, perdas gestacionais por mortalidade embrionária, principal evento que afeta os programas de TE, causando grande prejuízo econômico nos rebanhos bovinos mundiais pela perda do material genético e alto investimento, sendo também responsável pelo aumento no intervalo de partos das fêmeas (Sartori, 2004). A maioria das perdas embrionárias ocorre durante o período embrionário da gestação (< 45 dias) tanto em bovinos de corte quanto de leite (Vanroose et al., 2000). Segundo Sartori. (2004), esse evento é observado nos primeiros dias após a concepção e durante o mecanismo de implantação embrionária.

De acordo com Santos et al. (2004), os índices de mortalidade embrionária, geralmente, são observados em torno de 20 a 40% no período embrionário e, até o final da gestação é possível observar em torno de 60%, principalmente em gado leiteiro (Figura 3). Contudo, Santos et al. (2004) caracterizaram as perdas da gestação em três estádios: perda embrionária precoce (ocorre dentro dos primeiros 24 dias da gestação), perda embrionária tardia (entre os dias 24 a 50 da gestação) e perda fetal (após o 50° dia da gestação).

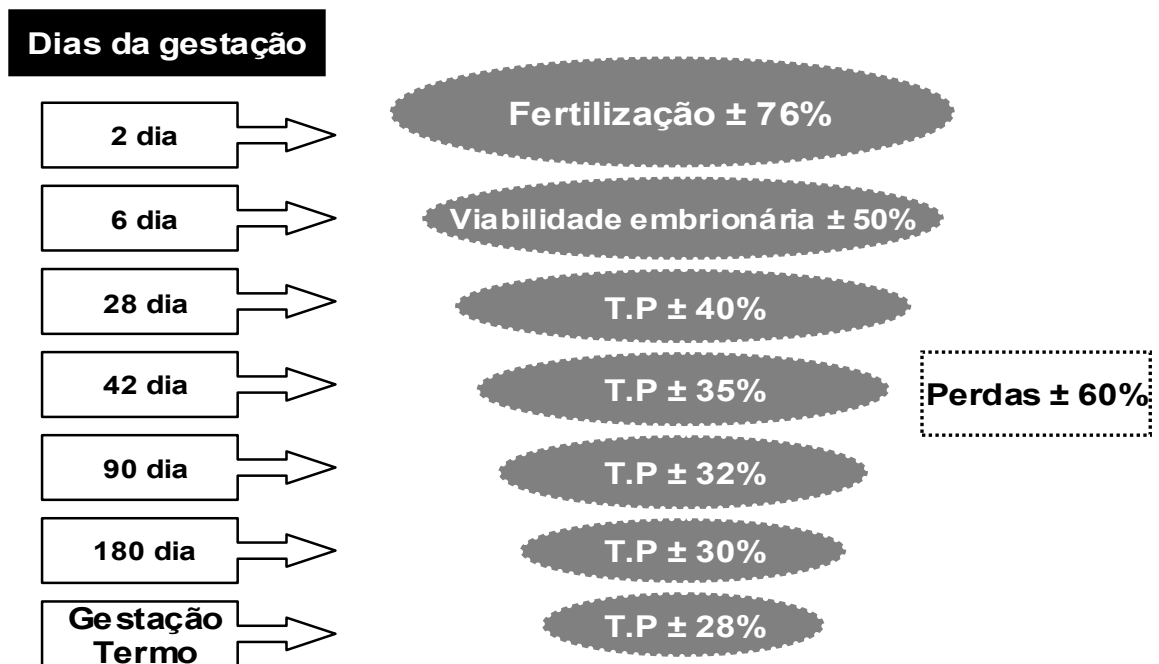


Figura 3- Caracterização das perdas da gestação em vacas de alta produção leiteira (Santos et al., 2004).

No entanto, alguns estudos indicaram que fatores relacionados inicialmente à qualidade do embrião poderiam afetar os programas de TE em bovinos (Coleman et al., 1987).

Estudos mais recentes avaliaram o efeito da qualidade do embrião e do estágio de desenvolvimento nas taxas de prenhez em bovinos. Spell et al. (2001) não observaram diferenças significativas nas taxas de prenhez quanto à avaliação dos embriões por qualidade ou estágio de desenvolvimento. Já os resultados observados por Hasler. (2001), concordando com o trabalho de Coleman et al. (1987), determinaram maior importância na avaliação dos embriões por qualidade no sucesso do programas de TE, quando comparado, com o estágio de desenvolvimento.

Spell et al. (2001) relacionaram a importância da avaliação do tamanho do corpo lúteo como fator que poderia influenciar as taxas de prenhez em programas de TE. Peterson e Lee. (2003) sugeriram que a avaliação da qualidade do CL está relacionada com a sobrevivência e viabilidade do embrião.

Cooper et al. (1991) associaram a PGF_{2α} como causa de mortalidade embrionária em vacas com fase lútea curta, após a primeira ovulação pós-parto, devido à liberação precoce de PGF_{2α}. Schrick et al. (1993) sugeriram que o ambiente uterino compreende um papel importante na sobrevivência embrionária de vacas com fase lútea curta ao ser relacionado com vacas de fase lútea normal. Em estudos mais recentes, Seals et al. (1998) determinaram o efeito negativo de PGF_{2α} sobre o embrião, afetando o mecanismo de desenvolvimento.

Odensvik et al. (1993), Elli et al. (2001) e Scenna et al. (2005) relataram que a manipulação inadequada e excessiva do trato reprodutivo durante a involução dos embriões, desencadeia um processo inflamatório local, estimulando a formação prematura de PGF_{2α}, causando morte embrionária precoce.

Embora existam outros fatores internos e externos ao embrião que possam influenciar o sucesso dos programas de TE. A involução de embriões produzidos a fresco ou congelados apresenta marcada diferença nas porcentagens de gestação, segundo Looney et al. (2006), as taxas de prenhez para embriões a fresco têm de 8,5 a 14% mais probabilidades de prenhez quando comparadas a embriões congelados. Este estudo corrobora com o observado anteriormente por Hasler. (2001), no qual observou diferença significativa ($P < 0,05$) nas taxas de prenhez de embriões transferidos a fresco (60,7%) em relação a embriões congelados (38,5%).

Dentro dos principais fatores externos, reportados pela literatura, que podem afetar o sucesso dos programas de TE, encontra-se o efeito do protocolo de sincronização do estro da receptora (Bényei et al., 2006). Diferentes métodos de sincronização foram utilizados anteriormente, como é o caso das prostaglandinas que proporcionaram resultados importantes na sincronização do estro, com observação de altas taxas de prenhez (Coleman et al., 1987). Apesar dos estudos anteriores terem demonstrado eficiência, mais recentemente foram incorporados novos protocolos com aplicação de dispositivos de liberação controlada de progesterona associados ao BE e $\text{PGF}_{2\alpha}$, o que proporcionou maior número de receptoras selecionadas e taxas de prenhez altamente significativas (Nasser et al., 2004 e Bó et al., 2006).

2.7 Uso de antiinflamatórios como estratégia anti-prostaglandínica

O primeiro antiinflamatório introduzido no mercado se deu no ano de 1899 com a Aspirina. A partir desse momento, numerosos compostos têm sido desenvolvidos e comercializados no mundo inteiro. Tanto na medicina humana quanto na veterinária, os antiinflamatórios não esteróides foram e continuam sendo o tratamento de eleição para muitas doenças associadas a processos inflamatórios (Cruz, 2005).

Na medicina veterinária, a preocupação por tentar melhorar a eficiência reprodutiva nas fêmeas bovinas, tem visualizado e dirigido algumas pesquisas na utilização de antiinflamatórios não esteróides (AINEs), em receptoras de embriões, como ferramenta anti-prostaglandínica ou anti-luteolítica, com a intenção de preservar a integridade do embrião e a funcionalidade do corpo lúteo (Schrick et al., 2001).

Os AINEs são produtos farmacológicos que além de cumprir a função antiinflamatória, também têm como atividade terapêutica o efeito analgésico e antipirético (Hall et al., 2001).

O mecanismo de ação dos AINEs é reconhecido pela inibição da atividade da enzima ciclooxigenase, resultando no bloqueio na formação das prostaglandinas,

tromboxanos e prostaciclinas a partir do ácido araquidônico (Binelli et al., 2001) (Figura 4).

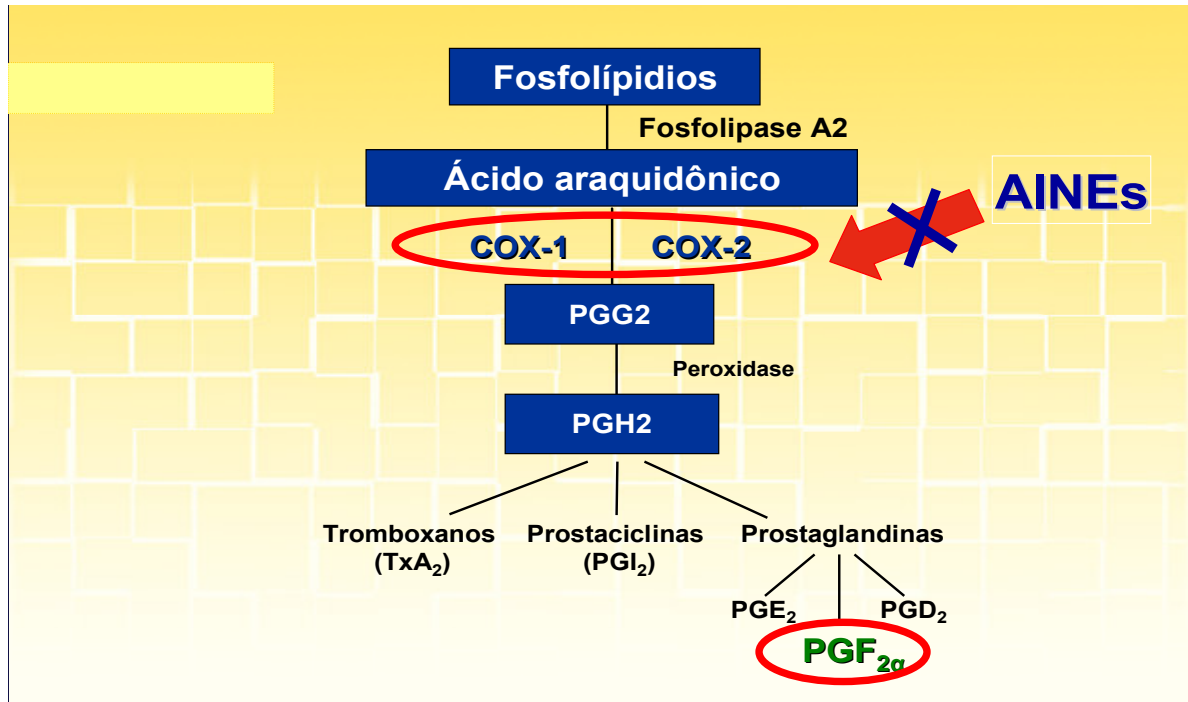


Figura 4- Mecanismo de ação dos AINEs no bloqueio da ciclooxigenase (Oliveira, 2007).

Os AINEs podem ser classificados de forma geral como: AINEs clássicos ou não seletivos que têm como mecanismo de ação, a inibição das duas isoformas da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) e AINEs seletivos, que têm como mecanismo a inibição só da isoforma COX-2. Além da classificação geral, existe uma classificação de acordo com a estrutura química de cada composto: derivados do ácido acético, propiônico ou isoxicam.

Apesar da diversidade química dos AINEs, existe uma característica estrutural na maioria dos compostos que é a presença de um grupo carboxílico capaz de formar uma ligação iônica com o aminoácido localizado no local ativo da ciclooxigenase (Arginina-120 ou Tirosina-355). As restantes interações entre a COX e os antiinflamatórios tendem a ser hidrofóbicas, com exceção da Serina, que estabelece uma ligação de hidrogênio (Cruz, 2005).

No trabalho realizado por Dannhardt e Kiefer. (2001), no qual submeteram os principais AINEs não seletivos a ensaios *in vitro*, utilizando sangue total humano para avaliar a atividade inibitória da COX, os resultados observados demonstraram que todos os compostos inibiram de forma eficaz as duas isoformas da COX, porém a potência inibidora da COX-1 foi melhor frente à COX-2, com exceção do Diclofenaco que apresentou maior atividade inibidora para a COX-2.

Antes do conhecimento da COX-2, apresentou-se a comercialização de uma série de compostos com potentes propriedades antiinflamatórias e com reduzidos efeitos adversos. Pouco tempo depois da descoberta da especificidade destes produtos como inibidores específicos da isoenzima COX-2, comprovou-se que estes compostos atuavam através da inibição seletiva da COX. As primeiras observações clínicas de reações adversas ou efeitos colaterais dos AINEs foram estudadas em humanos, indicando sérias complicações do sistema gastrointestinal como úlceras gástricas (Carvalho et al., 2004), duodenais, erosões, sangramento, perfurações e esofagite (Radi e Khan, 2006) .

De acordo com Kummer e Coelho. (2002), os maiores efeitos colaterais são observados basicamente em humanos afetando o sistema renal, cardiovascular e gastrointestinal. No entanto, na medicina veterinária, os AINEs não seletivos principalmente, foram associados a sérias afecções gastrointestinais em cães, felinos, eqüinos, roedores e primatas, ocasionando hemorragias, úlceras, erosões e perfurações. Porém, em bovinos e caprinos, não foram detectadas complicações gástricas após a administração de AINEs não seletivos, especificamente dos derivados do ácido propiônico (Ibuprofeno) aplicado em altas concentrações por via venosa ou oral (DeGraves et al., 1993a e DeGraves et al., 1993b).

2.7.1 Antiinflamatórios não seletivos

O Flunixin Meglumine (FM), antiinflamatório mais utilizado na prática veterinária (Kopcha et al., 1992), é um derivado trifluorado do ácido nicotínico, potente antiinflamatório não esteróide, inibidor da enzima COX na cascata do ácido araquidônico. Tem uma meia vida curta de 1,6 a 3,5 horas em bovinos, sendo rapidamente absorvido e sua ação terapêutica pode ser mantida até 24 horas após a

aplicação, pela forte ligação à enzima ciclooxigenase. A toxicidade do FM não é muito alta e é considerado, dentre os antiinflamatórios, o que possui menor efeito colateral.

Odensvick et al. (1989) relataram maior efeito do FM ao ser comparado com o ácido acetil-salicílico. Embora a utilidade a campo ainda seja questionável, apresenta desvantagem em inibir de maneira não específica a síntese de todas as prostaglandinas (PGF_{2α} e PGE₂), situação que poderia interferir na viabilidade dos embriões bovinos pela inibição das prostaglandinas que se originam de processos fisiológicos normais, principalmente da PGE₂, necessária para a movimentação do embrião pelo trato uterino.

Odensvick et al. (1998) compararam o efeito do FM, em novilhas européias, utilizando-se 2,2 mg/kg de peso vivo, por via oral, com dois, três e quatro aplicações ao dia, por 9 dias, iniciando no 15° dia do ciclo estral, com o objetivo de avaliar a duração da funcionalidade do corpo lúteo. O resultado só foi eficaz no grupo que recebeu quatro aplicações ao dia, observando um prolongamento da fase lútea e do ciclo estral ao ser comparado com o grupo controle.

Já na espécie ovina, Aké-López. (2000) avaliou o efeito de duas aplicações diárias de 2,2 mg/kg de peso vivo de FM, por 8 dias a partir do 5° dia após a inovulação do embrião, com a finalidade de proporcionar suporte ao corpo lúteo no período crítico da gestação. Como resultado observado, não encontrou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos nas taxas de prenhez. O grupo FM apresentou 50% de prenhez, quando comparado aos 40% do grupo controle. No entanto, o estudo conseguiu demonstrar o efeito do FM no prolongamento da fase lútea na espécie ovina por 1,3 dias.

Mais recentemente, Scenna et al. (2005) realizaram um estudo em vacas e novilhas, avaliando o efeito na administração de 10 ml de FM momento antes ou depois da inovulação dos embriões, sendo de origem a fresco ou congelado. O resultado obtido demonstrou diferença significativa ($P < 0,02$) nas taxas de prenhez do grupo tratado com FM (65,3%) quando comparado com os resultados do grupo controle, respectivamente (60,2%). Além disso, autores avaliaram a influência da manipulação do trato reprodutivo durante a inovulação dos embriões sobre as taxas de prenhez, no qual concluíram que a mínima manipulação realizada no trato reprodutivo durante a inovulação dos embriões desencadeia um processo

inflamatório localizado com liberação precoce de $\text{PGF}_{2\alpha}$, afetando o desenvolvimento do embrião e conseqüentemente o sucesso dos programas de TE.

Purcell et al. (2005) observaram que vacas de corte em lactação, tratadas com 500 mg de FM de 2 a 12 minutos antes da inovulação de embriões a fresco ou congelado, apresentaram melhores taxas de prenhez (63,8%) ao ser comparadas com as do grupo controle, respectivamente (51,5%).

Diferente dos dois trabalhos anteriores, McNaughtan (2004) não detectou nenhum efeito na aplicação do FM na melhoria das taxas de prenhez em novilhas da raça Hereford x Angus, administrando o antiinflamatório antes da inovulação dos embriões.

Negreiros et al. (2007) avaliaram a resposta do FM nas taxas de prenhez em vacas leiteiras Girolandas submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo, os autores destacaram que o FM inibiu a síntese das PG, protegeu a funcionalidade do corpo lúteo e melhorou os índices de prenhez das fêmeas tratadas.

Entretanto, uma abordagem alternativa na utilização de antiinflamatórios não esteróides, como estratégia anti-prostaglandínica ou anti-luteolítica, para melhorar os índices reprodutivos em bovinos está baseada na utilização de outro tipo de composto, denominado Ibuprofeno ($\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_2$), potente antiinflamatório não seletivo, derivado do ácido propiônico com mecanismo de ação similar ao FM na inibição da síntese das duas isoformas da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2). Com meia vida curta de 2 a 3 horas e, rapidamente absorvido, metabolizado via hepática e excretado pela urina. Elli et al. (2001) avaliaram o efeito do Ibuprofeno em novilhas holandesas (5 mg/kg de peso vivo, i.m.) uma hora antes da inovulação dos embriões, sendo oriundos de programa de TE e criopreservados e, como resultado encontraram diferenças significativas ($P < 0,05$) nas taxas de prenhez das novilhas tratadas com Ibuprofeno (82%) comparado com os resultados do grupo não tratado ou controle (56%).

2.7.2 Antiinflamatórios seletivos da COX-2

Guzeloglu e Erdem (2007) em estudo mais recente avaliaram a resposta do Meloxicam (AINEs seletivo), visando melhorar as taxas de prenhez em novilhas holandesas submetidas a um programa de inseminação artificial. Os animais do grupo tratado receberam uma dose de 0,5 mg/kg de peso vivo, via subcutânea, no 15º dia do ciclo estral, os resultados apresentados no estudo determinaram diminuição significativa ($P < 0,01$) nas taxas de prenhez do grupo tratado (24,3%) quando comparadas com as fêmeas do grupo controle (52%). Os autores concluíram que o uso do Meloxicam apresentou mudanças no ambiente uterino, prejudicando a viabilidade do embrião, representado nas baixas taxas de prenhez do grupo tratado.

2.8 Dispositivo de liberação controlada

Na medicina veterinária, a maioria dos sistemas de liberação controlada é composta de materiais não degradáveis como silicone, poliuretano e copolímeros de etileno-vinilacetato, materiais biologicamente inertes que precisam ser removidos ao final do tratamento.

Mais recentemente com a incorporação ao mercado de materiais poliméricos biodegradáveis que controlam o mecanismo de liberação dos medicamentos sem requerer ser removidos ao final do tratamento, permitiu a utilização de fármacos por longos períodos de tempo, prolongando a ação terapêutica destes, trazendo benefícios como diminuição dos níveis de estresse, redução dos custos com os tratamentos e diminuição no manejo dos animais (Winzenburg et al., 2004), observado principalmente, nas espécies bovina, caprina, ovina, suína e aviar. A maioria destes dispositivos poliméricos compostos de materiais biodegradáveis possui como principal vantagem, a degradação em subprodutos não tóxicos, que podem ser eliminados por excreção ou serem

absorvidos pelo organismo tornando-se desnecessária a remoção após a aplicação (Joziase, 1993).

Dentre a principal característica que os materiais biodegradáveis devem ter é a simulação das propriedades dos tecidos na medida do possível. Para que isso ocorra, o material tem que possuir alguns requisitos básicos como viabilidade funcional, bioestabilidade, biocompatibilidade e capacidade de esterilização (Ceroni Filho, 2004).

Os materiais biodegradáveis, mais comumente utilizados são: PLA – poli(ácido láctico), PGA – poli(ácido glicólico), PCL – poli(ϵ -caprolactona) e PLGA – poli(ácido láctico co-glicólico). Estes materiais são especialmente utilizados porque cumprem com todas as características necessárias descritas por Ceroni Filho. (2004).

A liberação controlada de fármacos tem despertado grande interesse, oferecendo inúmeras vantagens em relação ao sistema convencional de dosagem de medicamentos. Entre elas é possível citar a redução da toxicidade, devido que o fármaco é mantido em níveis terapeuticamente desejáveis no plasma e permite a aplicação de quantidades menores, utilizando uma única dose, regulada pelo próprio organismo (Bakker-Woudenberg, 2002) (Figura 5).

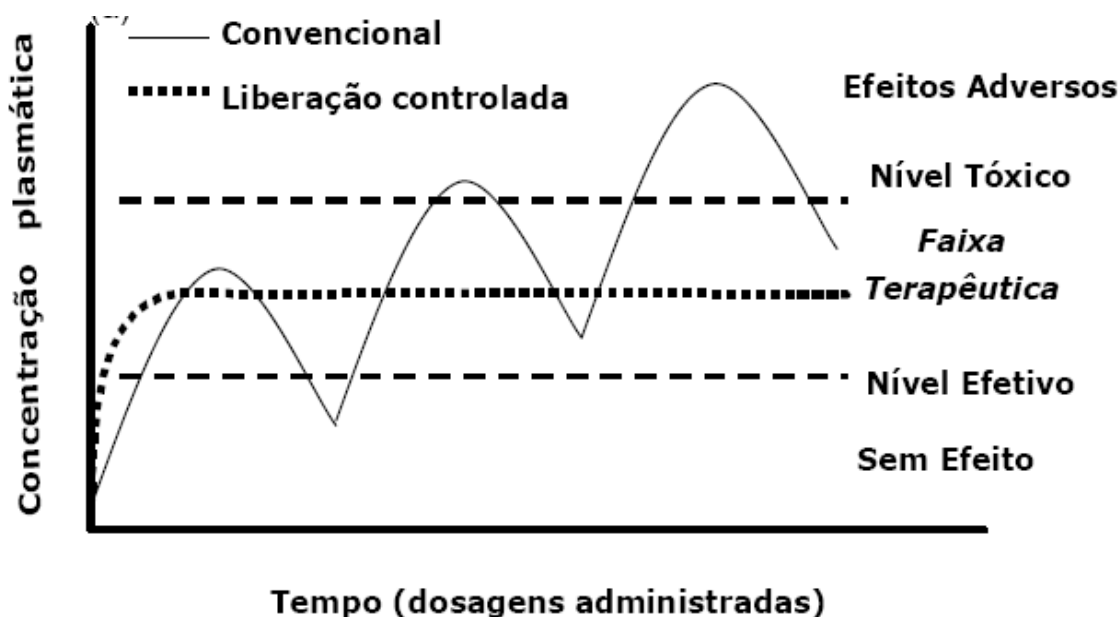


Figura 5- Variação da concentração plasmática efetiva de compostos farmacológicos em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada (Azevedo, 2005).

Atualmente, na medicina humana e veterinária, a formação de polímeros biodegradáveis esta dirigida à liberação controlada de hormônios (Martel, 1998), antibióticos (Benoit, 1997), antiinflamatórios e analgésicos (Newa et al., 2007), principalmente.

O PLGA é o polímero mais empregado devido à sua biocompatibilidade, aprovação legalizada de uso, boa taxa de degradação e por possuir propriedades mecânicas que podem ser moduladas em razão da sua composição lactídeo/glicolídeo. Este polímero é degradado em ácidos láctico e glicólico, os quais são facilmente eliminados na forma de CO₂ e água.

O Pluronic é outro tipo de polímero biodegradável, constituído por duas moléculas de polioxietileno (composto hidrofílico) e uma molécula de polioxipropileno (composto hidrofóbico). As soluções aquosas de Pluronic são atóxicas e estáveis, por isso são adequadas para a utilização em produtos injetáveis (Veyries et al., 1999). Os compostos formados por Pluronic apresentam características de termosensibilidade (Schmolka, 1972) de forma que, a uma temperatura abaixo da sua temperatura micelar crítica (TMC) (11 °C), o composto se encontra em estado líquido e suas moléculas comportam-se como copolímeros individuais (não associados). Acima da TMC, o polímero torna-se mais hidrofóbico passando a estado de gel. Estes fatores influenciam diretamente na liberação de fármacos (Oh et al., 2004).

Há um grande número de técnicas disponíveis para a encapsulação de ativos como o método de emulsificação e evaporação de solvente. Este processo consiste em uma emulsificação óleo/água, onde o polímero é dissolvido em solvente orgânico volátil. A solução polímero/fármaco/solvente é emulsificada em condições de agitação e temperatura adequada em presença do emulsificante – Álcool polivinílico (PVA). A emulsão formada é submetida à remoção do solvente por evaporação sob agitação severa. Finalmente o polímero é coletado (Ceroni Filho, 2004).

Este método é adequado apenas para encapsular fármacos hidrofóbicos, pois os hidrofílicos dissolvem-se em água, resultando em baixa eficiência de encapsulação. A alternativa para encapsular compostos hidrofílicos é a emulsificação óleo/óleo, dissolve-se o polímero e o ativo em um solvente orgânico miscível em água e utiliza-se um óleo como fase contínua da emulsão. Após isso o polímero é obtido por remoção do solvente (Azevedo, 2005).

Portanto, acredita-se, que a administração do Ibuprofeno mediante a utilização de um dispositivo de liberação controlada, compostos por materiais biodegradáveis, poderia garantir a faixa terapêutica do medicamento durante os dias do tratamento, facilitando o manejo dos animais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O trabalho foi conduzido na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) Extremo Oeste - Andradina (SP), entre os meses de novembro de 2007 até fevereiro de 2008. O município está localizado a 20°50' de latitude Sul e 51° 21' de longitude Oeste, com tipo climático Aw (Koppen). O clima pode ser caracterizado como tropical chuvoso com inverno seco, com precipitação pluviométrica média de 1.268mm ao ano.

3.2 Embriões

Os embriões foram colhidos e congelados em trabalhos anteriormente realizados na APTA, Extremo Oeste entre os anos de 2003, 2006 e 2007 pelo método não cirúrgico sete dias após o início do estro, os embriões foram classificados de acordo com a qualidade e estágio de desenvolvimento, segundo a IETS (Tabela 1).

Tabela 1- Descrição da classificação e qualidade embrionária.

Classificação / Qualidade	Descrição
1 / Excelente ou Bom	Massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros individuais, que são uniformes em tamanho, cor e densidade. A zona pelúcida deve ser lisa e não ter superfícies côncavas ou planas.
2 / Regular	Irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 50% do material celular devem compor uma massa embrionária viável e intacta.
3 / Pobre	Irregularidades maiores na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 25% do material celular devem formar uma massa embrionária viável e intacta.
4 / Morto ou degenerado	Embriões em degeneração, ovócitos ou embriões de uma célula: não viáveis.

Stringfellow e Seidel (1999).

3.3 Receptoras

De um total de 270 fêmeas zebuínas solteiras e cíclicas disponíveis para pesquisa, foram selecionadas para o estudo 100 fêmeas como possíveis receptoras de acordo com os seguintes critérios: avaliação clínica geral, exame ginecológico completo (palpação por via retal do trato reprodutivo), peso vivo e qualificação do escore corporal na escala de 1 a 9, de acordo com Richard et al. (1986). Em relação ao tipo teve-se: 70 vacas Nelore Padrão com idade média entre 4 e 5 anos e 30 novilhas Nelore Mocho com idade média entre 2 a 3 anos, identificadas por numeração marcada a ferro quente.

As fêmeas foram mantidas em piquetes de capim *Brachiaria decumbens*, com suplementação mineral e água “*ad libitum*”.

Para um adequado manejo das receptoras foram conformados 4 lotes, cada lote foi sincronizado de maneira individual e a inovulação dos embriões foi realizada em tempo fixo.

Para a formação dos lotes foram consideradas as médias das seguintes características: peso e escore corporal, além da raça e tipo de receptora (primípara ou múltipara):

- **Lote 1:** 20 vacas Nelore Padrão, com peso médio de 539 kg, escore corporal de 7,5 a 8.
- **Lote 2:** 20 vacas Nelore Padrão, com peso médio de 501 kg, escore corporal de 7,5.
- **Lote 3:** 30 vacas Nelore Padrão, com peso médio de 482 kg, escore corporal de 7 a 7,5.
- **Lote 4:** 30 novilhas Nelore Mocho, com peso médio de 350 kg, escore corporal de 6 a 7.



A) Novilhas Nelore (*Bos indicus*).



Figura 6- Escore corporal do rebanho de novilhas (A) e vacas (B) da Fazenda Experimental da APTA, Extremo Oeste.

3.4 Sincronização do estro das receptoras

Em dia aleatório do ciclo estral, todos os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR[®], Pfizer, Brasil) mais uma aplicação intramuscular de 2ml de Cronibest[®] (2mg de Benzoato de Estradiol, Biogenesis Brasil), sendo este considerado como o dia 0 (D₀). No dia 8 (D₈) foi realizada a remoção do dispositivo intravaginal e uma aplicação intramuscular de 2ml de Cronibem[®] - PGF_{2α} (150μg de D-cloprostenol, Biogenesis Brasil) e 24 horas após (D₉) a dose de PGF_{2α}, foi administrado 1ml de Cronibest[®] (1mg de Benzoato de Estradiol, Biogenesis Brasil), como representado no esquema seguinte (Figura 7).

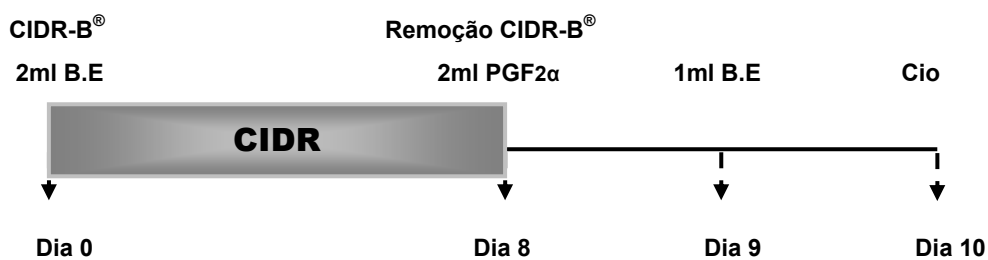


Figura 7- Protocolo hormonal de sincronização do estro realizado em receptoras da raça Nelore. BE= Benzoato de estradiol.

3.5 Seleção das receptoras

No dia anterior à inovulação dos embriões, as receptoras foram submetidas a exame específico dos ovários e cornos uterinos por ultra-sonografia (modelo ScanVet 200, Pie Medical) utilizando transdutor linear 5.0/7.5 Mhz por via transretal, registrando todas as estruturas presentes em ambos os ovários, localização do CL e diâmetro. A pontuação utilizada para avaliação do diâmetro do CL foi de 1 a 3, sendo, qualidade 1 - excelentes ou bons com diâmetro ≥ 13 mm e consistência firme; qualidade 2 – regular com diâmetro entre 10 – 13mm e qualidade 3 – ruins com diâmetro < 10 mm (Purcell et al., 2005). Somente as receptoras com CL de qualidade 1 foram utilizadas para os devidos fins, somando um total de 76 receptoras.

3.6 Descongelamento e inovulação dos embriões

Os embriões foram descongelados por 10 segundos no ar e colocados por 20 segundos no banho-maria a 30°C.

As 76 receptoras inovuladas foram submetidas à anestesia epidural baixa com 4 ml de Cloridrato de Lidocaína a 2%, foi feita limpeza do reto e higienização da genitália externa com lavagem em água e desinfecção com álcool 70%. A

inovação dos embriões foi realizada por procedimento não cirúrgico, no corno uterino ipsilateral ao ovário com corpo lúteo, no 7º dia do ciclo estral.

3.7 Variáveis avaliadas

3.7.1 Qualidade dos embriões

Avaliou-se o efeito da qualidade do embrião sobre as taxas de prenhez dos grupos experimentais. Os embriões inovulados eram de qualidade I, II e III.

3.7.2 Grau de manipulação do trato reprodutivo

Avaliou-se o efeito do grau de manipulação do trato reprodutivo sobre as taxas de prenhez dos grupos experimentais, tendo em conta a dificuldade de transposição do aplicador pela cérvix até a deposição do embrião. Os critérios utilizados para qualificar o grau de manipulação do trato reprodutivo foram descritos por Scenna et al. (2005) (Tabela 2).

Tabela 2- Descrição dos parâmetros utilizados para avaliar o grau de manipulação do trato reprodutivo realizado nas receptoras durante a inovação dos embriões.

Qualificação	Descrição
Grau 1	Manipulação mínima do trato reprodutivo
Grau 2	Manipulação moderada do trato reprodutivo
Grau 3	Manipulação excessiva do trato reprodutivo

3.8 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram conformados uma hora antes da inovulação dos embriões, as receptoras foram distribuídas ao acaso, objetivando evitar efeitos individuais nos resultados.

Grupo 1 (controle): Foram inovuladas 25 receptoras e em cada uma foi administrada uma dose de 5ml de solução salina fisiológica (i.m.), uma hora antes da inovulação dos embriões (Figura 8).

Grupo 2 (Ibuprofeno-IM): Foram inovuladas 30 receptoras e em cada uma foi administrada uma dose de 5mg/kg (i.m.) de Ibuprofeno uma hora antes da inovulação dos embriões(Figura 8).

Grupo 3 (polímero-IB): Foram inovuladas 21 receptoras e em cada uma foi aplicado um dispositivo de liberação controlada de Ibuprofeno (polímero de Ibuprofeno) por via subcutânea na região da tábua do pescoço, uma hora antes da inovulação dos embriões (Figura 8).



Figura 8- Esquema utilizado nos 3 grupos experimentais.

3.9 Preparação do dispositivo de liberação controlada de Ibuprofeno e da solução injetável de Ibuprofeno

Em um Becker de 50 ml preparou-se uma solução aquosa de 80 gramas de Pluronic[®] F-127 (Sigma-Aldrich Chemical Co, Estados Unidos) e 80 gramas de álcool polivinílico (PVA) (Sigma-Aldrich Chemical Co, Estados Unidos) em uma concentração de 1,2% para cada um, sob agitação constante em agitador magnético a 400 x g por um minuto. Em outro Becker de 50 ml dissolveu-se poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) (Sigma-Aldrich Chemical Co, Estados Unidos) em 5 ml de acetona em uma concentração de 2,9% massa/volume e adicionou-se 15 gramas de Ibuprofeno[®] (Henrifarma, Brasil). Utilizando um funil de vidro, verteram-se, lentamente, as duas soluções que foram submetidas à agitação mecânica a 400 x g por um minuto (solvente + polímero + Ibuprofeno). Em seguida, a emulsão formada foi submetida à remoção total do solvente por evaporação sob agitação severa por 12 horas. Após a agitação, a solução restante foi submetida à centrifugação 10.000 x g por 30 minutos. Ao final, o composto (polímero) foi lavado com água destilada por três vezes consecutivas e congelado a - 4°C (Azevedo, 2005).

Na solução injetável (intramuscular) utilizou-se o Ibuprofeno a 40% em propilenoglicol[®] (Farma Diet, Brasil). Antes da administração do medicamento, foi submetido a 37°C em banho-maria por 15 minutos, para homogeneização total do fármaco.

3.10 Diagnóstico da gestação

O diagnóstico da gestação foi realizado por meio de ultra-sonografia (modelo ScanVet 200, Pie Medical) utilizando transdutor linear 5.0/7.5 Mhz por via transretal, 35 a 40 dias após a inovulação dos embriões.

3.11 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa estatístico, Statistical Analysis System for Windows (SAS, 1996). As variáveis dependentes foram expressas em média e erro padrão da média (média \pm E.P.M) e analisadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As comparações entre proporções foram realizadas pelo teste Qui-quadrado (χ^2).

4 RESULTADOS

4.1 Sincronização do estro das receptoras

De acordo com a análise de variância foi possível determinar diferenças significativas ($P < 0,05$) nos valores médios de diâmetro do CL, peso vivo e condição corporal para as receptoras que apresentaram CL1 ($\geq 13\text{mm}$).

Os valores achados para diâmetro do CL foram de $17,41 \pm 0,57$ e $15,61 \pm 0,48$, para vacas e novilhas, respectivamente. Em relação ao peso vivo e condição corporal, os valores encontrados nas vacas foram de $500,69 \pm 5,93$ e $7,47 \pm 0,48$ e nas novilhas de $356 \pm 7,0$ e $6,60 \pm 0,93$, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3- Valores médios (média \pm E.P.M) do diâmetro do CL (mm), peso vivo (kg) e condição corporal, das receptoras inovuladas após o tratamento de sincronização do estro.

Efeito	N	Diâmetro médio do CL (mm)	Peso vivo médio (kg)	Condição corporal média
Vacas	56	$17,41 \pm 0,57^a$	$500,69 \pm 5,93^a$	$7,47 \pm 0,48^a$
Novilhas	24	$15,61 \pm 0,48^b$	$356 \pm 7,01^b$	$6,60 \pm 0,93^b$

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Das 70 vacas submetidas ao protocolo de sincronização do estro, 90% (n=63) responderam ao tratamento hormonal avaliado na formação de CL independente do diâmetro encontrado e, de forma similar, das 30 novilhas submetidas à sincronização do estro, 83,3% (n=25) formaram CL independente do diâmetro. Com relação à taxa de aproveitamento, os resultados demonstraram diferença significativa ($P<0,05$) para as vacas (78,5%) quando comparadas às novilhas (70%).

Do total de vacas que responderam ao protocolo hormonal, 80%, 7,1% e 2,8% apresentaram CL1, CL2 e CL3, respectivamente.

De acordo com a resposta das novilhas, 80% apresentaram CL1 e 3,3% apresentou CL2.

Apesar de nenhuma novilha ter apresentado CL3, foi observada uma porcentagem maior de novilhas que não ovularam (16,7%) em relação às vacas (10%) (Tabela 4).

Da mesma forma, foi possível determinar a localização do CL e observou-se maior ocorrência no ovário direito do que no ovário esquerdo, com predominância de 63,4% e 72% de CL no ovário direito e 36,5% e 28% de CL no ovário esquerdo para vacas e novilhas, respectivamente.

Tabela 4- Taxa de aproveitamento e classificação do diâmetro do corpo lúteo conforme a resposta após o protocolo de sincronização do estro.

Tipo	N	Taxa de aproveitamento (%)	CL1 ($\geq 13\text{mm}$)	CL2 (10-13mm)	CL3 ($< 10\text{mm}$)	N.O
Vaca	70	78,5 (55/70) ^a	80% (56/70)	7,1% (5/70)	2,8% (2/70)	10% (7/70)
Novilha	30	70 (21/30) ^b	80% (24/30)	3,3% (1/30)	0%	16,7% (5/30)

N.O = Não Ovularam.

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Tukey ($P<0,05$).

4.2 Taxa de prenhez das receptoras

A taxa de prenhez total observada para os 3 grupos experimentais (controle, Ibuprofeno-IM e polímero-IB) foi de 16%, 43,3% e 14,2%, respectivamente. Houve diferença significativa ($P < 0,024$) do grupo Ibuprofeno-IM quando comparado aos grupos controle e polímero-IB. Portanto, o grupo Ibuprofeno-IM apresentou um aumento de 27,3% em relação ao grupo controle e de 29,1% respeito ao grupo polímero-IB (Figura 9).

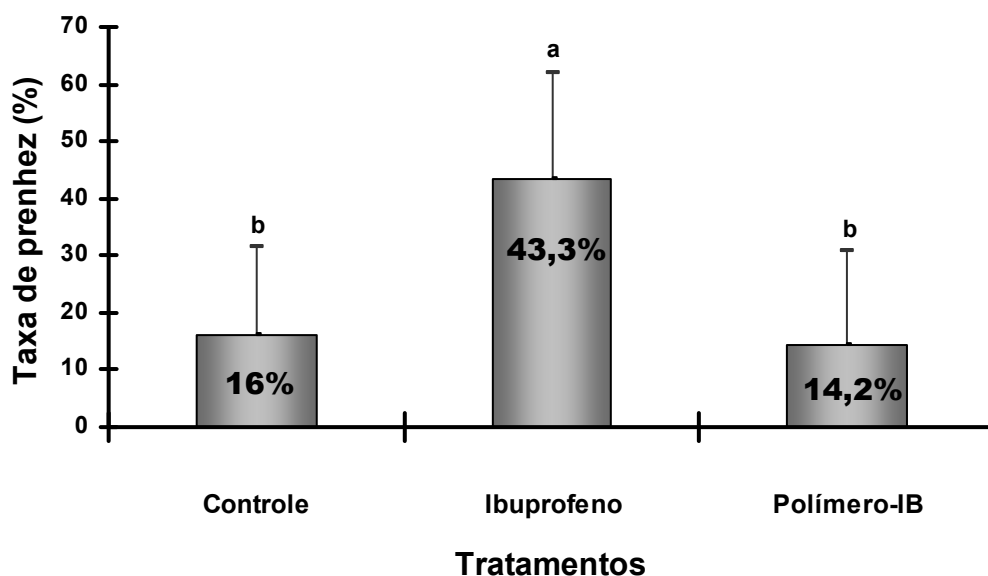


Figura 9- Taxa de prenhez de receptoras da raça Nelore conforme o grupo experimental.

Para avaliar o efeito do diâmetro do CL sobre as taxas de prenhez, as estruturas foram classificadas em 5 categorias: 13-15, 15-17, 17-19, 19-21 e >21 mm de diâmetro. Na categoria de 13-15 mm de diâmetro, foi observado maior efeito do CL nas taxas de prenhez para as novilhas 42,8%, em relação às vacas 15,3%.

Na categoria de 15-17 mm de diâmetro observaram-se melhores taxas de prenhez para as vacas (38,4%) quando comparadas às novilhas (15,3%).

Com relação às categorias 19-21 e >21 mm de diâmetro, somente foi observado efeito do CL na taxa de prenhez das vacas (Figura 10).

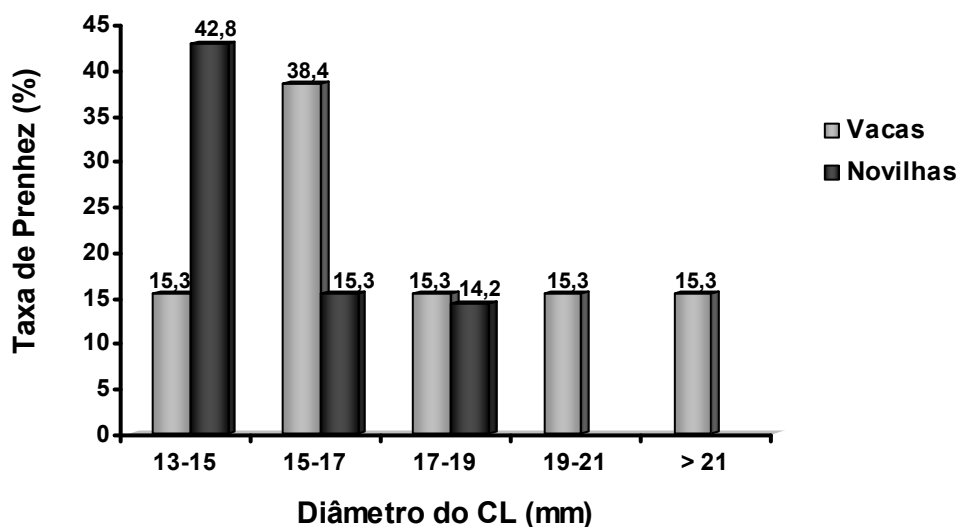


Figura 10- Efeito do diâmetro do CL sobre as taxas de prenhez, independente do grupo experimental.

4.3 Qualidade dos embriões

Dos 76 embriões inovulados, 14 não foram considerados, pois a palheta não continha a informação correspondente à qualidade do embrião. Portanto, foram inovulados um total de 36 embriões grau I (58%), 18 embriões grau II (29 %) e 8 embriões grau III (13%).

As porcentagens de prenhez para os embriões grau I do grupo controle, Ibuprofeno-IM e polímero-IB foram de $9,09 \pm 0,90$, $40 \pm 1,30$ e $20 \pm 1,33$ e para os embriões grau II foram de $20 \pm 2,00$, $62,5 \pm 1,82$ e 0, respectivamente (Tabela 5).

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) em relação às taxas de prenhez dos embriões grau I do grupo Ibuprofeno-IM quando comparadas aos grupos controle e polímero-IB, da mesma forma a tendência anterior se manteve nas taxas de prenhez dos 3 grupos experimentais para os embriões classificados como grau II.

Tabela 5- Efeito da qualidade do embrião (média \pm E.P.M) sobre as taxas de prenhez (%) para cada grupo experimental.

Grupos	Taxa de prenhez (%)			
	Taxa de prenhez total (%)	Qualidade dos embriões		
		Embriões grau I n/n	Embriões grau II n/n	Embriões grau III n/n
Controle	16	9,09 \pm 0,90 ^b (1/11)	20 \pm 2,00 ^b (1/5)	0 ^a (0/2)
Ibuprofeno-IM	43,3	40 \pm 1,30 ^a (6/15)	62,50 \pm 1,82 ^a (5/8)	0 ^a (0/3)
Polímero-IB	14,2	20 \pm 1,33 ^b (2/10)	0 ^b (0/5)	0 ^a (0/3)

IB = Ibuprofeno; IM = intramuscular.

^{a,b}Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

4.4 Grau de manipulação do trato reprodutivo

Das receptoras avaliadas quanto ao grau de manipulação do trato reprodutivo, um total de 21 manipulações grau 1 (27%), 26 manipulações grau 2 (35%) e 29 manipulações grau 3 (35%) foi registrado. Com relação ao efeito da manipulação grau 1 sobre as taxas de prenhez dos grupos controle, Ibuprofeno-IM e polímero-IB os resultados foram 0, 33,33 \pm 1,66 e 25 \pm 2,50, respectivamente, para grau 2 de manipulação os resultados foram 33,33 \pm 1,66, 30 \pm 1,52 e 28,57 \pm 1,84 e para grau 3 foi de 12,50 \pm 1,25, 63,63 \pm 1,52 e 0, respectivamente. De acordo com a análise dos dados, houve diferença significativa (P<0,05) nas taxas de prenhez entre os grupos para os graus 1 e 3 de manipulação do trato reprodutivo como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6- Efeito do grau de manipulação do trato reprodutivo (média \pm E.P.M) sobre as taxas de prenhez (%) para cada grupo experimental.

Grupos	N	Taxa de prenhez (%)		
		Grau de manipulação do trato reprodutivo		
		1 (n)	2 (n)	3 (n)
Controle	25	0 ^b (8)	33,33 \pm 1,66 ^a (9)	12,50 \pm 1,25 ^b (8)
Ibuprofeno-IM	30	33,33 \pm 1,66 ^a (9)	30 \pm 1,52 ^a (10)	63,63 \pm 1,52 ^a (11)
Polímero de IB	21	25 \pm 2,50 ^a (4)	28,57 \pm 1,84 ^a (7)	0 ^b (10)

T.P = taxa de prenhez; IB = Ibuprofeno; IM = intramuscular.

^{a,b}Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

1 = manipulação mínima do trato reprodutivo.

2 = manipulação moderada do trato reprodutivo.

3 = manipulação excessiva do trato reprodutivo.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo forneceram evidências que a sincronização do estro e da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona associado ao benzoato de estradiol e PGF₂ α em fêmeas da raça Nelore proporcionou alta taxa da ovulação (90% e 83,3%, vacas e novilhas, respectivamente) determinada por ultra-sonografia através da formação de CL. Estes resultados são consistentes aos observados por Barros et al. (2000), que reportaram 85% de taxa da ovulação em vacas da raça Nelore.

Com relação ao diâmetro do CL, 80% das vacas e das novilhas utilizadas no trabalho apresentaram CL1 (estruturas de tamanho grande), o que discorda com o estudo apresentado por Demczuk et al. (1998), no qual observaram maior incidência de CL de tamanho médio (51,6%), em relação a CL de tamanho grande e pequeno, 29,1% e 19,2%, respectivamente. No entanto, Coleman et al. (1987) e Spell et al. (2001) observaram maior proporção na formação de CL de tamanho grande em receptoras de embriões, resultados que concorda com os achados deste estudo.

Das fêmeas utilizadas no trabalho, 78,5% das vacas e 70% das novilhas, foram selecionadas para receber embrião, demonstrando estatisticamente ($P < 0,05$) maior taxa de aproveitamento das vacas em relação às novilhas, devido à menor taxa de ovulação das novilhas, quando comparadas às vacas, provavelmente a uma alteração na dinâmica folicular ou hormonal das novilhas. Esses resultados foram semelhantes aos observados por Looney et al. (2006), no qual acharam 94% de taxa de aproveitamento das vacas em relação às novilhas (73%).

A maior ocorrência de CL no ovário direito (63,4% e 72%, vacas e novilhas, respectivamente) em relação ao ovário esquerdo (36,5% e 28%) encontrado nesse trabalho, concorda com as descrições realizadas por Coleman et al. (1987), Viana et al. (1999) e Spell et al. (2001), os quais observaram 55%, 57,14% e 60% de CL para o ovário direito e 45%, 42,86% e 40% para ovário esquerdo, respectivamente.

Considerando-se o efeito do diâmetro do CL sobre as taxas de prenhez, os achados desse estudo indicaram melhores porcentagens de prenhez para CL entre 13 a 15 mm de diâmetro para as novilhas e 15 a 17 mm para as vacas. Esses diâmetros foram inferiores aos descritos por Spell et al. (2001), que observaram melhores taxas de prenhez para CL com 24,1 mm de diâmetro.

Desta forma, é possível mencionar que altas porcentagens de gestação em programas de TE nem sempre estão relacionadas à CL de tamanhos grandes (Coleman et al., 1987 e Spell et al., 2001), devido à alta variação que existe em relação ao diâmetro do CL e seu efeito nas taxas de prenhez.

Nasser et al. (2004), no entanto, observaram uma situação diferente em novilhas mestiças como receptoras de embriões. Seus achados demonstraram melhores taxas de prenhez para CL maior que 20 mm de diâmetro.

Com relação às taxas de prenhez do presente trabalho, as receptoras do grupo Ibuprofeno-IM apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) em relação às receptoras dos grupos controle e polímero-IB, provavelmente, a inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pela ação do Ibuprofeno e a minimização dos efeitos deletérios desta no desenvolvimento embrionário, proporcionando assim, maior viabilidade ao embrião no mecanismo de implantação. Portanto, observou-se uma melhoria nas porcentagens de gestação do grupo Ibuprofeno-IM em relação aos grupos controle e polímero-IB de 27,3% e 29,1%, respectivamente. Importante salientar que, neste trabalho não foram quantificados os metabolitos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ antes ou depois da inovulação dos embriões, o que poderia restringir a discussão dos dados, no entanto, baseado nos estudos realizados que demonstraram metabolitos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ antes e depois da inovulação dos embriões (Scenna et al., 2005) e a evidência das propriedades farmacológicas do Ibuprofeno em inibir a síntese das prostaglandinas (Elli et al., 2001) é possível levar em consideração estas abordagens no entendimento dos resultados do presente estudo.

Corroborando com os resultados deste trabalho, Elli et al. (2001) avaliaram o efeito do Ibuprofeno (5 mg/kg de peso vivo, i.m.) uma hora antes da inovulação

dos embriões, em novilhas da raça Holandesa utilizadas como receptoras. Os embriões inovulados eram oriundos de programas de TE convencional e criopreservados. A taxa de prenhez do grupo tratado com Ibuprofeno apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) significativa quando comparado com o grupo controle (82% vs 56%, respectivamente), demonstrando o efeito do Ibuprofeno na melhora das taxas de prenhez em bovinos.

Contudo, acredita-se que a utilização do Ibuprofeno com a finalidade de melhorar as taxas de prenhez em programas de TE em bovinos, é com a aplicação do medicamento no mínimo 30 minutos antes da inovulação dos embriões, considerando o tempo de absorção e a estabilização dos níveis sanguíneos requeridos. No entanto, a utilização deste tipo de tratamento farmacológico apresenta uma desvantagem em relação ao manejo das receptoras devido ao fato de que os animais têm que sofrer mais um manejo para que seja administrado o Ibuprofeno.

Purcell et al. (2005) empregaram FM de 2 a 12 minutos antes da inovulação dos embriões (a fresco e congelados) em vacas e novilhas da raça Angus. Os resultados do estudo apresentaram melhor taxa de prenhez ($P < 0,05$) do grupo tratado com FM (63,8%) em relação ao grupo controle (51,5%).

Da mesma forma, Scenna et al. (2005) corroboraram com o efeito ($P < 0,05$) do FM no acréscimo das taxas de prenhez em vacas e novilhas utilizadas como receptoras de embriões a fresco ou congelado. Essas observações concordaram em parte, com os resultados do presente estudo, de que o tratamento com antiinflamatórios não seletivos antes da inovulação dos embriões melhora as taxas de prenhez em programas de TE convencional.

Entretanto, os resultados do presente trabalho diferem dos obtidos por McNaughtan (2004), que não encontrou efeito significativo na aplicação do FM antes da inovulação dos embriões, em novilhas Hereford x Angus. Embora, o presente estudo tenha utilizado o Ibuprofeno como antiinflamatório.

Em relação às taxas de prenhez do grupo polímero-IB, acredita-se que o baixo resultado foi possivelmente, ao modelo de aplicação do Ibuprofeno, que permite níveis plasmáticos do medicamento por longos períodos de tempo, porém, inibe qualquer atividade das prostaglandinas, influenciando provavelmente importantes eventos nos primeiros estádios da gestação como a vascularização endometrial, eclosão do blastocisto, mecanismo de implantação embrionária (Sayre

e Lewis, 1993) e funcionalidade do CL (Xiao et al., 1998). Segundo, Sayre e Lewis. (1993) e Elli et al. (2001), estes importantes eventos da reprodução são dependentes das prostaglandinas e foram também observados em varias espécies de mamíferos, incluindo humanos e primatas.

Estudos demonstraram o efeito de altas dosagens de antiinflamatórios não seletivos via intra-uterina em ratos, evidenciando falhas no processo de implantação embrionária (Gupta et al., 1981). O mesmo resultado foi observado em primatas (*Macacos Rhesus*) com a administração de altas concentrações de Diclofenaco entre o 16° a 18° dia do ciclo estral, observando uma diminuição considerável no mecanismo de implantação (Nayak et al., 1997).

Portanto, diante do contexto apresentado, sugere-se a importância de manter a atividade das prostaglandinas nos primeiros estágios da gestação e de evitar a administração de antiinflamatórios por longos períodos de tempo após a inovulação dos embriões e até o mecanismo de implantação embrionária.

Considerando o efeito da qualidade do embrião na otimização dos índices reprodutivos em programas de TE, o grupo Ibuprofeno-IM apresentou melhoria nas taxas de prenhez ($P < 0,05$), quando comparado com os grupos controle e polímero-IB (40%, 9,09% e 20%, respectivamente) para embriões de qualidade I e 62,5%, 20% e 0% para embriões de qualidade II.

Por tal motivo é possível considerar a utilização do Ibuprofeno por via intramuscular para incrementar as taxas de prenhez de embriões grau I e II.

Estes resultados são semelhantes aos descritos por Scenna et al. (2005), que relataram melhores taxas de prenhez ($P < 0,05$) para embriões grau II do grupo tratado com FM (64,2%) em relação ao grupo controle (53,5%) mas, não observaram aumento nas taxas de prenhez dos embriões grau I para ambos os grupos.

Considerando a literatura consultada nas taxas de prenhez de embriões grau I e II, Coleman et al. (1987), Hasler. (2001), Looney et al. (2006), Bényei et al. (2006) e Chebel et al. (2008) observaram elevadas taxas de prenhez ($P < 0,05$) para embriões grau I em relação a embriões grau II. Em contraste, Spell et al. (2001) não relataram diferenças ($P > 0,05$) nas taxas de prenhez para os embriões das mesmas qualidades.

Em relação ao efeito do grau de manipulação do trato reprodutivo sobre as taxas de prenhez. O grau 3 de manipulação do grupo Ibuprofeno-IM apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) ao ser comparado com os grupos controle e

polímero-IB (63,63%, 12,5% e 0%, respectivamente), devido a este grupo ter recebido por coincidência um número maior de embriões de melhor qualidade, situação que refletiu na taxa de prenhez desta observação.

No entanto, a avaliação deste parâmetro em programas de TE poderia ser de grande importância devido ao fato que maior manipulação do trato reprodutivo por uma transposição difícil do aplicador pela cérvix, provavelmente, ocasione um trauma no trato reprodutivo desencadeando um processo inflamatório local que leva a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no lume uterino prejudicando a viabilidade embrionária (Odensvik et al., 1993, Elli et al., 2001, e Scenna et al., 2005).

Segundo, Scenna et al. (2005), a $\text{PGF}_{2\alpha}$ ao entrar em contato com o embrião, retarda ou bloqueia o desenvolvimento deste, diminuindo a habilidade de transição de estrutura pré-compacta a compacta (16 para 32 células) (Scenna et al., 2004), afetando de forma significativa a sobrevivência do embrião, diminuindo as taxas de prenhez.

Weaver et al. (1986), Coleman et al. (1987) e Looney et al. (2006) relataram que a experiência do operador durante a inóculo dos embriões é determinante para ocasionar ou não um trauma no trato reprodutivo, sendo altamente significativo no sucesso dos programas de TE em bovinos.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- A sincronização do estro e da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR[®]) associado ao benzoato de estradiol e PGF_{2α}, proporcionou altas taxas da ovulação determinado através da formação de CL;
- As melhores taxas de prenhez dos dois tipos de receptoras utilizadas no trabalho foram apresentadas com CL entre 13 a 17 mm de diâmetro;
- A administração do Ibuprofeno por via intramuscular, uma hora antes da inovulação dos embriões, melhorou as taxas de prenhez das receptoras tratadas;
- A aplicação do Ibuprofeno através de um dispositivo de liberação controlada, não proporcionou efeito no acréscimo das taxas de prenhez;
- O Ibuprofeno administrado por via intramuscular teve efeito significativo no aumento das taxas de prenhez dos embriões grau I e II de qualidade;
- As receptoras do grupo Ibuprofeno-IM cujo grau de manipulação do trato reprodutivo foi classificado como grau 3 apresentaram melhor taxa de prenhez, ao contrario do esperado, devido a ter recebido um maior número de embriões de excelente qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKÉ-LÓPEZ, J.R. (2000) *Efecto del flunixin meglumine en el ciclo estral y la fertilidad de ovejas pelibuey bajo condiciones de trópico*. Tesis de doctorado – México, PosGrado Interinstitucional en ciencias pecuarias, Universidad de Colima, 122p.
- ASSELIN, E.; DROLET, D.; FORTIER, M.A. (1998) In vitro response to oxytocin and interferon-tau in bovine endometrial cells from caruncular and inter-caruncular areas. *Biol Reprod.*, 59:241-247.
- AZEVEDO, M.M.M. (2005) *Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, conseqüências e perspectivas*. Tese de Doutorado – Campinas-SP, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 177p.
- BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M. (2002) Long-circulating sterically stabilized liposomes as carriers of agents for treatment of infection or for imaging infectious foci. *Int J Antimicrob Agents.*, 19:299-311.
- BARROS, C.M.; MOREIRA, M.B.P.; FIGUEIREDO, R.A.; TEIXEIRA, A.B.; TRINCA, L.A. (2000) Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2 α and estradiol benzoate. *Theriogenology.*, 53:1121-1134.
- BENOIT, M.A. (1997) Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-co-glycolide as a controlled release delivery system for the treatment of bone infections. *International Orthopaedics.*, 21 (6):403-408.

- BÉNYEI, B.; KOMLÓSI, I.; PÉCSI, A.; POLLOTT, G.; MARCOS, C.H.; CAMPOS, A.O.; LEMES, M.P. (2006) The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment. *Animal Reproduction Science.*, 93:268-279.
- BINELLI, M.; THATCHER, W.W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P.S. (2001) Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology.*, 56:1451-1463.
- BINELLI, M.; IBIAPINA, B.T.; BISINOTTO, R.S. (2006) Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. *Acta Scientiae Veterinariae.*, 34 (1):1-7.
- BLEACH, E. C. L.; GLENCROSS, R. G.; FEIST, S. A.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. (2001) Plasma inhibin in heifers: relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biol. Reprod.*, 64:743-752.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; TRIBULO, H.E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. (1994) Follicular wave dynamics after estradiol-17 treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology.*, 41:1555-1569.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. (1995) Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science.*, 39:193-204.
- BÓ, G.A.; PICINATO, D.; PERES, L.; CUTAIA, L.; NASSER, L.F.; BARUSELLI, P.S. (2006) Protocolos de transferência de embriões em tempo fixo para receptoras de embriões bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae.*, 34:17-23.
- CACCIA, M.; BÓ, G.A. (1998) Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beefcows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology.*, 49:341.
- CANINO, C.J.; REED, J.; SHEMESH, M.; CHANG, S.M.T.; MARINO, V.K.; HIERS, E.A.; BINTA, H.; LUCE, B.R.; THATCHER, W.W.; FIELDS, M.J. (1999) Induction of prostaglandin synthesis via LH/hCG-mediated receptors in the bovine uterus. *Biology of Reproduction.*, 60 (1):262.
- CARVALHO, W.A.; CARVALHO, R.D.S.; RIOS-SANTOS, F. (2004) Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia.*, 54 (3):448-464.

- CAVALIERI, J.; COLEMAN, C.; RODRIGUES, H.; MACMILLAN, K.L. (2002) The effect of timing of administration of oestradiol benzoate on characteristics of oestrus, timing of ovulation and fertility in *Bos indicus* heifers synchronized with a progesterone releasing intravaginal insert. *Australian Veterinary Journal.*, 80:217-223.
- CERONI FILHO, A.S. (2004) *Obtenção, caracterização e estudo In vitro de microesferas de PLLA e da blenda PLLA/PEO para liberação controlada do cloridrato de vancomicina*. Tese de Mestrado, Campinas-SP, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, 116p.
- CHEBEL, R.C.; DEMÉTRIO, D.G.B.; METZGER, J. (2008) Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology.*, 69:98-106.
- CLARK, J.D.; LIN, L.L.; KRIZ, R.W.; RAMESHA, C.S.; SULTZMAN, L.A.; LIN, A.Y.; MILONA, J.L. (1991) A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contain a Ca (2+)- dependent translocation domain with o homology to PKC and GAP. *Cell.*, 65:1043-1051.
- COOPER, D.A.; CARVER, D.A.; VILLENEUVE, P.; SILVA, W.J.; INSKEEP, E.K. (1991) Effects of progesterone treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. *J Reprod Fertil.*, 91:411-421.
- COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. (2003) Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology.*, 60:855-865.
- COLEMAN, D.A.; DAILEY, R.A.; LEFFEL, R.E.; BAKER, R.D. (1987) Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. *J Dairy Sci.*, 70:858-866.
- CREMINON, C.; HABIB, A.; MACLOUF, J.; PRADELLES, P.; GRASSI, J.; FROBERT, Y. (1995) Differential measurement of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase expression in human umbilical vein endothelial cells using specific immunometric enzyme immunoassays. *Biochim Biophys Acta.*, 1254:341-348.
- CHRISTIANSEN, L.G. (1991) Use of embryo transfer in future cattle breendin schemes. *Theriogenology.*, 35 (1):141-149.
- CRUZ, O.L. (2005) *Diseño, síntesis y evaluación biológica de n-fenilindoles como inhidores selectivos de la ciclooxygenasa 2*. Tesis Doctoral – Granada, España, Departamento de Química Farmaceutica y Orgánica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

- DANNHARDT, G.; KIEFER, W. (2001) Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospect. *Eur J Med Chem.*, 36:109-126.
- DEGRAVES, F.J.; ANDERSON, K.L.; AUCOIN, DP. (1993a) Pharmacokinetics of ibuprofen in lactating dairy cows. *Am J Vet Res.*, 54 (7):1133-1135.
- DEGRAVES, F.J.; ANDERSON, K.L.; AUCOIN, DP. (1993b) Pharmacokinetics of ibuprofen in lactating dairy goats. *Am J Vet Res.*, 54 (3):434-437.
- DEMCZUCK, E.; KOZICKI, L.E.; PONTELLI, E.S.; SALLES, J.O. (1998) Transferência de embrião em vacas da raça Simental na região noroeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.*, 35 (4):174-177.
- DEMMERS, K.J.; DERECKA, K.; FLINT, A. (2001) Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction.*, 121:41-49.
- DIAZ, A.; REGINATO, A.M.; JIMENEZ, S.A. (1992) Alternative splicing of human prostaglandin G/H synthase mRNA and evidence of differential regulation of the resulting transcripts by transforming growth factor b, interleukin 1b and tumor necrosis factor a. *J Biol Chem.*, 267:10816-10822.
- DRIANCOURT, M.A.; FRY, R.C. (1988) Differentiation of ovulatory follicles in sheep. *Journal Animal Science.*, 66:9-20.
- DUNNE, L.D.; DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. (2000) Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Animal Reproduction Science.*, 58 (1):39-44.
- ELLI, M.; GAFFURI, B.; FRIGERIO, A.; ZANARDELLI, M.; COVINI, D.; CANDIANI, M.; VIGNALI, M. (2001) Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. *Journal of Reproduction and Fertility.*, 121:151-54.
- FERNANDES, C.A.C; OBA, B. (2007) Avaliação econômica da bipartição em programas de transferência de embriões em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae.*, 35 (3):881-888.
- FORTUNE, J.E; SIROIS, J; TURZILLO A.M. (2001) Follicle selection in domestic ruminants. *Journal of Reproduction Fertility.*, 43:187-1981.
- FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M.; YANG, M.G. (2004) Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science.*, 82-83:109-126.

- FLOWER, R.J. (2003) The development of COX-2 inhibitors. *Nature Reviews. Drug Discovery.*, 2:179-191.
- FUNK, C.D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.*, 294:1871-1875.
- GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. (1989) Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycle with two or three follicular waves. *Journal of Reproduction fertility.*, 87:223-230.
- GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULIC, L.J. (1997) Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology.*, 48:75-87.
- GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. (2003) Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci.*, 78:239-257.
- GUPTA, U.; MALHOTRA, N.; VARMA, S.K.; CHAUDHURY, R.R. (1981) Effect of intrauterine administration of antiprostaglandin drugs on implantation in the rat. *Contraception*, v.24, p.283-288, (Abstract).
- GUZELOGLU, A.; ERDEM, H. (2007) 161 effect of meloxicam treatment on pregnancy rates in Holstein heifers. *Reprod, Ferti and Devel.*, 19 (1):197-198. (Abstract).
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. (2004) *Reprodução Animal*. 7ª edição. São Paulo. Editora Manole.
- HALL, V.R.; MURILLO, N.P.; ROCHA, M.P.; RODRÍGUEZ, E.V. (2001) *Antiinflamatorios no esteroídais (AINE'S)*. Centro nacional de información de medicamentos, Instituto de de investigaciones farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, Costa Rica. 93p.
- HASLER, J.F. (2001) Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology.*, 56:1401-1415.
- HIRSHFIELD, A.N. (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology.*, 124:43-101.
- HORNSTRA, G. (2001) Influence of dietary fat type on arterial thrombosis tendency. *J. Nutr. Health Aging.*, 5 (3):160-166, Review.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA;
http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=1053, acesso em 11/12/2007, página mantida pelo IBGE.

JOZIASSE, C.A.P. (1993) *Molecular architecture of biodegradable poly(lactide) alloys and blends*. These. Materials science centre, University of Groningen.

KINDER, J.E.; KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G.M.; WEHRMAN, M.E.; FIKE, K.E. (1996) Progesterin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *Animal Reproduction Science.*, 74:1424-1440.

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.R.B. (2002) Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. *Revista Brasileira de Anestesiologia.*, 52 (4):498-512.

KOPCHA, M.; KANEENE, J.B.; SHEA, M.E.; MILLER, R.A.; AHL, A.S. (1992) Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in food animal practice. *Journal of American Veterinary Medical Association.*, 201:1868-1872.

LABERNIA, J; LÓPES-GATIUS, F; SANTOLARIA, P; LÓPES-BÉJAR, M; RUTLLANT, J. (1996) Influence of management factors on pregnancy attrition in dairy cattle. *Theriogenology.*, 45 (6):1247-1253.

LOONEY, C.R.; NELSON, J.S.; SCHNEIDER, H.J.; FORREST, D.W. (2006) Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology.*, 65:201-209.

MACMILLAN, K.L.; TAUFU, V.K.; BARNES, D.R.; DAY, A.M. (1991) Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. *Animal of Reproduction Science.*, 26:25-40.

MACMILLAN, K.L.; BURKE, C.R. (1996) Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science.*, 42:307-320.

MCNAUGHTAN, J.W. (2004) The effect of prostaglandin inhibitor on pregnancy rates of heifer embryo transfer recipients. MSc Thesis, Brigham Young University, U.S.A., 38p.

MANN, G.E.; LAMING, G.E. (1999) The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reproduction of Domestic Animals.*, 34:269-274.

MATTOS, R.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. (2000) Effects of dietary fatty acids on reproduction ruminants. *Reviews Reproduction.*, 5:38-45.

- MARTEL,C.(1998) Recombinant androgenic component in the stimulatory effect of dehydroepiandrosterone on bone mineral density in rat. *Journal of Endocrinology.*, 157 (3):433-442.
- NASSER, L.F.; REIS, E.L.; OLIVEIRA, M.A.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. (2004) Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus* x *Bos taurus* recipients. *Theriogenology.*, 62:1577-1584.
- NAYAK, N.R.; GHOSH, D.; LASLEY, B.L.; SENGUPTA, J. (1997) Anti-implantation activity of luteal phase mifepristone administration is not mimicked by prostaglandin synthesis inhibitor or prostaglandin analogue in the rhesus monkey. *Contraception.*, 55:103-114.
- NEGREIROS, G.O.; RESENDE FILHO, O.; BEZERRA, E.E.A., MINEIRO, AL.B.B., SILVA, J.M.; VIEIRA, R.J. (2007) Influência do flunixin meglumine na taxa de prenhez em vacas leiteiras submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo. *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal.*, 17119.
- NEWA, M.; BHANDARI, K.H.; LI, D.X.; KWON, T.H.; KIM, J.A.; YOO, B.K.; WOO, J.S.; LYOO, W.S.; YONG, C.S.; CHOI, H.G. (2007) Preparation, characterization and in vivo evaluation of ibuprofen binary solid dispersions with poloxamer 188. *International Journal of Pharmaceutics.*, 343:228-237.
- ODENSVIK, K., CORT, N.; BASU, S., KINDAHL, H. (1989) Effect of flunixin meglumine on prostaglandin F₂ α synthesis and metabolism in the pig. *Journal of Veterinary Pharmacol.*, 12307-311.
- ODENSVIK, K.; DUCHENS, M.; GUSTAFSSON, H. (1993) Does mechanical manipulation of the reproductive organs cause a prostaglandin release in the heifer during embryo transfer? *Acta Vet Scand.*, 34:219-221.
- ODENSVIK, K.; GUSTAFSSON, H.; KINDAHL, H. (1998) The effect on luteolysis by intensive oral administration of flunixin meglumine in heifers. *Animal Reproduction Science.*, 50:35-44.
- OH, K.T.; BRONICH T.K.; KABANOV, A.V. (2004) Micellar formulations for drug based on mixtures of hydrophobic and hydrophilic Pluronic® block copolymers. *J Control Release.*, 94:411-422.
- OLIVEIRA, F.M. Antiinflamatórios não hormonais (AINHs): utilização clínica e seus desafios na prática médica; http://home.furb.br/jemoura/William%20Chahade_Comandatuba.ppt, acesso em 09/2007, página mantida pelo Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo.
- PACE-ASCIAC, C.R. (1980) Development aspects of the prostaglandin biosynthetic and catabolic systems. *Semin Perinatol.*, 4:15-21.

- PETERSON, A.J.; LEE, R.S-F. (2003) Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology.*, 59:687-687.
- PICAZO, A.R.; LÓPEZ, S.A. (1995) Desarrollo folicular en el ovario de la especie ovina. *Producción y Sanidad Animal.*, 10:77- 93.
- PURCELL, S.H.; BEAL, W.E.; GRAY, K.R. (2005) Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine, administered at the time of embryo transfer, on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. *Theriogenology.*, 64:867-878.
- RADI, Z.A.; KHAN, N.K. (2006) Effects of cyclooxygenase inhibition on the gastrointestinal tract. *Experimental and Toxicologic Pathology.*, 58:163-173.
- RATHBONE, M.J., KINDER, J.E., FIKE, K., KOJIMA, F., CLOPTON, D., OGLE, C.R., BUNT, C.R. (2001) Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, 50:277-320.
- RIBADU, A.Y.; WARD, W.R.; DOBSON, H. (1994) Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. *Veterinary Record.*, 135:452-457.
- RICHARDS, M.W.; SPITZER, J.C.; WARNER, M.B. (1986) Effect of varying levels postpartum nutrition body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *Journal of Animal Science.*, 62:301-306.
- SALFEN, B.E., CRESWELL, J.R.; XU, Z.Z.; BAO, B.; GARVERICK, H.A. (1999) Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous estradiol on the duration of luteal phase of the bovine estrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility.*, 115 (1):15-21.
- SANGHA, G.K.; SHARMA, R.K.; GURAYA, S.S. (2002) Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Ruminant Research.*, 42:53-64.
- SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C.; CERRI, R.L.A.; GALVÃO, K.N. (2004) The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science.*, 82-83:513-535.
- SARTORI, R. (2004) Fertilização e morte embrionária em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae.*, 32:35-50.

SAS Institute Inc (1996) *SAS user's guide: statistic*, version 6.08 Cary, N.C.

SAYRE, B.L.; LEWIS, G.S. (1993) Arachidonic acid metabolism during early development of ovine embryos: a possible relationship to shedding of the zona pellucida. *Prostaglandins.*, 45:557-569.

SCENNA, F.N., EDWARDS J.L., ROHRBACH, N.R., HOCKETT, M.E., SAXTON, A.M., SCHRICK, F.N. (2004) Detrimental effects of prostaglandin F₂ α on preimplantation bovine embryos. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators.*, 73:215-226.

SCENNA, F.N.; HOCKETT, M.E.; TOWNS, T.M.; SAXTON, A.M.; ROHRBACH, N.R.; WEHRMAN, M.E.; SCHRICK, F.N. (2005) Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. *Prostaglandins and other Lipid Mediators.*, 78:38-45.

SCHMOLKA, I.R. (1972) Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J Biomed Mater Res.*, 6:571-582.

SCHRICK, F.N.; INSKEEP, E.K.; BUTCHER, R.L. (1993) Pregnancy rates for embryos transferred from early postpartum beef cows into recipients with normal estrous cycle. *Biol Reprod.*, 49: 617-621.

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

SEALS, R.C.; LEMASTER, J.W.; HOPKINS, F.M.; SCHRICK, F.N. (1998). Effects of elevated concentrations of prostaglandin F₂ α on pregnancy rates in progestogen supplemented cattle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 56:377-389.

SILVIA, J.; LEWIS, G.S., McCracken, J.A.; THATCHER, W.W., WILSON, Jr.L. (1991) Hormonal regulation of uterine secretion of PGF₂ α during luteolysis in ruminants. *Biology of Reproduction.*, 45:655-663.

SIROIS, J. (1994) Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles *in vivo*. *Endocrinology.*, 135:841-848.

SMITH, W.L.; MARNETT, L.J.; DE WITT, D.L. (1991) Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther.*, 49:153-179.

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

- SPENCER, T.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; BURGHARDT, R.C. (2004) Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction.*, 128:657-668.
- SPRECHER, D.J.; NEBEL, R.L.; WHITMAN, S.S. (1989) The predictive value, sensitivity and specificity of palpation per rectum and transrectal ultrasonography for the determination of bovine luteal status. *Theriogenology.*, 31:1165-1172.
- STAPLES, C.R.; BURKE, J.M.; THATCHER, W.W. (1998) Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J Dairy Sci.*, 81:856-871.
- STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (1999) *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. 3ª edição. U.S.A.
- TAKAHASHI, M.; TAKAHASHI, H.; HAMANO, S.; WATANABE, S.; INUMARO, S.; GESHI, M.; OKUDA, K.; YOKOMIZO, Y.; OKANO, A. (2003) Possible role of interferon-t on in vitro development of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development.*, 49:297-305.
- VANROOSE, G.; de KRUIF, A.; Van SOOM, A. (2000) Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Animal Reproduction Science.*, 60-61:131-143.
- VEYRIES, M.L.; COUARRAZE, G.; GEIGER, S.; AGNELY, F.; MASSIAS, L.; KUNZLI, B.; FAURISSON, F.; ROUVEIX, B. (1999) Controlled release of vancomycin from Poloxamer 407 gels. *Int J Pharm.*, 192:183-193.
- VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A. (1999) Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, 51 (3).
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. (2007) A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. *Acta Scientiae Veterinariae.*, 35:915-924.
- WATHES, D.C.; ABAYASEKARA, D.R.; AITKEN, R.J. (2007) Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology of Reproduction.*, 77:190-210.
- WEAVER, L.D.; GALLAND, J.; SOSNIK, U.; COWEN, P. (1986) Factors affecting embryo transfer success in recipient heifers under field conditions. *J Dairy Sci.*, 69:2711-2717.
- WILTBANK, M.C. (1997) How information of hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. *Theriogenology.*, 37:83-97.

- WINZENBURG, G.; SCHMIDT, C.; FUCHS, S.; KISSEL, T. (2004) Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, 56:1453-1466.
- XIAO, C.; LIU, W.J.; SIROIS, J.; GOFF, A.K. (1998) Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon- γ in bovine epithelial cells. *Endocrinology.*, 139:2293-2299.
- XIE, W.; ROBERTSON, D.L.; SIMMONS, D.L. (1992) Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a new target for nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Drug Delivery Reviews.*, 25:249-265.