HELDER ESTEVES THOMÉ

Resposta inflamatória uterina em bovinos após inseminação artificial com sêmen avaliado por associações de sondas fluorescentes: efeitos sobre a fertilidade

São Paulo

2013

HELDER ESTEVES THOMÉ

Resposta inflamatória uterina em bovinos após inseminação artificial com sêmen avaliado por associações de sondas fluorescentes: efeitos sobre a fertilidade

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

Departamento:
Reprodução Animal

Área de Concentração:
Reprodução Animal

Orientadora:
Profª Drª Eneiva Carla Carvalho Celeghini

De acordo:_____
Orientador(a)

São Paulo

2013

Versão corrigida

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

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2812
FMVZ

Thomé, Helder Esteves
Resposta inflamatória uterina em bovinos após inseminação artificial com sêmen avaliado por associações de sondas fluorescentes: efeitos sobre a fertilidade / Helder Esteves Thomé. -- 2013.
113 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini.

1. Endometrite. 2. Espermatozoides. 3. Taxa de fertilidade. 4. Citologia endometrial. 5. Lavagem uterina. 6. Hemodinâmica uterina. I. Título.

CERTIFICADO DE BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Resposta inflamatória uterina em bovinos após inseminação artificial com sêmen avaliado por sondas fluorescentes: efeitos sobre a fertilidade", protocolado sob o nº 2083/2010, utilizando 380 (trezentos e oitenta) bovinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 08/12/2010.

We certify that the Research "Uterine inflammatory response in cattle after artificial insemination with semen evaluated by fluorescent probes: effects on fertility", protocol number 2083/2010, utilizing 380 (three hundred and eighty) cattle, under the responsibility Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/08/2010.

São Paulo, 09 de dezembro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

1934 | 2009 USP 75 FMVZ

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: THOMÉ, Helder Esteves

Título: Resposta inflamatória uterina em bovinos após inseminação artificial com sêmen avaliado por associações de sondas fluorescentes: efeitos sobre a fertilidade.

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

Data: 05/07/2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra_____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Profa. Dra_____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Profa. Dra_____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Profa. Dra_____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Profa. Dra_____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho a Deus, a meus Pais, a minha Esposa, a meus Familiares, a meus Amigos e a meus Professores e Mestres que direta e indiretamente participaram de minha educação, orientaram e incentivaram-me ao longo destes anos de vida e formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Agradeço primeiramente por me dar a vida, por me presentear com dias maravilhosos, amigos inesquecíveis e oportunidades fantásticas; pelos estudos, pelo discernimento e sabedoria no momento de realizar este projeto, escrever e finalizar.

Aos meus pais Helder e Vera, irmãos Alexandre e Rodrigo, a minha sogra Heloiza, minhas cunhadas Vania e Valdeni, meus cunhados Bisi e Gilberto, e demais familiares,

Que depositaram sua confiança em mim, me guiaram nos momentos difíceis e caminhos tortuosos e acima de tudo, acreditaram na minha capacidade.

À Viviane Aparecida Brochado Delgado Thomé,

Minha admirável esposa que me apoiou incondicionalmente e soube compreender e respeitar os períodos de ausência, dedicação exclusiva a este projeto, a tese, e ao título. Pelo companheirismo e por todo amor dedicado a mim, e agora por presentear-me com a Maria Luiza, uma benção divina em nossas vidas.

À Profª Drª Eneiva Carla Carvalho Celeghini,

Primeiramente pela amizade, pelo exemplo de vida e dedicação ao ensino superior. Agradeço também pela oportunidade de realizar mais este sonho em minha vida, juntamente com sua equipe tão especial, pelas orientações, pela dedicação e acima de tudo pela sua compreensão.

Ao Prof. Dr. Júlio de Carvalho Balieiro

Pelos ensinamentos compartilhados na graduação e pós-graduação, pela incondicional dedicação as análises em meu Mestrado e Doutorado, pelo exemplo de vida e dedicação ao Ensino Superior, pelo seu profissionalismo e acima de tudo pela amizade construída nestes anos. Muito obrigado PROFESSOR.

Ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda,

Por me permitir fazer parte de sua equipe, compartilhar sua ampla experiência e seu vasto conhecimento conosco, por demonstrar dedicação árdua a formação e educação de grandes profissionais.

Ao Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira,

Pelo enorme conhecimento compartilhado, pelo apoio para conseguir os animais do experimento 01 e por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

Por me aceitar como orientado no início do projeto e me permitir ingressar na Pós-graduação.

À Drª Juliana Nascimento Bittar,

Por ter me despertado, em uma simples conversa, o interesse em voltar a me dedicar a minha formação profissional e conquistar o Doutorado; acima de tudo por ter indicado a oportunidade de trabalhar com a grande equipe da Profa Eneiva.

Ao Milton Maturana Filho,

Por todos os ensinamentos compartilhados, pelo companheirismo, pela descontração, por toda dedicação a este projeto, e acima de tudo por esta grande amizade.

À Bruna Marcele Martins de Oliveira,

Pela dedicação incondicional a este trabalho, por todo apoio nos relatórios, projeto e análise dos resultados ultrassonográficos, pela amizade também.

Às Pós-Graduandas Carina Guimarães e Shirley Andrea Florez Rodriguez

Pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, seja ele de caráter prático ou teórico, mas que jamais será esquecido, pela amizade também.

Ao Guilherme Cain de Oliveira,

Pela dedicação e auxílio na execução dos experimentos, e pela amizade.

À Fazenda Fronteira,

Em nome do **Sr. Geraldo Natividade Tarallo e** da **M.V. Fernanda Tarallo Libertini**, por terem aberto suas portas para o desenvolvimento desta pesquisa, nos acolhendo de forma tão calorosa e confortável.

Aos funcionários da Fazenda Fronteira,

Que dedicaram seu tempo pacientemente a execução deste experimento, auxiliaram-nos e

permitiram que nós trabalhássemos com segurança e tranquilidade, e acima de tudo nos acolheram com muito carinho.

Aos amigos pós-graduandos,
Pelos momentos de convívio em disciplinas, cursos, congressos ou eventos, por me darem a oportunidade de aprender juntamente com vocês e acima de tudo, me acolheram com carinho.

À Harumi Doi Shiraishi,
Primeiramente, por toda atenção e disponibilidade em atender os pós-graduandos, por toda educação e orientação, em especial a mim, sempre tão distante.

Aos professores e funcionários do VRA,
Pelo convívio e apoio na execução deste trabalho, pelos conhecimentos compartilhados em disciplinas, eventos e corredores, a todos muito obrigado.

A todos os membros da FMVZ
Que de alguma maneira contribuíram para que esse trabalho fosse realizado. Obrigado pelo acolhimento.

A todos os Docentes Membros da Banca Examinadora
Muito obrigado pela dedicação de seu valioso tempo a este projeto e por sua colaboração na minha formação profissional.

À Faculdade de Jaguariúna - FAJ,
Em nome do Prof. Rogério Cury (Coordenador do Curso de Medicina Veterinária) e todo corpo docente, por toda atenção, compreensão e apoio nos momentos de ausência e dedicação ao Doutorado.

À Fundação de Ensino Octávio Bastos - UNIFEOB,
Em nome da Profa. Ana Flávia de Carvalho (Coordenadora do Curso de Medicina Veterinária) e todo corpo docente, por toda atenção, compreensão e apoio nos momentos de ausência e dedicação ao Doutorado.

Aos amigos Marcos e Cristiano,

Por todo apoio, incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),

Pelo auxílio financeiro processo n. 2009/50365-0.

Muitíssimo obrigado!

RESUMO

THOMÉ, H. E. **Resposta inflamatória uterina em bovinos após inseminação artificial com sêmen avaliado por associações de sondas fluorescentes**: efeitos sobre a fertilidade. [Fertility and uterine inflammatory response in cattle after artificial insemination with semen evaluated by associations of fluorescent probes: effects on the fertility]. 2013. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Do ponto de vista da produtividade, a fertilidade é um dos parâmetros de maior importância em um rebanho bovino comercial e esta é influenciada por vários fatores, entre eles estão as condições do trato reprodutivo das fêmeas e a qualidade do sêmen utilizado. O influxo de células inflamatórias no local da deposição do sêmen logo após a inseminação artificial (IA) pode ser intensificada na presença de maior número de espermatozoides lesados durante a IA, caracterizando uma endometrite. Este estudo foi conduzido em três experimentos. Com o objetivo de comparar os métodos de colheita de material endometrial por escova ginecológica (EU) e lavado uterino (LU), bem como a interferência destes procedimentos na hemodinâmica uterina, foi proposto o Experimento 01, onde pode-se constatar que ambas as técnicas permitem o recolhimento de amostras em quantidade e qualidade suficiente para contagem, e que a porcentagem de células polimorfonucleares obtidas pela técnica LU foi superior a EU. Maior fluxo sanguíneo das artérias uterinas foi encontrado no momento de 4 horas após a realização de LU, sugerindo que este influencia na resposta vascular inflamatória. Para avaliar o efeito da LU após a IA em Tempo Fixo (IATF) na fertilidade dos animais, executou-se o Experimento 02 e constatou-se que não há diferença no índice de prenhez entre os animais submetidos ou não à LU, demonstrando que a técnica não interfere na taxa de fertilidade. Com o intuito de investigar a interferência da qualidade do sêmen na fertilidade, resposta inflamatória e hemodinâmica uterina, foi proposto o Experimento 03, onde foi possível observar influência da qualidade do sêmen sobre a taxa de prenhez, verificou-se maior porcentagem de vacas prenhes quando inseminadas com sêmen com maiores percentuais de espermatozoides apresentando integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial (PIAIC). Notou-se ainda a ocorrência de endometrite em 65,3 % dos animais, os quais apresentaram taxa de prenhez inferior aos que não apresentaram inflamação. Pode-se concluir que a qualidade do sêmen e a endometrite interferem na taxa de fertilidade bovina.

Palavras-chave: Citologia endometrial. Endometrite. Espermatozoides. Hemodinâmica uterina. Lavagem uterina. Taxa de fertilidade.

ABSTRACT

THOMÉ, H. E. **Fertility and uterine inflammatory response in cattle after artificial insemination with semen evaluated by associations of fluorescent probes: effectos on fertility.** [Resposta inflamatória uterina em bovinos após inseminação artificial com sêmen avaliado por associações de sondas fluorescentes: efeitos sobre a fertilidade]. 2013. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

When productivity is taking into account, fertility is one of the most important parameters in a commercial herd. It is influenced by several factors, especially by the conditions of the female reproductive tract and the quality of the semen used. The influx of inflammatory cells at the site of semen deposition after artificial insemination (AI) can be intensified by the deposition of a greater number of dead spermatozoa during AI, which characterized endometritis. This study was conducted in three different experiments. In order to compare the methods of collection of endometrial sampling by swab using a gynecological brush (GB) or uterine flushing (UF), as well as the interference of these procedures in uterine hemodynamics, we designed experiment 01. Our results reveal that both techniques allow collecting samples with good quality and sufficient quantity to be counted; moreover, the average percentage of polymorphonuclear cells obtained by UF was greater compared to those obtained by GB. It may be noted that the increased blood flow was observed in samples collected four hours after the UF procedure, suggesting that it may have an influence on the vascular inflammatory response. To evaluate the effect of uterine flushing after AIFT on animal fertility we designed the experiment 02. Our results revealed that there is no statistical difference in pregnancy rates between flushed and non flushed animals, showing that the UF does not interfere with fertility rate. Experiment 03 was designed in order to assess the inflammatory response induced by different qualities of semen and their interference on uterine hemodynamic and fertility. There was an influence of semen quality on pregnancy rates: higher percentage of pregnancy was found in the group of cows inseminated with semen with plasma and acrossome membrane integrity and mitochondrial function (PIAIC). Endometritis was noticed in 65.3% of the cows and these animals presented lower pregnancy rate compared to those that did not show an inflammatory response. We concluded that semen quality and

endometritis interferes with fertility rate in bovine species. Keywords: Dry uterine Endometrial cytology. Endometritis. Fertility rate. Sperm. Uterine hemodynamics.

Keywords: Dry uterine Endometrial cytology. Endometritis. Fertility rate. Sperm. Uterine hemodynamics.

LISTA DE FIGURAS

Experimento 1

Figura 1 Esquema experimental: os animais selecionados foram divididos em grupos de acordo com o procedimento de coleta uterina, *swab* uterino (SE, n=9 animais) e lavagem uterina (LU, n=10 animais), sincronização do estro e da ovulação, examinados por ultrassonografia Doppler 30 horas antes da IATF, inseminados artificialmente, submetidos à coleta de amostra uterina por lavagem ou *swab* 4 horas após IA, e reavaliados por ultrassonografia Doppler 4, 24 e 48 horas após os procedimentos de coleta..... 47

Figura 2 A) Escova ginecológica utilizada para obtenção de amostra endometrial; B) Escova acoplada em mandril e tubo inoxidável para não permitir contato prévio com vagina e cérvice..... 50

Figura 3 A) Sonda *folley* acoplada ao mandril para auxílio na introdução uterina; B) Sonda *folley* acoplada a seringa com ar para inflar o balonete e seringa com solução fisiológica para lavagem uterina; C) Destaque para sonda *folley* com "cuf" inflado..... 51

Figura 4 Amostra citológica obtida por lavagem uterina com solução fisiológica, para avaliação da celularidade presente. Observa-se a presença de células epiteliais uterinas (endometriais) com núcleo redondo e citoplasma abundante (seta fechada), e grande quantidade de células inflamatória compostas principalmente por polimorfonucleares (neutrófilos) (seta aberta). Gienmsa modificado, 200x..... 53

Figura 5 Imagem ultrassonográfica obtida por exame transretal de uma fêmea bovina, com probe linear (6,5 mHz), na qual se observa um corte transversal da artéria uterina (indicado pela seta) e gráfico gerado utilizando o modo espectral do aparelho M5vet, Mindray. A linha vermelha indica a velocidade máxima dos ciclos cardíacos formados pelo fluxo sanguíneo da artéria uterina, a linha azul indica a velocidade média dos ciclos cardíacos formados pelo fluxo sanguíneo da artéria uterina e a linha amarela é a onda do ciclo cardíaco selecionada pelo aparelho para que seja calculado o valor do índice de resistência (RI) (elipse), pico sistólico (PS), final diastólico (ED), relação entre sístole e diástole (S/D) e taxa de velocidade máxima (TAMAX). Em verde, a estrela indica o pico sistólico e a cruz o final diastólico da onda selecionada para avaliação..... 54

Figura 6 Imagem ultrassonográfica do corte longitudinal (6,5 mHz) do corno uterino bovino para a avaliação subjetiva da vascularização dos cornos uterinos, em modo Color Doppler do aparelho M5vet, Mindray, classificada em escores de 0 a 4. *A*. Escore 1, *B*. Escore 2, *C*. Escore 3, *D*. Escore 4..... 55

Experimento 2

Figura 7 Delineamento experimental, dos 128 animais selecionados, divididos em 2 grupos experimentais GRUPO NÃO LAVADO (93 animais) e GRUPO LAVADO (35 animais*), sendo este último submetidos a avaliação ultrassonográfica nos modos espectral e Doppler colorido 30 horas antes da IA (controle) e 4 horas após a IA, seguida da lavagem uterina. Trinta dias após a IA, todos os animais passaram por ultrassonografia modo B para diagnóstico de gestação..... 65

Experimento 3

Figura 8 Esquema experimental: Os animais selecionados foram divididos em três grupos experimentais, sincronizados em ciclo estral e cio, e inseminados com semên B (60 animais), com sêmen M (68 animais) e com sêmen R (55 animais). Trinta dias após a IA, todos os animais passaram por ultrassonografia modo B para diagnóstico de gestação..... 73

Figura 9 Esquema experimental: Dos animais selecionados e divididos em três grupos experimentais, semên B (60 animais), sêmen M (68 animais) e sêmen R (55 animais), uma amostragem de 18 vacas do grupo B, 17 do sêmen M e 17 do sêmen R foi submetida à avaliação ultrassonografia nos modos espectral e color Doppler 30 horas antes da IA (controle) e 4 horas após a IA, seguida da lavagem uterina. Trinta dias após a IA, todos os animais passaram por ultrassonografia modo B para diagnóstico de gestação..... 74

Figura 10 Aparelho para análise computadorizada do sêmen (CASA), modelo HTM-IVOS; marca Hamilton-Thorne Biosciences (Beverly, MA, USA) (A). Detalhe da Câmara de Makler (B) - Pirassununga, SP – 2013..... 76

Figura 11 Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI, Hoechst 33342, FITC-PSA e JC-1 (aumento de 1.000 x)..... 78

Figura 12 Animais disponibilizados para o processo de seleção para realização do Experimento 3 na Fazenda Fronteira, município de Cocalinho, MT – 2011 ... 80

Figura 13 Implante de progestágeno (Crestar®) para colocação subcutânea auricular e benzoato de estradiol (Estrogin®) utilizado para sincronização de estro no Experimento 3 na Fazenda Fronteira, município de Cocalinho, MT – 2011 ... 81

Figura 14 Procedimentos realizados durantes a técnica de lavagem uterina para coleta de amostra citológica uterina. A) Abertura da vulva; B) Introdução da sonda *Folley* acoplada ao mandril de inox; C e D) Infusão da solução fisiológica; E) Retirada da solução fisiológica por pressão negativa exercida com a seringa; F) Conteúdo obtido transferido para tubos cônicos..... 83

Figura 15 Citocentrífuga (Presvac, CT12) utilizada para confecção das lâminas, em destaque..... 84

LISTA DE QUADROS

Experimento 1

Quadro 1 Classificação do escore uterino de 1 a 3 utilizada para seleção dos animais.... 48
Quadro 2 Classificação do escore ovariano de 1 a 3 de acordo com Madureira e Pimentel (2005) utilizada para seleção dos animais..... 48
Quadro 3 Classificação do escore de condição corporal (ECC) de 1 a 9 de acordo com Spitzer (1986) utilizada para seleção dos animais..... 48
Quadro 4 Classificação da resposta inflamatória uterina de acordo com a porcentagem de células inflamatórias polimorfonucleares encontradas na amostra, adaptada a proposta por Williams et al. (1988)..... 52

Experimento 3

Quadro 5 Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de PI, H324, JC-1 e FITC-PSA, Pirassununga – 2013..... 77
Quadro 6 Grau de resposta inflamatória conforme adaptado ao proposto por Williams et al. (1988) de acordo com a qualidade do sêmen (B, M, R) utilizado na Inseminação Artificial em Tempo Fixo..... 87

LISTA DE TABELAS

Experimento 1

Tabela 1 Média (±EPM) da porcentagem de neutrófilos encontrada na citologia uterina pelas técnicas de escova ginecológica (EU) e lavado uterino (LU) quatro horas após a inseminação artificial..... 57

Tabela 2 Médias (±EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas obtidas por ultrassonografia Doppler nas técnicas de escova ginecológica (EU) e lavado uterino (LU), nos diferentes tempos de avaliação..... 58

Tabela 3 Médias (±EPM) do escore de vascularização (EV) uterino obtido por ultrassonografia Doppler nas técnicas escova ginecológica (EU) e lavado uterino (LU), nos diferentes tempos de avaliação..... 59

Tabela 4 Média (±EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas e escore de vascularização (EV) uterina obtida por ultrassonografia, respectivamente nos modos espectral e Doppler colorido..... 59

Experimento 2

Tabela 5 Média (±EPM) para diagnóstico de gestação em relação aos grupos lavados (GLU) e não lavados (GC), utilizando P<0,01..... 69

Experimento 3

Tabela 6 Valores de motilidade total (%), motilidade progressiva (%), concentração (número de espermatozóides/mL), integridade de membrana plasmática (MPI, %), função mitocondrial (FM, %), integridade de acrossomo (AI, %), porcentagem de células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial mitocondrial (PIAIC, %) e total de defeitos (%) das 20 amostras de sêmen avaliadas..... 79

Tabela 7 Média (±EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas em relação ao sêmen (B, M e R) utilizado na IA, utilizando P<0,01..... 88

Tabela 8 Média (±EPM) do escore de vascularização (EV) uterina (0 a 4) nas artérias uterinas em relação ao sêmen (B, M e R) utilizado na IA e o tempo da análise (-34 e 4), utilizando P<0,01..... 89

Tabela 9 Valores obtidos das correlações entre a porcentagem de células inflamatória (%PMN), índice de resistência vascular (RI), escore vascular (EV), grau de inflamação (Grau de endometrite) e taxa de prenhez (Fertilidade) dos animais avaliados neste experimento..... 89

LISTA DE GRÁFICOS

Experimento 03

Gráfico 1 Porcentagem de prenhez de vacas inseminadas com diferentes qualidades de sêmen, B=Bom (n=60, 44,5% espermatozoides PIAIC); M=Médio (n=68, 23,0% espermatozoides PIAIC); R= Regular (n=55, 8,5% espermatozoides PIAIC), [a,b] letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística (P<0,05)..... 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	Integridade de acrossomo
ABIEC	Associação Brasileira de Industrias Exportadoras de Carne
ALH	Deslocamento lateral de cabeça
ATP	Adenosina tri-fosfato
B	Sêmen bom (44,5% de espermatozoides PIAIC/palheta)
BCF	Frequência de batimento
CASA	Computer-Assisted Semen Analysis
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína
cm	Centímetro
CMXRos	Cloreto de 8-(4'-clorometil) fenil-2,3,5,6,11,12,14,15 octahidro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino-8H-xantilio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Endometrite clínica
ED	Final diastólico
EPM	Erro padrão da média
ES	Endometrite subclínica
EV	Escore vascular
F2α	Prostaglandina F2α
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FITC-PSA	Aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína
FM	Função mitocondrial
H342	Hoechst 33342
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
IP	Índice de pulsatilidade
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IM	Intramuscular
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'- tetracloro-1,1',3,3' tetraetilbenzimidazol carbocianina
LH	Hormônio luteinizante
LIN	Linearidade

LU	Lavagem uterina
M	Sêmen médio (23% de espermatozoides PIAIC/palheta)
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MED	Média
mg	Miligramas
mHz	Mega-hertz
MITO	MitoTracker Green FM®
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MPI	Integridade de membrana plasmática
MT	Mato Grosso
PI	Iodeto de propídio
PIAIC	Integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial
PMN	Polimorfonucleares
PS	Pico sistólico
PSA	Aglutinina de *Pisum sativum*
R	Sêmen regular (8,5% de espermatozoides PIAIC/palheta)
RI	Índice de resistência
RPM	Rotações por minuto
S/D	Relação entre sístole e diástole
SE	Escovado endometrial
SP	São Paulo
SPTZ	Espermatozoides
STR	Retilinearidade
SWAB	Método de recolhimento por esfregar
SYBR – 14/PI	Syber-14/PI®
TAMAX	Taxa de velocidade máxima
UI	Unidade internacional
US	Ultrassonografia
VAP	Velocidade de Trajeto
VSL	Velocidade Progressiva
VCL	Velocidade curvilinear
µm	Micrometro
µL	Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

=	Igual
%	Porcentagem
≥	Maior ou igual
<	Menor
>	Maior
^{o}C	Graus Celsius
+	Mais
-	Menos
r	Coeficiente de correlação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **25**

2 REVISÃO DE LITERATURA **28**

2.1 RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA **28**

2.2 ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER COLORIDO **35**

2.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN E FERTILIDADE **38**

3 EXPERIMENTO 1 ..... **45**

3.1 OBJETIVOS **45**

3.2 HIPÓTESES **45**

3.3 MATERIAL E MÉTODOS **46**

3.3.1 Esquema experimental e divisão dos grupos **46**

3.3.2 Seleção dos animais **47**

3.3.3 Inseminação artificial em tempo fixo **49**

3.3.4 Avaliação citológica uterina com escova ginecológica (EU) **49**

3.3.5 Avaliação citológica por lavagem uterina com solução salina (LU) **51**

3.3.6 Coloração e leitura das lâminas **52**

3.3.7 Hemodinâmica uterina por ultrassom Doppler colorido **53**

3.3.8 Análise estatística **56**

3.4 RESULTADOS **56**

3.4.1 Comparação entre as técnicas de EU e LU **57**

3.4.2 Efeito das técnicas EU e LU sobre a hemodinâmica uterina **58**

3.5 DISCUSSÃO **60**

3.6 CONCLUSÕES **62**

4 EXPERIMENTO 2 ..... **64**

4.1 OBJETIVOS **64**

4.2 HIPÓTESES **64**

4.3 MATERIAL E MÉTODOS **64**

4.3.1 Esquema experimental e divisão dos grupos **65**

4.3.2 Avaliação do sêmen **65**

4.3.3 Seleção dos animais **66**

4.3.4 Inseminação artificial em tempo fixo **66**

4.3.5 Lavagem uterina **67**

4.3.6 Diagnóstico de gestação **67**

4.3.7 Análise estatística **68**

4.4 RESULTADOS **68**

4.4.1 Efeito da lavagem uterina na fertilidade **68**

4.5 DISCUSSÃO **69**

4.6 CONCLUSÃO **70**

5 EXPERIMENTO 3 72

5.1 OBJETIVOS **72**

5.2 HIPÓTESES **72**

5.3 MATERIAL E MÉTODOS **73**

5.3.1 Esquema experimental e divisão dos grupos **73**

5.3.2 Avaliação do sêmen **75**

5.3.3 Seleção dos animais. **79**

5.3.4 Inseminação artificial em tempo fixo **80**

5.3.5 Avaliação da hemodinâmica uterina **81**

5.3.6 Lavagem uterina **82**

5.3.7 Coloração e leitura das lâminas **84**

5.3.8 Diagnóstico de gestação **85**

5.3.9 Análise estatística **85**

5.4 RESULTADOS **86**

5.4.1 Fertilidade após IA com sêmen de diferentes qualidades **86**

5.4.2 Resposta inflamatória uterina após a IA com sêmen de diferentes qualidades **87**

5.4.3 Resposta vascular uterina após IA com sêmen de diferentes qualidades **88**

5.4.4 Correlação entre resposta inflamatória uterina e vascularização uterina **89**

5.5 DISCUSSÃO **90**

5.6 CONCLUSÕES **94**

REFERÊNCIAS 96

ANEXOS 110

APÊNDICE 112

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O rebanho Brasileiro encerrou o ano de 2012 com cerca de 212 milhões de cabeças bovinas, sendo 40,4 milhões destes animais destinados ao abate comercial (ABIEC, 2013). Os índices de produtividade dependem diretamente da fertilidade de um rebanho, que por sua vez podem ser influenciadas por vários fatores. Dentre eles destacam-se as condições do trato reprodutivo das fêmeas, a qualidade do sêmen utilizado e todos os eventos físicos e bioquímicos que os gametas sofrem até a fecundação. Sendo assim, a higidez do trato reprodutivo feminino é de extrema importância para a capacitação espermática e para o desenvolvimento embrionário e fetal.

Do ponto de vista imunológico, o sêmen depositado no trato reprodutivo das fêmeas, seja por monta natural ou inseminação artificial é estranho ao organismo, e como resposta a esta invasão ocorre uma reação inflamatória, que, de acordo com Troedsson (1999) e Robertson (2005) é fisiológica, transitória e importante para a remoção do excesso de espermatozoides mortos e outros contaminantes uterinos, sendo caracterizada pela rápida infusão de leucócitos, sobretudo os polimorfonucleares (PMN) (WERNER, 2010). No entanto, este processo deve ser controlado e as condições uterinas normalizadas rapidamente para proporcionar um ambiente uterino adequado e permitir o desenvolvimento do embrião. Todavia, um atraso em debelar o processo inflamatório pode ocorrer em razão de acentuada resposta inflamatória, o que caracterizaria uma endometrite subclínica, de acordo com Kasimanickam et al. (2005b); Gilbert et al. (2005) e Kaufmann et al. (2009).

Esta interação que ocorre entre o sêmen e o processo inflamatório pós-inseminação está bem descrita em equinos (TROEDSSON, 1999; ROBERTSON, 2005), mas nos bovinos ainda tem sido pouco estudada devido à dificuldade da aplicação das técnicas para sua avaliação (KASIMANICKAM et al., 2005a; SANTOS et al., 2009). As amostras citológicas podem ser obtidas por biopsia uterina, por *swabs* de algodão ou escova ginecológica e por lavagem uterina (KASIMANICKAM et al., 2005a). Técnicas que produzam células preservadas e representativas de uma grande superfície do útero sem causar danos ao trato reprodutivo são requeridas para um consistente e confiável resultado de citologia (KASIMANICKAM et al., 2004; GILBERT et al., 2005; KASIMANICKAM et al., 2005a; BARLUND et al., 2008; KAUFMANN et al., 2009). Todavia, deve-se destacar que estas técnicas apresentam características invasivas, que podem mascarar a real resposta inflamatória, tornando necessário verificar seus efeitos.

Técnicas não invasivas, como a ultrassonografia, para a avaliação do ambiente uterino podem contribuir para o diagnóstico da endometrite subclínica. O ultrassom modo-B é capaz de identificar conteúdo líquido no lúmen uterino, todavia não é possível diferenciar este conteúdo quanto a sua constituição de células inflamatórias, muco ou sêmen. O ultrassom Doppler colorido vem sendo utilizado para estudar o fluxo sanguíneo uterino de vacas nos diferentes estágios do ciclo estral e pode ser utilizado para estudar a perfusão vascular do útero com comprometimento endometrial, uma vez que o processo inflamatório apresenta alterações circulatórias (BOLLWEIN et al., 2000).

A qualidade do sêmen depositado no útero pode influenciar na resposta inflamatória pós-cobertura, e esta depende da integridade e função de todas as estruturas que compõem a célula espermática, como membrana plasmática, flagelo, mitocôndrias, acrossomo e cromatina, as quais são geralmente avaliadas por técnicas separadas, que nem sempre correspondem à capacidade fecundante do espermatozoide, visto que este precisa que todas estejam íntegras para cumprir suas funções.

Técnicas para avaliar diferentes características espermáticas simultaneamente, como integridade de membrana plasmática e acrossomal e função mitocondrial, vêm sendo desenvolvidas (CELEGHINI et al., 2007a). Todavia, ainda não está definida sua importância na fertilidade e qual deve ser o número mínimo de espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial (PIAIC) necessário por dose inseminante para se obter sucesso na fertilização. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) adota padrões definidos no Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), no qual uma palheta de sêmen bovino é considerada apta para a comercialização e uso na IA quando apresentar pelo menos 10 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva pós descongelação.

Deste modo, sugere-se que a deposição de sêmen com maior quantidade de espermatozoides lesados promova maior resposta inflamatória uterina, com aumento de PMN, aumento do fluxo sanguíneo uterino e consequente redução da taxa de fertilidade. Por outro lado, como a endometrite subclínica é uma importante causadora de insucesso no desempenho reprodutivo em vacas, seu diagnóstico precoce poderá favorecer um melhor aproveitamento e trazer benefícios financeiros aos rebanhos comerciais.

Este estudo foi desenvolvido, em três experimentos, com intuito de se avaliar a real interferência da deposição de sêmen com diferentes porcentagens de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitoncondrial, na resposta inflamatória uterina e na taxa de prenhez de vacas Nelore inseminadas artificialmente em tempo fixo.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A pecuária vem passando nas últimas décadas por um processo de incorporação de tecnologia visando a melhoria dos índices de produtividade e a aceleração do melhoramento genético. Neste cenário, a inseminação artificial figura como a biotécnica mais importante incorporada ao sistema de produção pecuária, pois permite melhor aproveitamento e globalização de touros com valores genéticos superiores (SUGULLE et al., 2006).

No Brasil estima-se que 10% das fêmeas bovinas em idade reprodutiva são inseminadas artificialmente (ASBIA, 2011). O incremento notado no uso da inseminação artificial em bovinos se deve, principalmente, ao desenvolvimento de inúmeros protocolos hormonais para regular o crescimento folicular e a ovulação, permitindo a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (BARUSELLI et al., 2004). Mesmo com isso, ainda se nota que a taxa de fertilidade com o uso da IATF pode ser melhorada. Neste sentido, o estudo da interação que ocorre entre o ambiente uterino, bem como suas técnicas de avaliação, e o sêmen depositado no trato reprodutivo das fêmeas sobre a fertilidade poderá fornecer subsídios para estudos futuros.

2.1 RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA

O desempenho reprodutivo de vacas leiteiras após o período voluntário de espera é altamente relacionado com o estado de saúde do útero após o parto (DIJKHUZEN et al., 1985; FERGUSON; GALLIGAN, 2000; KAUFMANN et al., 2009), existindo complexa relação entre os fatores que influenciam na saúde uterina e as doenças no pós-parto (GILBERT, 1992; NEBEL, 1999). A suscetibilidade do útero para trauma e infecção resulta em síndromes que vão desde endometrite leve à metrite tóxica, sendo um dos temas mais polêmicos discutidos entre os profissionais, devido à falta de um padrão de diagnóstico, falta de uma definição universalmente aceita e escassez de informações na literatura específica (GILBERT, 1992; LEBLANC et al., 2002; KASIMANICKAM et al., 2004; GILBERT et al., 2005; HAMMON et al., 2006; WILLIAMS et al., 2007). Inúmeros fatores de risco estão envolvidos na causa da doença uterina, incluindo retenção de anexos fetais, distocia, gêmeos, paridade, meio ambiente e genética (COLEMAN et al., 1985).

A inflamação do endométrio é caracterizada pela migração de células inflamatórias polimorfonucleares (PMN) para o ambiente uterino, onde recebe a nomina de endometrite e é classificada em subclínica (ES) e clínica (EC). A endometrite no período pós-parto tem um impacto negativo sobre o desempenho reprodutivo por aumentar o número de serviços por concepção, o intervalo do primeiro serviço à concepção (BORSBERRY; DOBSON, 1989; HEUWIESER et al., 2000), reduzir a chance de prenhez (LEBLANC et al., 2002) e diminuir a taxa de concepção (FOURICHON et al., 2000). A endometrite subclínica imediatamente antes da IA apresenta uma relação inversa com a concepção (WILLIAMS et al., 1988) e, após a inseminação pode prejudicar o ambiente uterino e dificultar a implantação e o desenvolvimento do embrião (KAUFMANN et al., 2009).

A maioria dos processos inflamatórios uterinos ocorre no período pós-parto ou pós-abortamento, além de ocorrer também após o coito ou a inseminação artificial, sendo iniciada por contaminantes bacterianos e espermatozoides na maioria das vezes (TROEDSSON, 1995, 2006; NASH et al., 2010). Troedsson et al. (1997), relatam que em éguas o plasma seminal é um importante depressor da resposta inflamatória do endométrio aos espermatozoides na cobertura natural ou inseminação com sêmen fresco, no entanto na inseminação com sêmen criopreservado, a retirada do plasma seminal para concentrar os espermatozoides favorece a inflamação do endométrio (KOTILAINEN et al., 1994), além de outros fatores como reações de hipersensibilidade do tipo alérgico aos componentes dos meios de congelação, ou depuração uterina retardada (WATSON, 2000; TROEDSSON et al., 2001).

Na inseminação artificial, o sêmen é depositado no útero onde se inicia o processo de capacitação espermática e muitos espermatozoides são fagocitados, reduzindo seu número. Poucos espermatozoides férteis e em estágio adequado de maturação passam a junção útero-tubárica para completar sua capacitação, atingir o local de fertilização e fecundar o ovócito (FLESCH; GADELLA, 2000; SUAREZ; PACEY, 2006; SUAREZ, 2007). O restante permanece no ambiente uterino e precisa ser removido para garantir a higidez do útero (KATILA, 1995). Logo após a deposição do sêmen no útero, este se torna um ambiente hostil para os espermatozoides devido à reação inflamatória que ocorre para remoção destes contaminantes (TROEDSSON, 1995; ALGHAMDI et al., 2004; CARD, 2005; DELL'AQUA JUNIOR et al., 2006; FIALA et al., 2007). Esta reação inflamatória induzida pós-inseminação é fisiológica e transitória, sendo caracterizada pela rápida infusão de polimorfonucleares (PMN) (KATILA, 1995; TROEDSSON, 1995; ROZEMBOOM et al., 1998; TROEDSSON, 1999; GUVENC et al., 2005; RIBEIRO et al., 2006), que constituem a primeira linha de defesa contra a invasão de organismos patogênicos (WATSON et al., 1990; BUTT et al., 1993;

GILBERT et al., 2005). Baggiolini et al. (1993) e Kaufmann et al. (2009) afirmam que o papel dos PMN é a inativação rápida e eliminação das estruturas autólogas alteradas, além de funções de regulação, liberação de citocinas, ativação ou inibição de células e expressão de moléculas de superfície por ação quimiotática, além de alta capacidade fagocítica de contaminantes. A inflamação persistente do endométrio, induzida pelos espermatozoides ou outros contaminantes, tem contribuído para diminuir a fertilidade em éguas, alterando o microambiente uterino e dificultando a sobrevivência embrionária (CARD, 2005).

Diferentes períodos após o parto (21-60 dias) estão sendo utilizados em estudos, assim como diferentes limiares de PMN, para definirem endometrite subclínica e sua interferência no desempenho reprodutivo (KASIMANICKAM et al., 2006). Porém, poucos estudos investigam o impacto da evidência citológica da inflamação imediatamente após a inseminação (WILLIAMS et al., 1988), uma vez que a endometrite subclínica no período pós-parto pode se resolver antes da inseminação artificial, conforme relatado por Gilbert et al. (2005).

O sêmen induz uma resposta de neutrófilos no útero das éguas após sua deposição (TROEDSSON et al., 1995), e os primeiros neutrófilos foram encontrados no útero 30 minutos após a IA e a maior quantidade foi vista entre quatro e 24 horas (KOTILAINEN et al., 1994; KATILA, 1995, 2001). Em outro experimento, foi detectado maior número de PMN 48 horas após a deposição do sêmen (NIKOLAKOPOULOS; WATSON, 2000) e maior resposta inflamatória foi descrita pela deposição intrauterina de sêmen congelado, devido ao grande número de espermatozoides mortos durante a criopreservação (KOTILAINEN et al., 1994). A presença de PMN em útero de porcas foi observada até 36 horas após a IA (ROZEBOOM et al., 1999) e, em bovinos, a alta proporção de PMN (>15%) 4 horas após a IA reduziu a taxa de concepção (KAUFMANN et al., 2009).

É necessário que o processo inflamatório após a IA seja devidamente controlado e que as condições uterinas normais sejam restabelecidas para que o embrião possa se desenvolver adequadamente no ambiente uterino. Entretanto, se for depositada maior quantidade de espermatozoides inviáveis durante a inseminação e houver atraso em conter o processo inflamatório, poderá ocorrer endometrite subclínica e progressão à clínica (GILBERT et al., 2005; KASIMANICKAM et al., 2005b; KAUFMANN et al., 2009).

As perdas econômicas devido às afecções uterinas, incluindo endometrite, são altas em vacas leiteiras (BARTLETT et al., 1986; GUARD, 1994), sendo que a taxa de incidência no período de lactação varia de 7,8 a 94% (CURTIS et al., 1985; GILBERT et al., 1998; KASIMANICKAM et al., 2004, 2005; RAAB, 2004; GILBERT et al., 2005; HAMMON et

al., 2006; BARLUND et al., 2008). Por isso, considerável interesse tem sido mostrado em relação ao efeito da endometrite no desempenho reprodutivo e na eficácia dos diferentes tratamentos. Apesar do seu impacto substancial no desempenho reprodutivo, há controvérsias quanto à definição do caso e as opções de tratamento (KINSEL, 1996). Diferentes técnicas de diagnóstico, incluindo palpação transretal uterina (STUDER; MORROW, 1978), vaginoscopia (MILLER et al., 1980; LEBLANC et al., 2002) cultura de fluidos uterinos (BRETZLAFF, 1987), biópsia uterina (BONNETT et al., 1991), citologia uterina (GILBERT et al., 1998) e ultrassonografia (KASIMANICKAM et al., 2004), vem sendo aplicadas em diferentes momentos de amostragem, contribuindo para definição dos casos e escolha do tratamento.

O diagnóstico da endometrite por palpação retal e observação casual de uma descarga vaginal é provavelmente a base para o tratamento da maioria das vacas no campo. Observações repetidas confirmaram que este é um método pouco sensível de diagnóstico, onde de 157 vacas com suspeita de endometrite com base somente na palpação retal, 22% apresentaram-se positivas (GILBERT et al., 2005).

Miller et al. (1980); Kinsel (1996) e Leblanc et al. (2002) afirmam que a vaginoscopia é um método mais preciso para investigar infecções uterinas do que a palpação retal, sendo mais sensível e específica para detectar descarga uterina anormal. No entanto, a vaginoscopia muitas vezes não identifica todas as vacas em risco de baixo desempenho reprodutivo, considerando que a ausência de descarga não garante a ausência de inflamação uterina, uma vez que a descarga pode ser influenciada pela gravidade da infecção, pela contração do miométrio, pelos mecanismos de limpeza do útero, pela conformação perineal, pelo escore de condição corporal, por alterações posturais e até mesmo por exercícios (KASIMANICKAM et al., 2004).

Leblanc et al. (2002) detectaram que o desempenho reprodutivo de vacas com secreção purulenta na vaginoscopia é significativamente menor do que o daquelas sem descarga anormal, e Mateus et al. (2002a) relatam que o volume de líquido intra uterino identificado por ultrassonografia está significativamente correlacionado com o crescimento bacteriano em *swab* uterino, além da infecção prejudicar consideravelmente a involução uterina.

O grande desafio que poderia trazer benefícios aos tratamentos e ao desempenho reprodutivo é a detecção de vacas que apresentam endometrite subclínica ou clínica sem manifestações ou descargas anormais.

O exame citológico do trato reprodutivo é frequentemente utilizado para avaliar

possíveis lesões em humanos e animais domésticos, tendo como exemplos o exame citológico do colo do útero em mulheres (GLENTHOJ et al., 1986), exame citológico endometrial em éguas (WINGFIELD-DIGBY, 1987) e vacas (GILBERT et al., 1998; HAMMON et al., 2001), aceitos como técnicas de diagnóstico. Células endometriais e inflamatórias podem ser coletadas por *swab* de algodão (STUDER; MORROW, 1978), biópsia uterina (MILLER et al., 1980; BONNETT et al., 1991; BOURKE et al., 1997), lavagem uterina (BOURKE et al., 1997; GILBERT et al., 1998; HAMMON et al., 2001; MATEUS et al., 2002b; GILBERT et al., 2005; SHELDON et al., 2006) ou escova ginecológica (STUDER; MORROW, 1978; GLENTHOJ et al., 1986; KASIMANICKAM et al., 2004; RAAB, 2004; LINCKE, 2006).

Técnicas que recuperem células conservadas, representativas de uma grande área de superfície uterina, sem provocar danos no trato reprodutivo, são necessárias para resultados consistentes e confiáveis (KASIMANICKAM et al., 2005a). A técnica de lavado uterino obtém amostras de células de uma maior área de superfície do útero e fornece elevada representatividade do conteúdo luminal, opostamente a escova ginecológica ou biópsia uterina (BOURKE et al., 1997; GILBERT et al., 1998; HAMMON et al., 2001). Além disso, a escova ginecológica pode causar irritação ao endométrio (BALL, 1988; ROSZEL; FREEMAN, 1988; BROOK, 1993).

Swabs são mais susceptíveis de distorcer as células e não são recomendados no exame citológico do colo do útero humano como diagnóstico de câncer, que requer células preservadas para estudar detalhes morfológicos (KAVAK et al., 1995). Cotonetes são utilizados rotineiramente para avaliar citologia vaginal em cadelas. Em seres humanos e equinos, a técnica de escova ginecológica supera outros métodos de recolhimento de células cervicais e do endométrio (GLENTHOJ et al., 1986; BOURKE et al., 1997).

Kasimanickam et al. (2005a) coletaram amostras citológicas endometriais de vacas em seu estudo, primeiramente através da técnica de escova ginecológica e, em seguida, pela técnica de lavagem uterina. A razão para a realização da técnica de escova ginecológica foi evitar a irritação ao endométrio, causada pelo fluido a partir da técnica de lavagem citada por Ball (1988); Roszel e Freeman (1988) e Brook (1993). Porém, pode-se argumentar que a técnica de escova ginecológica também pode causar irritação ao endométrio, mas o tempo necessário para obter amostras pela técnica de escova ginecológica é mais rápido em comparação à técnica de lavagem. Além disso, o volume de fluido deixado no útero após a obtenção de amostras pela técnica de lavagem pode afetar o grau de irritação e, assim, influenciar no resultado de amostragem da escova ginecológica, se esta for obtida depois (KASIMANICKAM et al., 2005a).

O exame citológico por lavagem uterina com baixos volumes de solução salina para recuperar neutrófilos foi estudado em gado leiteiro como método para definir endometrite subclínica (GILBERT et al., 1998) e clínica (HAMMON et al., 2001), e utilizado também em éguas na detecção de endometrite crônica (LEBLANC et al., 2007). Gilbert et al. (1998) infundiram 20 mL de líquido e Kasimanickam et al. (2005a) infundiram 60 mL no corpo uterino de vacas, para evitar que a manipulação do útero a fim de passar a haste de infusão semirrígida até o corno uterino resultasse em traumas.

Kasimanickam et al. (2005a) relatam que, de todas as tentativas de lavado uterino, 17% (12/70) não permitiram a recuperação de qualquer fluido, porém que a porcentagem média de células PMN não foi influenciada pelo volume de líquido recuperado em tentativas de sucesso, onde no geral, a porcentagem diminuiu conforme aumentou o tempo pós-parto. Gilbert et al. (1998) não relataram falha na recuperação do fluido. Kasimanickam et al. (2005a) afirmam que a diminuição do tamanho do útero durante as fases posteriores do pós-parto poderia ajudar na recuperação de fluido através da técnica de lavagem, resultando em melhor recuperação em comparação às primeiras fases de pós-parto, confirmando o que já havia sido relatado por Gilbert et al. (1998), que usaram a técnica de lavagem com sucesso para a avaliação citológica do endométrio para o diagnóstico de endometrite entre 40 e 60 dias pós-parto. Kasimanickam et al. (2005a) enfatizam ainda que a não recuperação de fluidos e o possível trauma no útero indicam que a técnica de lavagem é inconsistente e possivelmente prejudicial.

Kasimanickam et al. (2005a) indicaram que a técnica de escova ginecológica poderia ser utilizada com sucesso e confiabilidade para obter amostras endometriais, resultando numa porcentagem média de células PMN significativamente maior do que a técnica de lavagem em seu estudo nas fases iniciais do pós-parto (20 a 33 dias). Porém, nas fases posteriores do período de pós-parto (33 a 47 dias), a técnica de lavagem e a técnica de escova ginecológica foram semelhantes na captura de amostras por estes autores. Desta forma, a porcentagem média de PMN está negativamente associada aos dias pós-parto, assim como ocorreu em trabalhos realizados por Bonnett et al. (1991) e Gilbert et al. (1993), que observaram redução no número de neutrófilos com a evolução do período pós-parto. A presença de glóbulos vermelhos na amostra tende a ser maior na técnica de lavagem em comparação com a escova ginecológica, possivelmente pelos traumas decorrentes da manipulação do útero e da haste de infusão durante a tentativa de recuperar o fluido (KASIMANICKAM et al., 2005a).

Os estudos citológicos demonstram que o número de células recuperadas é crítico, uma vez que para definir a inflamação, depende-se do limiar de células inflamatórias utilizado

(KASIMANICKAM et al., 2005a). Hammon et al. (2006) utilizaram um valor limiar de 25 % de PMN na amostra citológica com 28 dias pós-parto, Kasimanickam et al. (2005b) utilizaram 18 % de PMN com 20-33 dias pós-parto e outros autores (RAAB, 2004; GILBERT et al., 2005; LINCKE, 2006; BARLUND et al., 2008) utilizaram o limiar entre 5 % a 8 % de PMN. Williams et al. (1988) classificaram, de acordo com a porcentagem de células PMN presentes no lavado, em grau 0 ou normal quando há menos de 5 % de neutrófilos na amostra; grau 1 ou inflamação leve quando presentes de 5 a 25 % de neutrófilos, grau 2 ou inflamação moderada quando há de 25 a 75 % de neutrófilos; e grau 3 ou inflamação grave quando presentes mais de 75 % de neutrófilos. Já Card (2005) utilizou índices <5 % para não inflamatório, 5 a 15 % para inflamação leve, 15 a 30 % inflamação moderada, e >30 % inflamação severa em éguas, no período pós parto.

Ellenberger et al. (2006) descreveram que em 82 % dos úteros examinados com endometrite, todo o endométrio estava afetado, sugerindo que a técnica de escova ginecológica seja adequada para identificar a inflamação do endométrio na maioria dos casos. De forma contraditória, Kasimanickam et al. (2005a) declaram que a técnica de escova ginecológica produz amostras *in situ*, que podem representar a natureza inflamatória do endométrio em um local, com menor distorção das células, diferentemente da técnica de lavagem uterina, que proporciona amostra diluída de conteúdos luminais, representando maior superfície uterina em análise e com maior distorção celular. Esta alteração de células pode ser explicada pelo procedimento da lavagem uterina, que a partir da obtenção da amostra até a preparação da lâmina leva em torno de duas horas.

Mesmo que a técnica de escova ginecológica exigisse equipamentos especializados, a coleta de amostras por este método é mais fácil, mais consistente, e produz resultados rápidos (Kasimanickam et al., 2005a). Os autores concluíram ainda que os resultados das amostras obtidas por escova ginecológica foram superiores em todos os parâmetros, indicando que a técnica é mais consistente e confiável, do que a lavagem uterina, porém isso é para obtenção de amostras de citologia do endométrio de vacas leiteiras no pós-parto. Gilbert et al. (2005) afirmam que a citologia endometrial é uma técnica para o diagnóstico de endometrite válida, mesmo sendo possível que alguns fatores interfiram em diagnóstico falso-negativo ou falso-positivo.

Gilbert et al. (2005) obtiveram amostras satisfatórias para fins de diagnóstico de todas as vacas do estudo (141 vacas com 40-60 dias pós-parto), havendo uma prevalência de endometrite subclínica em 53 % destas vacas. Os autores relatam ainda que vacas com diagnóstico citológico positivo à endometrite subclínica tiveram diminuição na proporção

total de prenhez (69 %) em comparação com vacas negativas (90 %), e a taxa de concepção no primeiro serviço foi menor (11 %) quando comparadas com as vacas negativas (36 %). Leblanc et al. (2002) afirmam que vacas com endometrite tiveram 30 % menos chances de emprenhar no primeiro serviço e 70 % mais de serem abatidas por falhas reprodutivas.

Não se conhece até que ponto as gestações em animais domésticos podem ser comprometidas pelo fato do sistema imunológico materno não estar devidamente regulado, porém se sabe que a função imune do trato reprodutivo é de extrema importância para a sanidade e manutenção das condições favoráveis à fertilização, assim como a detecção precoce da inflamação do endométrio, juntamente com uma intervenção oportuna, são necessárias para aumentar a taxa de prenhez. Outro aspecto importante diz respeito a alguns hormônios reprodutivos, a exemplo do 17β-estradiol, que aumenta a vascularização e favorece a migração de PMN. Já a progesterona inibe a resposta imune uterina e parece ter papel importante durante a fertilização e gestação (HANSEN, 2004; CARD, 2005).

2.2 ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER COLORIDO

Antigamente, na Medicina Veterinária, o fluxo sanguíneo uterino era investigado pelo uso de sondas ultrassônicas ou eletromagnéticas Doppler implantadas cirurgicamente (WAITE et al., 1990). Hoje em dia, com os avanços tecnológicos e a introdução da ultrassonografia em tempo real, é possível avaliar mudanças que ocorrem no trato reprodutivo de fêmeas por uma técnica não invasiva (BOLLWEIN et al., 2000), revolucionando o conhecimento da biologia reprodutiva (MEDAN; EL-ATY, 2010). O método Doppler colorido utilizado para verificar mudanças fisiológicas e patológicas na circulação sanguínea uterina de mulheres (HARRINGTON et al., 1991, TAN et al., 1996), passou a ser utilizado para observar o fluxo sanguíneo ovariano (MIYAMOTO et al., 2006) e uterino (BOLLWEIN et al., 2000) em vacas, ovelhas, porcas (GREISS; ANDERSON, 1969; FORD et al., 1979; FORD, 1994) e éguas (BOLLWEIN et al., 2003), esclarecendo a natureza de alguns processos complexos na reprodução em animais, incluindo a dinâmica folicular ovariana, a função do corpo lúteo e o desenvolvimento fetal (MEDAN; EL-ATY, 2010).

A ultrassonografia trata-se de um método de diagnóstico por meio de ondas sonoras com frequência acima de 20.000 Hz, superior à percebida pelo ouvido humano, que são emitidas a uma velocidade constante até encontrarem uma superfície refletora, em que

dependendo da densidade dessa superfície, faz com que parte destas ondas seja refletida e captada pelo transdutor. Este por sua vez, possui cristais com propriedades de transformar a energia mecânica em elétrica, covertendo estas ondas em pontos de luz em uma tela conversora de varredura. Desse modo, a imagem de órgãos e tecidos é reconstituída para exploração das estruturas. A aplicação da técnica, a partir da década de 80 foi tida como ferramenta importante para o estudo e entendimento dos eventos fisiológicos que ocorrem no ciclo estral e gestação de diversas espécies, proporcionando maior eficiência reprodutiva aos animais já, que permitia maior precisão e segurança para o diagnóstico, prognóstico e terapêutica (NEVES et al., 2001).

Três diferentes modos de trabalho são vistos na ultrassonografia Doppler, o modo-B, o modo-Doppler colorido e o modo-Espectral. O modo-B (bidimensional) é utilizado para identificação anatômica de estruturas do organismo animal, apresentando-as numa imagem em escalas de cinza. O modo-Doppler colorido estima a vascularização do tecido avaliado, fornecendo imagens coloridas onde há fluxo sanguíneo, permitindo estimar a perfusão sanguínea do tecido através da observação da porcentagem de tecido com pontos coloridos durante o exame (GINTHER; MATTHEW, 2004). Esta técnica também permite avaliar a presença, direção e qualidade do fluxo sanguíneo de modo mais rápido que qualquer outra técnica não invasiva (CARVALHO; ADDAD, 2009). É a técnica aplicada para a avaliação de forma subjetiva do endométrio de éguas prenhes, de modo que quanto maior o escore, maior é a vascularização do órgão em questão, ou seja, o escore de vascularização é diretamente proporcional ao fluxo sanguíneo do órgão avaliado (SILVA et al., 2005). O modo-Espectral fornece valores exatos de índices relacionados com a vascularização, como pico sistólico, final diastólico, relação entre sístole e diástole, índice de resistência (RI), taxa de velocidade máxima do fluxo sanguíneo e batimentos cardíacos por minuto (GINTHER; MATTHEW, 2004; GINTHER et al., 2007). Entretanto, para que estes valores sejam reais é preciso que haja angulação correta entre a probe e o vaso sanguíneo avaliado (GINTHER et al., 2007). Silva et al. (2005) e Ferreira et al. (2010) relataram que os valores do índice de resistência (RI) e índice de pulsatilidade (IP) podem ser utilizados para a avaliação do trato reprodutivo, pois não são influenciados por esta angulação da probe em relação ao vaso, e afirmam ainda, juntamente com outros autores (SCHOLTES et al., 1989; CHUANG et al., 1999; BOLLWEIN; MAYER; STOLLA, 2003; GINTHER et al., 2007), que quanto menores os valores de RI e IP maior será o fluxo sanguíneo do vaso em questão, ou seja, RI e IP são inversamente proporcionais ao fluxo sanguíneo do tecido avaliado.

A movimentação das hemácias que são transportadas no interior dos vasos em relação

ao transdutor é o princípio utilizado pela ultrassonografia Doppler para análise (GINTHER et al., 2007). As alterações de velocidade e sentido do fluxo sanguíneo são representadas por imagens com cores diferentes, em tons de vermelho e azul, podendo alterar a tonalidade de acordo com a intensidade e direção do fluxo (GINTHER et al., 2007). Convencionou-se que o fluxo em direção ao transdutor é vermelho e o fluxo na direção contrária é azul, e quanto maior a velocidade, mais clara é expressa a tonalidade da cor (YANIK, 2002).

A aplicação da ultrassonografia Doppler vem permitindo observar vários fenômenos fisiológicos essenciais que não eram detectáveis com a imagem em preto e branco, como a observação do fluxo sanguíneo local de folículos e corpos lúteos individualmente em vacas com ciclos estrais espontâneos ou hormonalmente controlados. A afirmação de que o folículo para se tornar dominante, além do tamanho (mensurado na imagem em preto e branco), teria que apresentar fluxo sanguíneo apropriado, o que permitiria seu maior crescimento e a manutenção da dominância, só foi possível com a utilização desta técnica. Esta técnica permitiu ainda notar que após o pico de LH, o fluxo e a velocidade sanguínea na parede do folículo ovulatório aumentam consideravelmente. Desta forma, grandes descobertas foram realizadas quanto às mudanças do fluxo sanguíneo que ocorrem durante a formação e a lise do corpo lúteo, relacionando-as às concentrações plasmática de progesterona e resposta aos tratamentos com prostaglandina F2α (MIYAMOTO et al., 2006; MATSUI; MIYAMOTO, 2008).

Ford et al. (1979) e Waite et al. (1990), relataram alterações em fluxo sanguineo uterino com o uso de transdutores eletromagnéticos implantados na artéria uterina. Os autores observaram que a perfusão uterina foi positivamente correlacionada com as concentrações sistêmicas de estradiol e negativamente com as concentrações de progesterona em vacas, assim como em ovelhas e porcas (GREISS; ANDERSON, 1969; FORD et al., 1979; FORD, 1994). Resultados semelhantes puderam ser observados por Bollwein et al. (2000) com o uso da ultrassonografia Doppler em vacas, caracterizando baixo fluxo sanguíneo uterino durante o diestro (altas concentrações de progesterona) e aumento do fluxo sanguíneo no estro (altas concentrações de estrógenos), porém, outros fatores podem estar envolvidos na variabilidade deste fluxo durante as diferentes fases do ciclo estral (HERZOG; BOLLWEIN, 2007). Esta técnica também foi utilizada para avaliar as variações do fluxo sanguíneo no decorrer da gestação e durante o puerpério em bovinos (HERZOG; BOLLWEIN, 2007).

Matsui e Miyamoto (2008) afirmam que além da melhor compreensão da fisiologia, a ultrassonografia Doppler colorido tem se apresentado como valiosa ferramenta para a clínica reprodutiva, auxiliando na detecção de prenhez, perdas embrionárias e fetais, avaliação

da função de corpos lúteos, respostas superovulatórias e diagnósticos de afecções reprodutivas.

Herzog e Bollwein (2007) observaram que em vacas com puerpério alterado, o volume de fluxo sanguíneo uterino diminuiu quatro dias pós-parto e a resistência do fluxo sanguíneo uterino aumentou após oito dias, e que estas mudanças foram menos pronunciadas em vacas com puerpério normal, relacionando tais alterações a processo inflamatório, fundamentados na afirmação de Slama et al. (1994), de que altas concentrações de prostaglandinas causam vasodilatação em vacas com endometrite pós-parto. Como é uma ferramenta importante para o estudo da viabilidade endometrial, assim como para a interação concepto-maternal, fisiologia do fluxo sanguíneo de vasos, tecidos e órgãos do aparelho reprodutor, é provável que, no futuro, esta técnica possa ser empregada para estudar a relação entre a deposição do sêmen e a perfusão vascular do útero com comprometimento endometrial (BOLLWEIN et al., 2000), e no diagnóstico auxiliar de endometrite pós-cobertura (FERREIRA; MEIRA, 2011), uma vez que a resposta inflamatória aguda é caracterizada pela expansão do leito vascular e aumento do fluxo sanguíneo local, favorecendo a exsudação de líquidos, proteínas plasmáticas e a migração de leucócitos, sobretudo os neutrófilos (WERNER, 2010).

Com a utilização complementar do Doppler espectral, a artéria uterina pode ser facilmente localizada e avaliada com relação ao pulso e fluxo, considerando que fatores como desempenho cardíaco, comprimento do vaso, viscosidade do sangue e pressão de perfusão da artéria uterina, permanecem constantes, a diminuição no índice de resistência e o aumento no tempo de velocidade máxima estariam associados ao aumento proporcional no fluxo sanguíneo (BOLLWEIN et al., 2000).

Estes estudos validam a utilização da ultrassonografia Doppler colorida como técnica não invasiva e vantajosa para avaliar a perfusão do aparelho reprodutor de vacas nos diferentes estágios do ciclo estral, prenhez e puerpério, fornecendo informações adicionais sobre os processos fisiológicos e patológicos do útero e ovários, e conduzindo a novos métodos de diagnóstico e terapias das desordens reprodutivas.

2.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN E FERTILIDADE

O método mais seguro para mensurar a fertilidade do sêmen é por meio da taxa de prenhez após monta natural ou inseminação artificial, mas esses procedimentos são

demorados e tem custo elevado (LARSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000; ARRUDA et. al., 2010b, 2011). Devido a isso, cientistas têm procurado desenvolver ensaios laboratoriais que permitam predizer com acurácia a fertilidade do sêmen. No entanto, tais objetivos têm sido difíceis de atingir, uma vez que grande parte dos problemas se encontra em diferentes atributos que o espermatozoide deve possuir para fertilizar o ovócito (ARRUDA et al., 2011).

A fertilização envolve um processo complexo (ÕURA; TOSHIMORI, 1990), sendo que para ser capaz de completar sua função, a célula espermática precisa, além de alcançar o local de fertilização, penetrar o ovócito e ativar o desenvolvimento embrionário (BRAUNDMEIER; MILLER, 2001).

Segundo Arruda et al. (2011), no momento da monta, o macho deposita bilhões de espermatozoides no fundo da vagina da fêmea, enquanto na inseminação artificial (IA), o sêmen com um número reduzido de espermatozoides é depositado diretamente no útero, ultrapassando a cérvice, onde os espermatozoides logo são expostos a uma série de ambientes distintos que alteram significativamente seu número e sua função espermática, sendo que alguns são perdidos do trato genital pelo movimento retrógrado (SAACKE et al., 1995; SARTORI, 2004), e outros chegam a atravessar o útero, passar pela junção útero-tubárica e na tuba uterina interagem com o epitélio e fertilizam o ovócito (BERGER, 1996; SARTORI, 2004). A qualidade do sêmen e sua relação com a fertilidade é um dos pontos mais importantes do sistema de produção (JANUSKAUSKAS et al., 2001).

De acordo com o Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), uma palheta de sêmen bovino é considerada apta para a comercialização e uso na IA quando apresenta pelo menos $10x10^6$ espermatozoides com motilidade progressiva, sendo ≥30 %, vigor ≥3 (escores de 0 a 5) e <30 % de defeitos morfológicos totais.

Testes que avaliam a qualidade seminal são realizados rotineiramente para determinar a aceitabilidade do sêmen (JANUSKAUSKAS et al., 2001), porém diante dos processos envolvidos na fertilização pode-se afirmar que até o momento nenhum teste isolado apresenta sensibilidade suficiente para predizer a fertilidade de uma amostra de sêmen. Entretanto, o exame de várias características pode determinar maior potencial de fertilidade (ARRUDA, 2000; VERSTEGEN et al., 2002; ARRUDA et al., 2004, 2005, 2006a,b, 2007; FREITAS-DELL´AQUA et al., 2009; ARRUDA et al., 2011). Esta avaliação é fundamental, uma vez que uma única partida de sêmen de um touro é composta por centenas de doses que serão utilizadas na IA de um grande número de fêmeas (AX et al., 2004).

Para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia e atividade metabólica normais (ARRUDA et al.,

2011). Esta qualidade depende então da integridade e função de todas as estruturas que compõem a célula espermática, como membrana plasmática, flagelo, mitocôndrias, acrossomo e cromatina, que permitem que o espermatozoide apresente motilidade para alcançar o local da fertilização, atravessar a zona pelúcida, se ligar à membrana plasmática do ovócito, fundir com o oolema e promover o desenvolvimento embrionário (YANAGIMACHI, 1994; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997; ARRUDA et al., 2004; CELEGHINI, 2005; GILLAN et al., 2005; ARRUDA et al., 2006b; CELEGHINI et al., 2010b; ARRUDA et al., 2011).

A motilidade, a concentração e a morfologia espermáticas são características avaliadas classicamente nas amostras de sêmen (GILLAN et al., 2005), mas estudos reportam que muitas técnicas utilizadas para este tipo de análise são imprecisas e influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores, mesmo quando executada por investigadores experientes, isso se deve ao fato de ser, em parte, de natureza subjetiva (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2004, 2005, 2006b; CELEGHINI, 2005; GILLAN et al., 2005; ARRUDA et al., 2011).

Com o propósito de obter técnicas que demonstrem maior repetibilidade tanto para avaliar a morfologia quanto a função espermática, diversos sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados nos últimos anos (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2002; CELEGHINI, 2005; MATOS et al., 2008; CELEGHINI et al., 2010a; ARRUDA et al., 2011).

Para que a inseminação artificial possa apresentar melhores resultados, são necessários estudos mais amplos sobre os vários aspectos relacionados à fisiologia da célula espermática e à melhoria dos testes aplicados para analisar a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides submetidos à refrigeração, congelação e descongelação, uma vez que os danos ocasionados pela criopreservação causam prejuízos das funções celulares, resultando em redução da fertilidade (ARRUDA et al., 2011). A descoberta de uma variedade de fluorocromos e compostos conjugados com sondas fluorescentes tornou possível esta análise mais amplas da qualidade do sêmen, em nível bioquímico ultra estrutural e funcional (GILLAN et al., 2005).

A maioria dos ensaios funcionais tem sido desenvolvida por coloração dos espermatozoides com fluorocromos de interesse e examinando as células sob microscopia de fluorescência para verificar a precisão do parâmetro a ser avaliado (GILLAN et al., 2005). Técnicas de marcações específicas para os diversos compartimentos do espermatozoide têm sido desenvolvidas (ANDRADE et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007a, b, 2010a, b),

empregando estes corantes fluorescentes (sondas fluorescentes ou fluorocromos) aumentando a possibilidade de análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides (CELEGHINI, 2005; CELEGHINI et al., 2010a).

A avaliação da membrana plasmática espermática é fundamental, já que sua integridade é um pré-requisito para sua homeostase e para que ocorram os eventos fisiológicos relacionados ao processo de fertilização, que incluem ligação à zona pelúcida, capacitação espermática, reação acrossomal e fusão dos gametas (PAPA et al., 2000; ARRUDA et al., 2007). Para avaliar esta integridade tem sido utilizada a sonda fluorescente iodeto de propídio (PI), que apresenta afinidade ao DNA e cora o núcleo espermático em vermelho quando a membrana plasmática apresenta-se danificada (JONES; SENFT, 1985; GARNER et al., 1986; GRAHAM et al., 1990). Trata-se de um corante muito estável, bastante utilizado para microscopia de epifluorescência (GARNER et al., 1997; SUKARDI et al., 1997; THOMAS et al., 1997; CELEGHINI et al., 2007a, 2008), e para citometria de fluxo (GARNER et al., 1986; GRAHAM et al., 1990; PINTADO et al., 2000; ARRUDA et al., 2003), além de ser de fácil preparação e aplicabilidade, podendo ser utilizado isoladamente ou em associação a outras sondas (ARRUDA et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007a).

O Hoechst 33342 (H342) também apresenta especificidade ao DNA, sendo usado como um contra-corante na determinação de integridade da membrana plasmática (CELEGHINI et al., 2007a). Quando associado à outra sonda de coloração distinta, como o PI, por exemplo, atua como marcador de membrana plasmática intacta (MAXWELL et al., 1997), emitindo fluorescência azul (CELEGHINI, 2005).

Além da integridade das membranas espermáticas, outras estruturas também são importantes para que o processo de fertilização ocorra, assim, a associação de outras sondas fluorescentes com o intuito de avaliar simultaneamente várias estruturas espermáticas vem sendo realizadas, como para avaliar membranas plasmática e acrossomal e a função mitocondrial, o que corrobora o aumento da acurácia da análise do sêmen, fornecendo maior número de dados para a determinação da porcentagem de células espermáticas com capacidade para fertilizar o ovócito na amostra (CELEGHINI, 2005).

A integridade do acrossomo pode ser verificada por diferentes técnicas de fluorescência (THOMAS et al., 1997), sendo mais frequente o uso de marcadores de glicoproteínas, como as lecitinas (GRAHAM et al., 1990). Mais especificamente, a aglutinina do *Pisum sativum* (PSA), conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (CROSS; MEIZEL, 1989; HOLDEN et al., 1990). O PSA é uma aglutinina extraída da ervilha, que se liga a glicoconjugados da matriz acrossomal (CROSS; MEIZEL, 1989), tem afinidade às

terminações α-D-glicosil e resíduos α-D-manosil de glicoproteínas, se ligando especificamente ao açúcar α-manosidase encontrado nos conteúdos acrossomais (CROSS et al., 1986). Esta aglutinina, quando ligada ao FITC, marca o acrossoma espermático danificado em verde-amarelado (CROSS et al., 1986; GRAHAM et al., 1990; SILVA; GADELLA, 2006; CELEGHINI et al., 2007a), e a ausência da fluorescência indica que o acrossomo está intacto (SILVA; GADELLA, 2006).

A função mitocondrial representa a viabilidade espermática a respeito da produção de energia em forma de ATP, que possibilita os batimentos do flagelo (COSSON, 1996), de modo que essa função está relacionada com a motilidade (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003). O iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), tem sido utilizado como medida sensível para detectar mudanças no potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides em várias espécies (GARNER et al., 1997; GRAVANCE et al., 2000; ANDRADE et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007a,b, 2008; NASCIMENTO et al., 2008). O JC-1 possui a habilidade de diferenciar as mitocôndrias coradas com alto ou baixo potencial de membrana, emitindo fluorescência vermelho-alaranjada e verde, respectivamente (REERS et al., 1991).

A associação de iodeto de propídio (PI), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA) e MitoTracker Green FM® (MITO), resultou em marcações bastante consistentes dos espermatozoides bovinos, tornando fácil a identificação das estruturas (CELEGHINI et al., 2007a). Esta mesma técnica, com uma pequena alteração, foi validada para espermatozoides de equinos (CELEGHINI et al., 2010a), suínos (ANDRADE et al., 2007), ovinos (CELEGHINI et al., 2010b) e de aves (CELEGHINI et al., 2007b). Neste sentido, buscando aperfeiçoar a técnica, outros dois protocolos foram desenvolvidos e validados para o sêmen bovino, um associando PI, Hoescht 33342 (H342), FITC-PSA e CMXRos, e outro associando PI, H342, FITC-PSA e JC-1, e apresentaram resultados bastante consistentes. Maior destaque deve ser dado ao protocolo que utilizou JC-1 para avaliar a função mitocondrial, visto que este foi capaz de separar duas populações de células por códigos de cores, com alto (vermelho-alaranjado) e baixo (verde) potencial de membrana (CELEGHINI et al., 2007a).

Tartaglione e Ritta (2004), em testes *in vitro*, verificaram que a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal apresentaram maior correlação com a taxa de fertilização do que a motilidade e a morfologia espermáticas. Os mesmos autores observaram que a combinação do corante eosina/nigrosina com o teste hiposmótico apresentou 78% de correlação com a taxa de fertilidade *in vitro*. Quando esses resultados

foram incluídos no modelo de regressão juntamente com os resultados de Trypan blue/Giemsa, que avalia integridade das membranas plasmática e acrossomal, este coeficiente aumentou para 82,4%, sugerindo que quanto maior o número de análises realizadas, maior a capacidade em predizer a fertilidade.

Porém, Brito et al. (2003) não encontraram correlação significativa entre taxa de fertilização *in vitro* e integridade de membrana plasmática em bovinos, pelas técnicas de eosina/nigrosina, Trypan blue/Giemsa, CFDA/PI, SYBR-14/PI e teste hiposmótico. Já Alm et al. (2001) observaram correlação significativa (P = 0,016), mas baixa (r = 0,05) entre fertilidade e viabilidade espermática, detectada pelo PI em um ensaio fluorimétrico automatizado.

As correlações entre fertilidade a campo e espermatozoides com membrana plasmática lesada, detectada por PI, foram negativas entre partidas (r = -0,39) e touros (r = -0,57) de acordo com Januskauskas et al. (2001), que acrescentam correlações positivas entre fertilidade e espermatozoides com membrana plasmática intacta, avaliadas por H258, observadas entre partidas (r = 0,50) e touros (r = 0,58). Resultados similares foram observados por Januskauskas et al. (2003), que encontraram correlação significativa (P<0,05) entre fertilidade a campo após IA com sêmen criopreservado bovino, pela observação da taxa de não retorno ao estro aos 56 dias, e espermatozoides com membrana plasmática lesada, positivas ao PI, sobre partidas de sêmen (r = -0,40) e sobre touros (r = -0,56). Anzar et al. (2002) também observaram correlação negativa entre fertilidade a campo e espermatozoides corados com PI (r = >-0,87), em sêmen fresco bovino.

A técnica validada por Celeghini et al. (2007a) apresenta resultados bastante satisfatórios sobre o *status* das membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides bovinos, utilizando metodologia prática para aplicação comercial; todavia, um teste de fertilidade seria de grande valia para definir se tal técnica reflete o potencial fertilizante do sêmen, além de permitir estabelecer o número mínimo de espermatozoides viáveis, determinados por esta técnica, que seriam necessários em uma dose inseminante para obter fertilização.

Estudos que investiguem as interações entre qualidade do sêmen e o processo inflamatório pós-inseminação em bovinos não foram encontrados, o que torna importante estudar esses aspectos e seus efeitos sobre a fertilidade.

Experimento 1

3 EXPERIMENTO 1

3.1 OBJETIVOS

Este experimento foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

1. Comparar as técnicas de lavagem uterina e escova ginecológica para a colheita de amostra para citologia uterina quatro horas após a inseminação artificial.

2. Estudar os efeitos das técnicas de lavagem uterina e escova ginecológica sobre a hemodinâmica uterina em bovinos por ultrassonografia Doppler colorida.

3.2 HIPÓTESES

Com base na literatura foram elaboradas as seguintes hipóteses em relação à comparação das técnicas de colheita de material para citologia uterina após a inseminação artificial:

1. A técnica de lavagem uterina é mais eficiente para a colheita de amostra uterina, permitindo maior quantidade e melhor qualidade da amostra, com maior representatividade do ambiente uterino, quando comparada com a técnica de escova ginecológica.

2. A escova ginecológica apresenta menor efeito sobre o ambiente uterino, gerando menor fluxo sanguíneo uterino após a realização da técnica de coleta.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

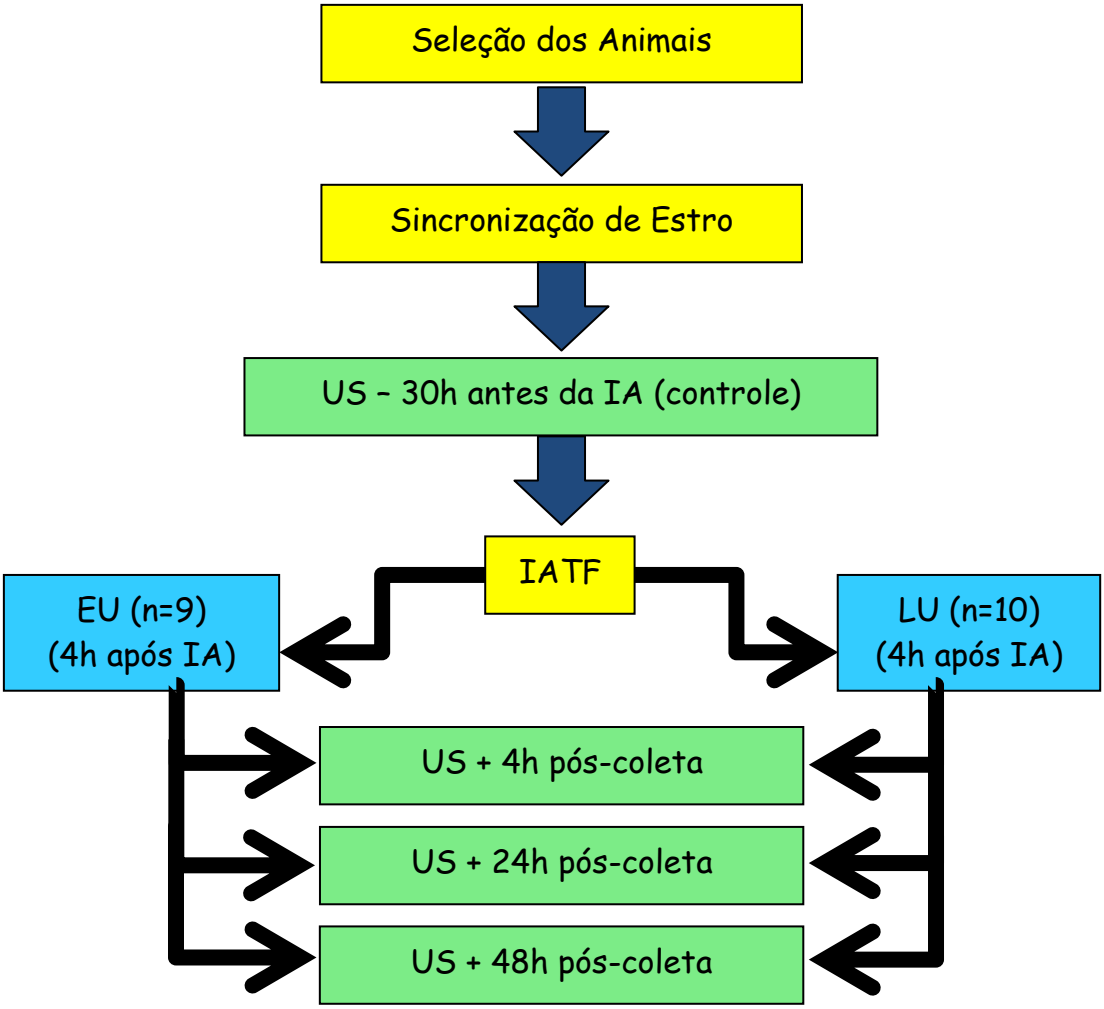
Este experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no Campus de Pirassununga, no período de 29 de novembro de 2010 a 14 de janeiro de 2011.

3.3.1 Esquema experimental e divisão dos grupos

Depois de avaliados os critérios de seleção, os animais foram divididos em dois grupos experimentais de acordo com a técnica utilizada para colheita de material uterino para a citologia endometrial quatro horas após a IA (Figura 1): Grupo EU (n=9), animais submetidos à colheita de amostra por meio de escova ginecológica e Grupo LU (n=10), animais submetidos à coleta de amostra por lavagem uterina com solução fisiológica (0,9% de cloreto de sódio).

Os animais de ambos os grupos foram submetidos à avaliação ultrassonográfica nos modos espectral e Doppler colorido em quatro momentos: 34 horas antes da coleta de material (-34h) e 4 (4h), 24 (24h) e 48 (48h) horas após a coleta de material uterino.

Figura 1 - Esquema experimental: os animais selecionados foram divididos em grupos de acordo com o procedimento de coleta uterina, *swab* uterino (EU, n=9 animais) e lavagem uterina (LU, n=10 animais), sincronização do estro e da ovulação, examinados por ultrassonografia Doppler 30 horas antes da IATF, inseminados artificialmente, submetidos à coleta de amostra uterina por lavagem ou *swab* 4 horas após IA, e reavaliados por ultrassonografia Doppler 4, 24 e 48 horas após os procedimentos de coleta



Fonte: (THOMÉ, 2013)

3.3.2 Seleção dos animais

Foram utilizadas 19 vacas entre 30 e 50 dias pós-parto, da raça Nelore, avaliadas previamente quanto aos escores uterino (Quadro 1), ovariano (Quadro 2), e escore de condição corporal (Quadro 3).

Quadro 1 - Classificação do escore uterino de 1 a 3, utilizada para a seleção dos animais (informação verbal)[1]

Escore Uterino	Características
1	Útero com involução completa, sem líquido, com bom potencial para desenvolver nova gestação.
2	Útero com pequena quantidade de líquido em sua luz, ainda com involução incompleta e apresentando-se pouco distendido.
3	Útero com líquido em sua luz, podendo apresentar algum tipo de infecção, apresenta-se distendido e sem involução.

Quadro 2 - Classificação do escore ovariano de 1 a 3, de acordo com Madureira e Pimentel (2005), utilizada para a seleção dos animais

Escore Ovariano	Características
1	Ovário com diâmetro maior que 30 mm, com folículos em crescimento com diâmetro maior que 8,5 mm na presença de um corpo lúteo ou folículos maiores que 12 mm na ausência de corpo lúteo.
2	Ovário menor que 30 mm, com folículos entre 5 e 8,5 mm.
3	Ovário com diâmetro menor que 12 mm, com folículos que apresentavam até 5 mm de diâmetro.

Quadro 3 - Classificação do escore de condição corporal (ECC) de 1 a 9, de acordo com Spitzer (1986), utilizada para a seleção dos animais

ECC	Característica da vaca
1	Extremamente magra, sem nenhuma gordura detectável entre as vértebras e costelas, com as extremidades ósseas muito aparentes.
2	Muito magra, com as extremidades ósseas menos aparentes, apresentando pequena cobertura de gordura.
3	Magra, com as costelas ainda perceptíveis e alguma cobertura de gordura sobre o coxal.
4	Costelas e vértebras mais recobertas de camadas de gordura.
5	Boa aparência geral, com maior cobertura de gordura sobre as costelas e vértebras.
6	Boa aparência geral, que apresentava bastante gordura palpável sobre as costelas e ao redor da inserção da cauda.
7	Aparência gorda e com grande quantidade de gordura sobre as costelas.
8	Muito gorda, com grande depósito de gordura sobre as costelas, na inserção de cauda e abaixo da vulva.
9	Obesa, estrutura óssea não está aparente e é difícil de senti-la.

[1] Citado por Madureira e Maturana Filho em Pirassununga, 2010.

Animais que apresentaram escores uterino e/ou ovariano 3 não foram utilizados no experimento. Nenhum dos animais avaliados no experimento apresentou escore de condição corporal inferior a 4 ou superior a 7.

3.3.3 Inseminação artificial em tempo fixo

Todas as vacas selecionadas foram submetidas a um protocolo de sincronização do estro e da ovulação, que consistiu na colocação de um implante subcutâneo contendo 3 mg de norgestomet (Crestar®), mais a aplicação intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®). Após 8 dias, o implante de progestágeno foi retirado, e administrado 1 mg de benzoato de estradiol, 0,5 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio®) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (Novormon®). A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) foi realizada após 30 horas.

Foi utilizado sêmen de um touro previamente avaliado, com um total de 15,625 x 10^6 espermatozoides por palheta, 57% de motilidade total, 41,25% de motilidade progressiva (avaliadas pelo sistema computadorizado de análise do sêmen - CASA) e 25% de defeitos totais (analisados pela técnica da câmara úmida, sob microscopia de contraste de interferência diferencial, em aumento de 1.000x).

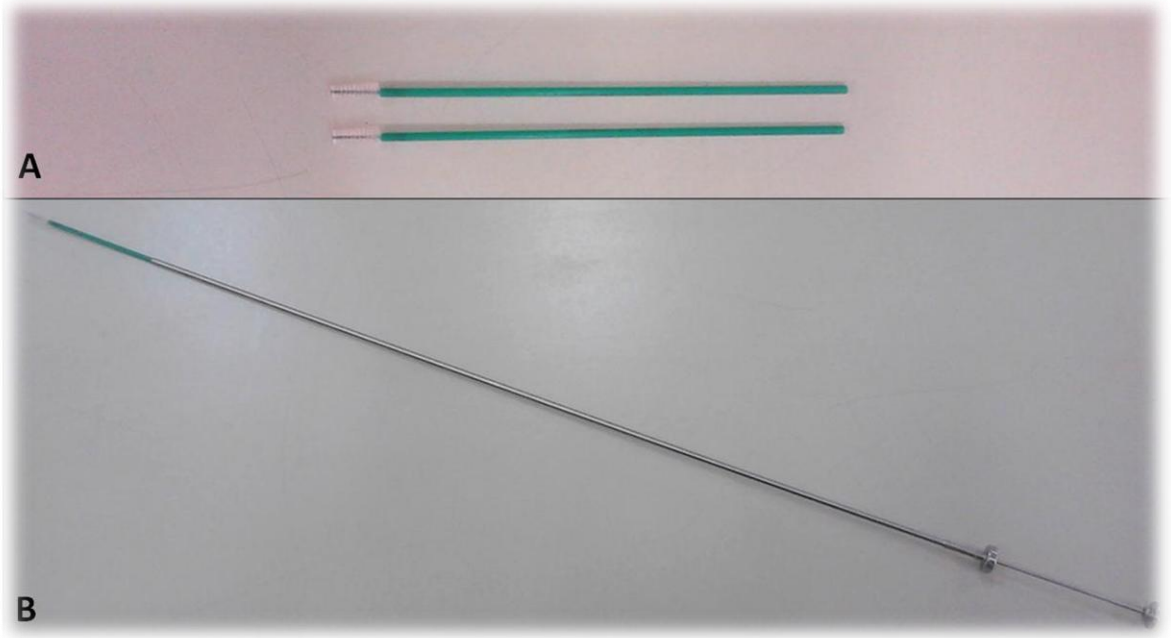
Todas as vacas passaram por higienização da região perineal com água e sabão, o sêmen foi descongelado a 37ºC, por 30 segundos, e os animais inseminados por um único inseminador experiente, com o objetivo de minimizar variação da técnica.

3.3.4 Avaliação citológica uterina com escova ginecológica (EU)

O grupo EU (n=9) foi submetido à colheita de amostra do ambiente uterino 4 horas após a inseminação artificial por meio da utilização de escova ginecológica. Para a realização deste procedimento, foram necessárias algumas adaptações, a escova ginecológica foi cortada com cerca de 5 cm de comprimento, adaptada a um mandril em aço inoxidável sólido de 65 cm e colocado em um tubo de aço inoxidável de 50 cm de comprimento e 5 mm de

diâmetro (Figura 2), para permitir a introdução uterina sem que houvesse prévio contato a qualquer outra estrutura. Foi realizada higienização perivulvar e o aparelho foi introduzido na vagina, protegido com a utilização de camisa sanitária para evitar contaminação. Imediatamente antes da passagem cervical, a camisa sanitária foi rompida. Após a passagem da cérvice, a escova foi exposta, colocada em contato com o endométrio, guiado via palpação retal, e a amostra endometrial colhida através da rotação da escova ginecológica em sentido horário, a escova ginecológica foi retraída ao tubo inoxidável e removida do útero.

Figura 2 – A) Escova ginecológica utilizada para obtenção de amostra endometrial; B) Escova acoplada em mandril e tubo inoxidável para não permitir contato prévio com vagina e cérvice



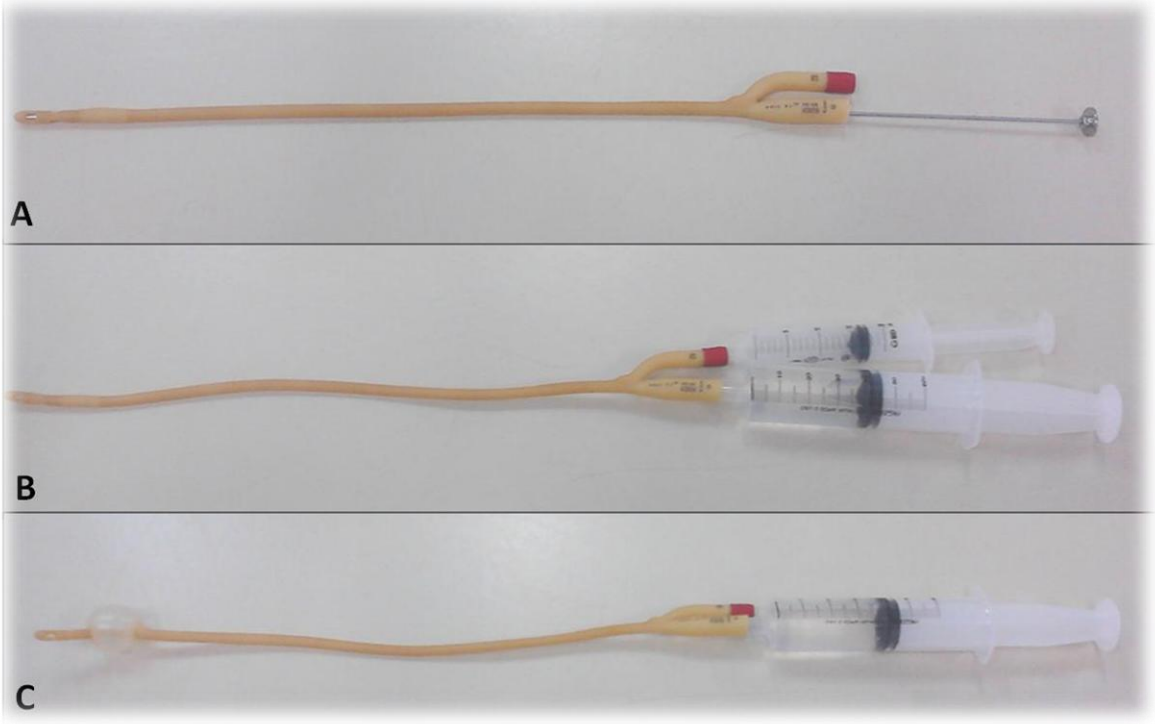
Fonte: (THOMÉ, 2013)

A escova ginecológica foi desacoplada do mandril e lavada em 10 mL de solução fisiológica em tubo cônico (15 mL). Este material foi centrifugado (Sorvall® – Mod. RC3B+Plus), concentrado e colocado em lâmina com extremidade fosca por meio do uso de citocentrífuga (Presvac, CT12) (1000 rpm/10 minutos), utilizando 100 e 200 µL para confecção das lâminas.

3.3.5 Avaliação citológica por lavagem uterina com solução salina (LU)

O grupo LU (n=10) foi submetido à colheita de amostra citológica do ambiente uterino por meio de lavagem uterina com solução fisiológica. A lavagem foi realizada com a deposição de 60 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% no interior do útero, com uma seringa (60 mL) acoplada a uma sonda de *Folley* (Sonda *Folley* Silicinizada Rush Amber 6.0 mm estéril), introduzida com o auxílio de um mandril em aço inoxidável de 65 cm de comprimento (Figura 3). Após a introdução da sonda, o balonete foi inflado com cerca de 13 mL de ar, o mandril retirado, a seringa acoplada à sonda de *Folley*, a solução infundida e o útero massageado por 10 segundos, e, logo em seguida o líquido foi recuperado do útero por aspiração com pressão negativa dentro da seringa, mensurado e transferido para tubos cônicos de 50 mL. As amostras foram centrifugadas (Sorvall® – Mod. RC3B+Plus), concentradas, e duas frações de 100 e 200 µL colocadas em citocentrífuga (Presvac, CT12) (1500 Rpm/5minutos), para confecção das lâminas.

Figura 3 – A) Sonda *folley* acoplada ao mandril para auxílio para introdução uterina; B) Sonda *folley* acoplada a seringa com ar para inflar o balonete e seringa com solução fisiológica para lavagem uterina; C) Destaque para sonda *folley* com balonete inflado



Fonte: (THOMÉ, 2013)

3.3.6 Coloração e leitura das lâminas

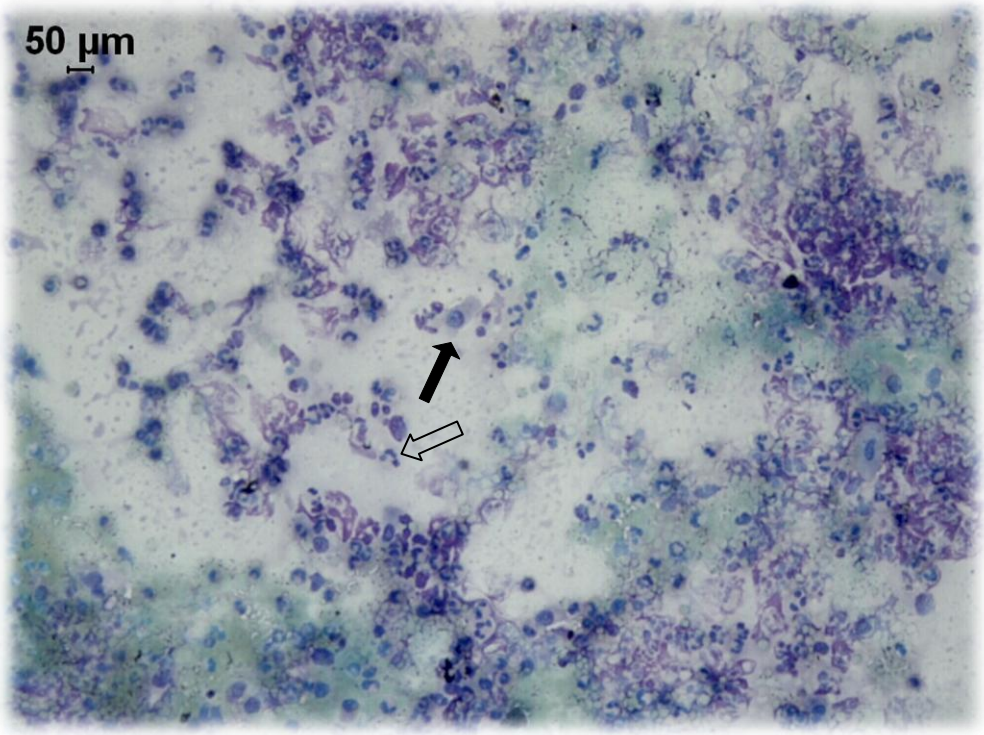
As lâminas obtidas por EU ou LU foram fixadas em álcool metílico (Synth), coradas por Giemsa modificado (Giemsa's Azure Eosin Methylene Blue Soluction® – Merck Millipore Brazil) por 30 minutos e montadas com resina sintética (Permaunt®) e lamínula. A avaliação citológica consistiu em leitura panorâmica da lâmina e escolha do campo para efetuar a contagem de 300 células nucleadas (endometriais e inflamatórias). Esta leitura foi realizada em microscópio óptico Leica® DM 2000 (Leica, USA), em aumento de 200x, sendo determinada a porcentagem de células polimorfonucleares (PMN) presentes no material.

As lâminas obtidas por lavagem uterina (LU) e escova ginecológica (EU) foram analisadas em busca do número de células inflamatórias (PMN) e células endometriais presentes na amostra (Figura 4), limitando-se a contagem de 300 células nucleadas no total, sendo calculada a porcentagem de células inflamatórias encontradas (relação entre PMN e total de células contadas) e classificadas de acordo com Williams et al. (1998) adaptado (Quadro 4).

Quadro 4 - Classificação da resposta inflamatória uterina de acordo com a porcentagem de células inflamatórias polimorfonucleares encontradas na amostra, adaptada a proposta por Williams et al. (1988)

GRAU	PORCENTAGEM DE POLIMORFONUCLEARES
0 – Normal	Contagem inferior a 5% de polimorfonucleares
1 – Discreto	Contagem entre 5 a 25% de polimorfonucleares
2 – Moderado	Contagem entre 25 a 75% de polimorfonucleare
3 – Acentuado	Contagem superior a 75% de polimorfonucleares

Figura 4 - Amostra citológica obtida por lavagem uterina com solução fisiológica, para avaliação da celularidade presente. Observa-se a presença de células epiteliais uterinas (endometriais) com núcleo redondo e citoplasma abundante (seta fechada), e grande quantidade de células inflamatória compostas principalmente por polimorfonucleares (neutrófilos) (seta aberta). Gienmsa modificado, 200x



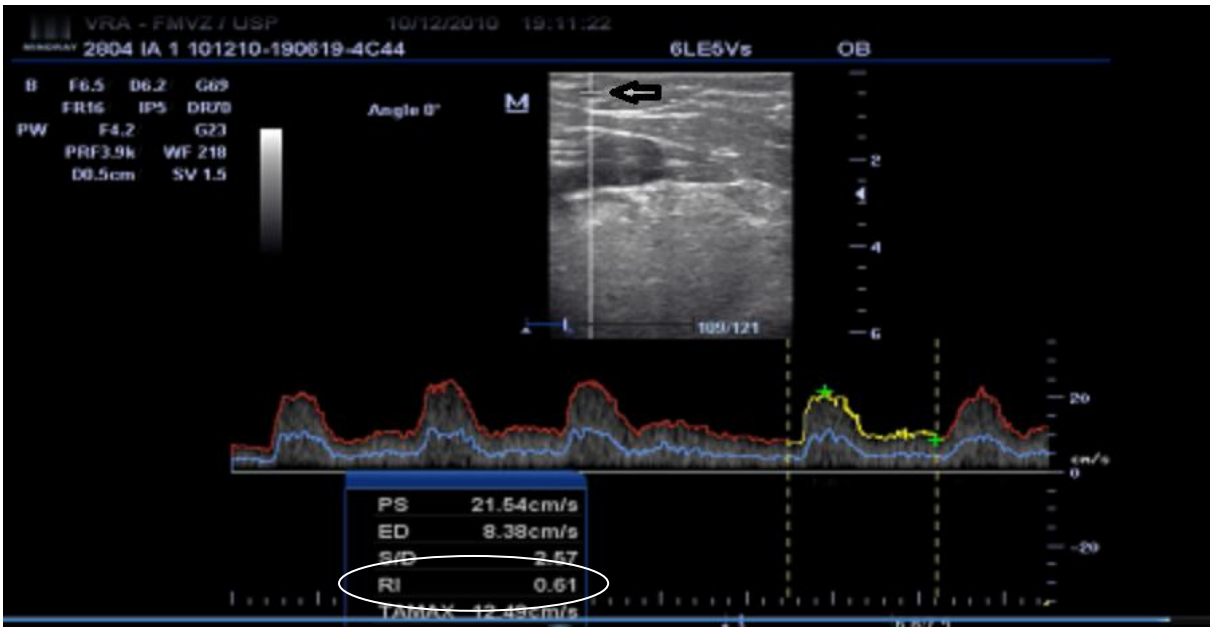
Fonte: (THOMÉ, 2013)

3.3.7 Hemodinâmica uterina por ultrassom Doppler colorido

A hemodinâmica uterina foi avaliada utilizando um aparelho de ultrassonografia Doppler (M5vet, Mindray®, China), com probe linear transretal (6,5 mHz), nos modos espectral e Doppler colorido, em quatro períodos: 34 horas antes dos procedimentos de lavagem uterina ou escovado uterino (ou seja, 30 horas antes da IA, considerado exame controle), assim como quatro, 24 e 48 horas após a colheita do material.

O modo espectral foi utilizado para a avaliação do fluxo sanguíneo das artérias uterinas de forma objetiva. A localização das artérias uterinas para seu escaneamento foi realizada de acordo com Bollwein et al. (2000). O dado utilizado para a avaliação foi o índice de resistência (RI) das artérias uterinas direita (AD) e esquerda (AE), como exemplificado na figura 5.

Figura 5 - Imagem ultrassonográfica obtida por exame transretal de uma fêmea bovina, com probe linear (6,5 mHz), na qual se observa um corte transversal da artéria uterina (indicado pela seta) e gráfico gerado utilizando o modo espectral do aparelho M5vet, Mindray. A linha vermelha indica a velocidade máxima dos ciclos cardíacos formados pelo fluxo sanguíneo da artéria uterina, a linha azul indica a velocidade média dos ciclos cardíacos formados pelo fluxo sanguíneo da artéria uterina e a linha amarela é a onda do ciclo cardíaco selecionada pelo aparelho para que seja calculado o valor do índice de resistência (RI) (elipse), pico sistólico (PS), final diastólico (ED), relação entre sístole e diástole (S/D) e taxa de velocidade máxima (TAMAX). Em verde, a estrela indica o pico sistólico e a cruz o final diastólico da onda selecionada para avaliação

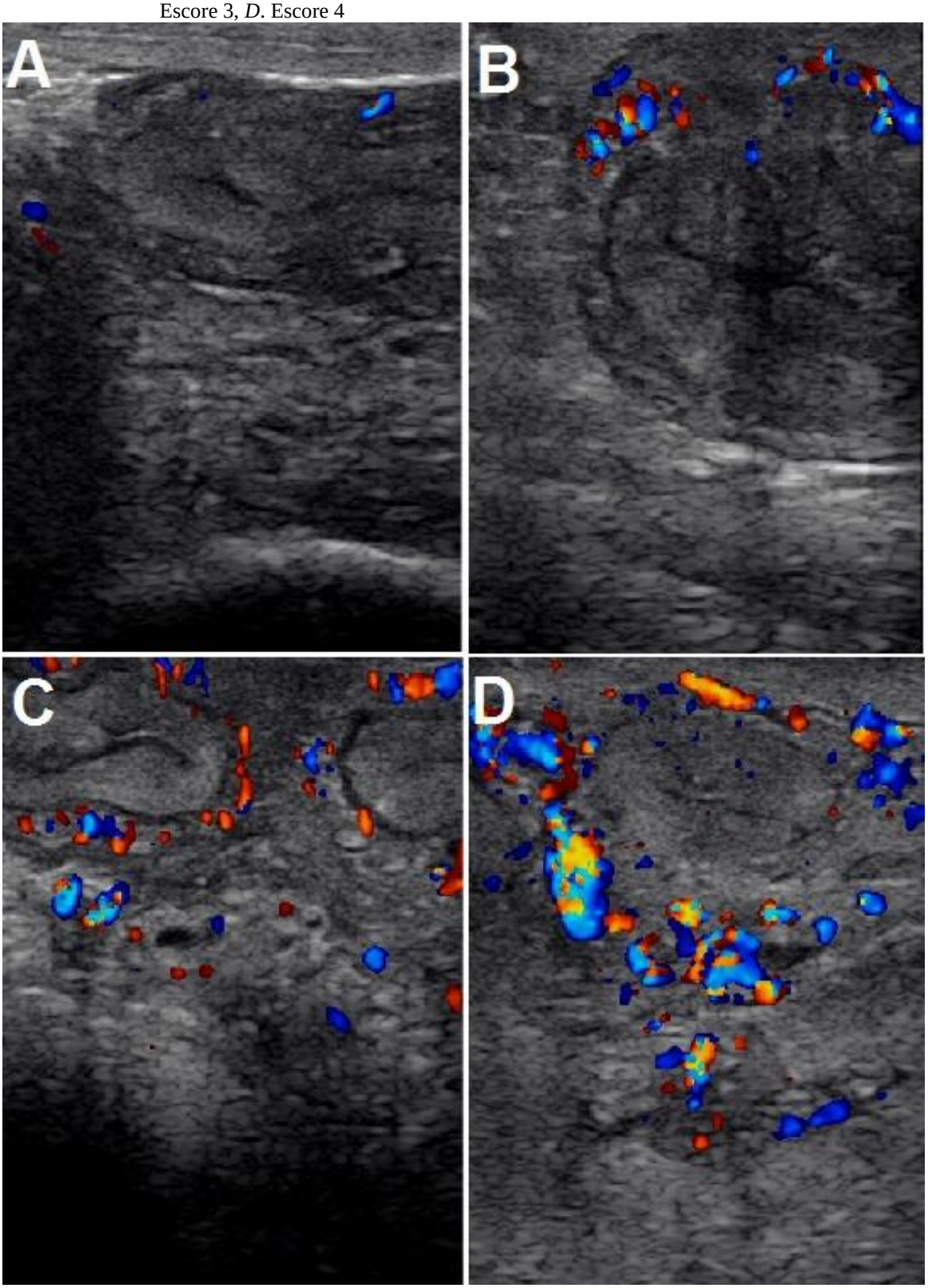


Fonte: (OLIVEIRA, 2012).

O exame foi realizado até que fossem obtidas, no mínimo, nove ondas semelhantes do ciclo cardíaco. Os dados foram salvos e a avaliação dessas ondas foi realizada de modo que a cada três ondas semelhantes formadas, o valor de RI da onda mediana era anotado e somado as outras duas ondas medianas dos próximos ciclos.

O modo Doppler colorido foi utilizado para a avaliação subjetiva da vascularização dos cornos uterinos, seguindo os critérios de Silva et al. (2010), sendo classificada em escores de 0 a 4, de acordo com a imagem obtida de cada corno uterino (Figura 6), com 0 (zero) referente a ausência de vascularização e 4 (quatro) à vascularização máxima. As imagens foram gravadas e analisadas por dois avaliadores. Para a análise estatística utilizou-se a média das duas avaliações. Para a obtenção das imagens foi realizado o escaneamento dos cornos uterinos direito (CD) e esquerdo (CE), de modo a obter a imagem de um corte transversal com a probe localizada na metade de cada corno uterino.

Figura 6 - Imagem ultrassonográfica do corte longitudinal (6,5 mHz) do corno uterino bovino para a avaliação subjetiva da vascularização dos cornos uterinos, em modo Color Doppler do aparelho M5vet, Mindray, classificada em escores de 0 a 4. *A*. Escore 1, *B*. Escore 2, *C*. Escore 3, *D*. Escore 4



Fonte: (OLIVEIRA, 2012).

Posteriormente, para a análise estatística, os dados utilizados da avaliação da hemodinâmica foram as médias do índice de resistência (RI) das artérias uterinas direita e esquerda e do escore de vascularização (EV) dos cornos uterinos direito e esquerdo.

3.3.8 Análise estatística

Com relação ao exame citológico por escova ginecológica ou lavado, para avaliação das porcentagens de neutrófilos em relação ao total de células avaliadas, segundo o momento de colheita (Blocos) e os grupos comparativos (EU e LU), foi utilizado um Modelo Linear Generalizado, pressupondo distribuição Binomial da variável dependente (número de neutrófilos/total de células avaliadas) e função de ligação logística relacionando a variável dependente à parte sistemática do modelo estatístico. As análises foram realizadas por meio do procedimento PROC GENMOD do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3 (SAS, 1995).

Já para os dados obtidos pela ultrassonografia Doppler foram comparados os valores médios do índice de resistência (RI) das artérias uterinas e a média dos escores de vascularização dos cornos uterinos (EV) em relação a cada momento da análise (-34, 4, 24 e 48 horas do procedimento, EU ou LU). Para essas análises, adotou-se um modelo estatístico misto que contemplou os efeitos fixos de grupos (EU e LU), momento (-34, 4, 24 e 48 horas) e interação grupos x momentos, além dos efeitos aleatórios de animal e resíduo. Nestas análises considerou-se que as mensurações de RI e EV foram realizadas nas mesmas unidades experimentais, caracterizando estrutura de medidas repedidas. Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.2 (SAS, 2005), utilizando os procedimentos PROC FREQ, PROC MEANS e PROC MIXED.

3.4 RESULTADOS

Os resumos das análises das variâncias para as variáveis porcentagens de células inflamatórias, considerando os efeitos principais de grupos comparativos e tempos de avaliação, para a variável média de RI, considerando os efeitos principais de grupos e tempos

de avaliação, para a variável média de EV, considerando os efeitos principais de grupos e tempos de avaliação, encontram-se no apêndice A.

3.4.1 Comparação entre as técnicas EU e LU

Foi observado que o material colhido por escova ginecológica apresentou celularidade suficiente para contagem em 89 % das amostras (8 de 9 animais), sendo que apenas uma amostra (11 %) não atingiu a contagem de 300 células, porém esta também foi incluída na porcentagem de células inflamatórias para análise estatística. Em relação ao material recolhido por lavagem uterina após a infusão de 60 mL de solução fisiológica, constatou-se que o volume médio recuperado foi de 45 mL, com variação entre 30 e 55 mL, e cerca de 80 % das amostras recolhidas apresentaram celularidade suficiente para contagem (8 de 10 animais), as demais 20 % não atingiram 300 células, mas foram contadas e incluídas na análise, ajustando a porcentagem de células inflamatórias.

A porcentagem de neutrófilos encontrada na citologia uterina nas diferentes técnicas está apresentada na tabela 1. Pela técnica de LU foi obtida maior ($P<0,005$) porcentagem de neutrófilos (12,51 ± 0,67 %) do que pela técnica de EU (1,24 ± 0,22 %).

Tabela 1 - Média (±EPM) da porcentagem de neutrófilos encontrada na citologia uterina pelas técnicas de escova ginecológica (EU) e lavado uterino (LU), quatro horas após a inseminação artifical

Grupo	**Neutrófilos (%)**
EU	1,24 ± 0,22[b]
LU	12,51 ± 0,67[a]

Notas: [a,b]Letras diferentes indicam diferença estatística pelo Teste F ($P<0,05$).

De acordo com adaptação da classificação proposta por Williams et al. (1988), dos 19 animais avaliados por EU e LU, 73,7 % (14 animais) apresentaram porcentagem de células inflamatórias polimorfonucleares inferior a 5 % na amostra obtida, sendo consideradas com ambiente uterino normal; 15,8 % (3 animais) possuíam porcentagem de PMN entre 5 a 25 % sendo considerado processo inflamatório discreto; e 10,5 % (2 animais) apresentaram porcentagem de PMN entre 25 a 75 %, considerado processo inflamatório moderado. Não foi observado nenhum animal com porcentagem de células inflamatórias superior a 75 %, considerado como processo inflamatório severo.

Quando avaliados separadamente, todos os animais (100%) submetidos ao exame citológico por escova ginecológica apresentaram porcentagem de células inflamatórias polimorfonucleares inferior a 5 %, sendo considerados com o ambiente uterino normal. Já em relação aos animais submetidos à lavagem uterina, 50 % apresentaram porcentagem abaixo de 5 % de células inflamatórias PMN, 30 % entre 5 e 25 % e 20 % entre 25 a 75 %.

3.4.2 Efeitos das técnicas EU e LU sobre a hemodinâmica uterina

A comparação da hemodinâmica uterina avaliada pelo índice de resistência (RI) e escores vasculares (EV) em relação às técnicas de lavagem uterina (LU) e escovado endometrial (EU) está apresentada nas tabelas 2 e 3, e pode se notar que não foram observadas diferenças (P>0,05) entre as técnicas.

Tabela 2 - Médias (±EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas obtidas por ultrassonografia Doppler nas técnicas de escova ginecológica (EU) e lavado uterino (LU), nos diferentes tempos de avaliação

Tempo em relação ao procedimento	**RI (0 – 1)**	
	EU	**LU**
-34 horas	0,6606 ± 0,03718^{A,b}	0,6980 ± 0,03527^{A,ab}
4 horas	0,6906 ± 0,03718^{A,b}	0,6620 ± 0,03527^{A,b}
24 horas	0,7167 ± 0,03718^{A,ab}	0,7795 ± 0,03527^{A,a}
48 horas	0,8156 ± 0,03718^{A,a}	0,7855 ± 0,03527^{A,a}

Notas: ^{A,B} letras maiúsculas diferentes sobre as médias na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05)
^{a,b} letras minúsculas diferentes sobre as médias na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05)

Nesta avaliação, considerando a divisão dos grupos, observa-se que os menores valores de RI foram obtidos no momento -34 horas para o grupo EU e 4 horas após o procedimento para o grupo LU. Pode-se notar também que para os animais do grupo EU houve aumento progressivo no índice de resistência vascular uterino acompanhando os momentos de colheita e pós colheita, indicando diminuição do fluxo sanguíneo dos vasos uterinos, havendo diferença (P<0,05) apenas entre os momentos -34 e 4 horas em relação ao momento 48 horas após a colheita. Já para o grupo LU, o momento de 4 horas após a coleta teve seu menor índice de resistência vascular, diferindo (P<0,05) somente dos momentos de

24 e 48 horas após a coleta.

Tabela 3 - Média (±EPM) do escore de vascularização (EV) uterino obtida por ultrassonografia Doppler nas técnicas escova ginecológica (EU) e lavada uterino (LU), nos diferentes tempos de avaliação

Tempo em relação ao procedimento	**EV (0 – 4)**	
	EU	**LU**
-34 horas	2,3611 ± 0,1594^{A,a}	2,1500 ± 0,1512^{A,a}
4 horas	2,2778 ± 0,1594^{A,a}	2,1250 ± 0,1512^{A,a}
24 horas	2,0278 ± 0,1594^{A,ab}	1,8750 ± 0,1512^{A,ab}
48 horas	1,7222 ± 0,1594^{A,b}	1,6250 ± 0,1512^{A,b}

Notas: ^{A,B} letras maiúsculas diferentes sobre as médias na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05)
^{a,b} letras minúsculas diferentes sobre as médias na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05)

Ao avaliar o escore vascular, pode-se inferir que os maiores valores, representando a maior vascularização, foram encontrados no momento de -34 horas em ambos os grupos (EU e LU), sendo semelhante a 4 horas após o procedimento, os quais diferiram (P<0,05) do momento 48 horas somente.

Como não foram observados efeitos de grupos (EU e LU) e nem interação (Grupo X Tempo), os grupos foram desconsiderados para se avaliar o efeito de tempo. Houve diferença significativa em relação aos momentos de coleta das amostras para o RI das artérias uterinas e para o escore de vascularização (EV) uterina, conforme detalhado na tabela 4.

Tabela 4 - Média (±EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas e escore de vascularização (EV) uterina obtida por ultrassonografia, respectivamente nos modos espectral e Doppler colorido

Tempo em relação ao procedimento	**RI (0 – 1)**	**EV (0 – 4)**
-34 horas	0,6793 ± 0,2562^{b}	2,2556 ± 0,1099^{a}
4 horas	0,6763 ± 0,2562^{b}	2,2014 ± 0,1099^{a}
24 horas	0,7481 ± 0,2562^{a,b}	1,9514 ± 0,1099^{a,b}
48 horas	0,8005 ± 0,2562^{a}	1,6736 ± 0,1099^{b}

Notas: ^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05).

Foi observada maior vascularização nos momentos -34 e 4 horas em relação ao procedimento, demonstradas tanto pelo mais baixo valor de RI e maior valor de EV em comparação ao momento 48 horas após o procedimento, não havendo diferença entre estes momentos e 24 horas.

3.5 DISCUSSÃO

Estudos vêm sendo realizados por Leblanc et al. (2002); Kaimanickam et al. (2005a); Gilbert et al. (2005); Hammon et al. (2006); Willians et al. (2007) e Santos et al. (2009), e outros autores, investigando a técnica de citologia uterina por escova ou lavado como métodos de diagnóstico de endometrite em vacas no período pós parto e sua influência na taxa de prenhez subsequente. Porém, poucos estudos são encontrados em bovinos, buscando estes meios de diagnósticos na resposta inflamatória após a inseminação artificial e sua interferência no ambiente uterino e na taxa de fertilização, como os realizados por Kaufmann et al. (2009) e propostos neste estudo.

Buscou-se primeiramente comparar as técnicas de escova ginecológica (EU) com lavado uterino (LU) para a coleta de material uterino para citologia endometrial em vacas de corte, considerando a dificuldade da execução das técnicas, a quantidade e qualidade das amostras obtidas, bem como a interferência da técnica na hemodinâmica uterina. Em relação a quantidade de amostras que atingiram a contagem total de 300 células nucleadas, observou-se que esta contagem foi possível em 89% das amostras pela técnica EU e 80 % pela técnica LU, corroborando a informação de Kasimanickam et al. (2005), na qual se refere ao método de escova ginecológica ser consistente e confiável para obtenção de amostras. Entretanto, a quantidade (%) média de células polimorfonucleares obtida pela técnica de EU foi inferior (1,24 ± 0,2254 %) em relação à obtida por lavagem uterina (12,51 ± 0,6716 %), sendo estes resultados contraditórios aos de Glenthoj et al. (1986) e Bourke et al. (1997), que relatam que a técnica de escova ginecológica foi superior em seres humanos e equinos, comparada a outros métodos para a recuperação de células cervical e endometrial. São também contraditórios a Ellenberger et al. (2006), que referem que a amostra obtida por EU representa o que ocorre em todo ambiente uterino. Ainda este resultados sugerem que esta técnica avalia localmente o ambiente uterino como proposto por Kasimanickam et al. (2005).

Todos os lavados deste estudo (100 %) resultaram na recuperação de líquido, sendo obtido o volume médio de 45 ± 9,4 mL após a infusão de 60 mL, diferentemente de Kasimanickam et al. (2005), que obtiveram 83 % de recuperação em seu estudo, mas confirmando o que foi mencionado por Gilbert et al. (1998), referente a não ter ocorrido falha na recuperação de fluido. Pode-se inferir que o volume médio recuperado foi alto quando comparado aos resultados de Gilbert et al. (2005) (2 mL), Kasimanickam et al. (2005) e Santos et al. (2009) (6 mL), talvez por estes trabalhos terem sido realizados em períodos

iniciais do pós-parto, quando o útero ainda está em fase de involução, com maior diâmetro, conforme referido por Kasimanickam et al. (2005a). Pequena parte do fluido não recuperado poderia desencadear uma resposta neste ambiente uterino, conforme mencionado por Kasimanickam et al. (2005a), porém, esta resposta foi avaliada por meio da ultrassonografia Doppler e nada significativo foi encontrado.

A ultrassonografia Doppler permite estudar o fluxo sanguíneo e, portanto, identificar alterações de fluxos nas vias reprodutivas (CHUANG et al., 1999), tornando possível o estudo não invasivo da hemodinâmica uterina, analisando a presença e direção do fluxo sanguíneo em diversos vasos (CARVALHO; ADDAD, 2009). Pode-se avaliar, de forma subjetiva, a vascularização de um órgão pelo modo Doppler colorido, no qual se verifica a presença de vascularização em escores, sendo que quanto maior o escore, maior a vascularização no órgão (SILVA et al., 2005). Também se pode avaliar o índice de resistência (RI) vascular pelo modo espectral, sendo que quanto menor o valor de RI, maior o fluxo sanguíneo do vaso analisado (SCHOLTES et al., 1989; CHUANG et al., 1999; BOLLWEIN; MAYER; STOLLA, 2003; SILVA et al., 2005; GINTHER et al., 2007). Diante a isso, esperava-se que quatro horas após a realização dos procedimentos de EU e LU os valores de EV aumentassem e de RI diminuíssem, pois estes procedimentos são relativamente invasivos e poderiam desencadear resposta inflamatória após sua realização.

De fato, pode-se notar que os menores valores médios (0,6620 ± 0,3527) de RI das artérias uterinas do grupo LU, que indicam maior fluxo sanguíneo (BOLLWEIN et al., 2000; MAYER; STOLLA, 2003; GINTHER et al., 2007) foram encontrados exatamente no momento de quatro horas após a realização do procedimento conforme sugerido anteriormente, indicando que o procedimento estaria influenciando nestes resultados com resposta inflamatória subsequente, como proposto por Carvalho e Addad (2009b) e Werner (2010), no que se refere a resposta inflamatória se iniciar com vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo.

Porém, esta redução só foi significativa ($P<0,05$) quando comparada à avaliação 48 horas após o procedimento (0,7855 ± 0,3527) e não quando comparada com o momento controle 34 horas antes da coleta (0,6980 ± 0,3527). Este aumento de fluxo sanguíneo não foi encontrado quando analisado o grupo EU, houve apenas diminuição progressiva do fluxo sanguíneo ao longo das coletas -34, 4, 24 e 48, diferindo significativamente ($P<0,05$) apenas entre o momento -34 horas (0,6606 ± 0,3718), maior fluxo sanguíneo e 48 horas (0,8156 ± 0,3718), menor fluxo sanguíneo.

Segundo Waite et al. (1990) e Ford (1994), este aumeto do fluxo sanguíneo uterino no estro pode ser resultado da ação vasodilatadora do estrógeno, enquanto o declínio gradual do

fluxo pode resultar da diminuição de estrógeno e/ou da presença da progesterona. Seguindo esses princípios e autores, os maiores valores médios de EV para o grupo LU (2,1500 ± 0,1512) e EU (2,3611 ± 0,1594) dos cornos uterinos, representando o maior fluxo sanguíneo, foram observados no momento que antecedeu a ovulação (-34 horas), seguindo de diminuição gradativa e contínua até o momento de 48 horas após o procedimento. Porém, estes valores só diferiram ($P<0,05$) entre os tempos de 34 horas antes do procedimento e 4 horas após (LU - 2,1250 ± 0,1512, EU - 2,2778 ± 0,1594) em relação a 48 horas (LU - 1,6250 ± 0,1512, EU - 1,7222 ± 0,1594), não havendo diferença entre -34, 4 e 24 horas do procedimento.

A explicação para as diferenças encontradas na hemodinâmica uterina nos diferentes momentos de observação pode se justificar por oscilações hormonais, destacando-se que o aumento do estradiol pode promover o aumento da vascularização e redução no índice de resistência arterial. O esperado é que 30 horas antes da inseminação (34 horas antes do procedimento), o fluxo sanguíneo uterino seja grande devido a fase estrogênica do ciclo estral, aumentando ainda mais no momento de quatro horas após a inseminação artificial por um provável processo inflamatório decorrente da deposição do sêmen, caracterizado pela vasodilatação, diminuído gradativamente nos momentos de 24 e 48 horas após a IA, com a resolução do processo inflamatório transitório e provável aumento das concentrações progesterônicas.

3.6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo pode-se concluir que:

1. A técnica de lavagem uterina permite a obtenção de maior número de células inflamatórias com características morfológicas preservadas e com maior representatividade do ambiente uterino do que a técnica de com escova ginecológica.

2. As técnicas de lavagem uterina e escova ginecológica provocam efeitos semelhantes sobre a hemodinâmica uterina, avaliada por ultrassonografia nos modos espectral e Doppler colorido.

Experimento 2

4 EXPERIMENTO 2

4.1 OBJETIVO

Este experimento foi delineado com o seguinte objetivo:

1. Estudar a fertilização a campo em bovinos após a realização do procedimento de lavagem uterina quatro horas após a inseminação, para a obtenção de amostra para análise citológica.

4.2 HIPÓTESE

Verifica-se na literatura que as condições do ambiente uterino interferem na fertilização, sendo elaborada a seguinte hipótese:

1. A técnica de lavagem uterina após inseminação artificial em fêmeas bovinas reduz a taxa de fertilidade.

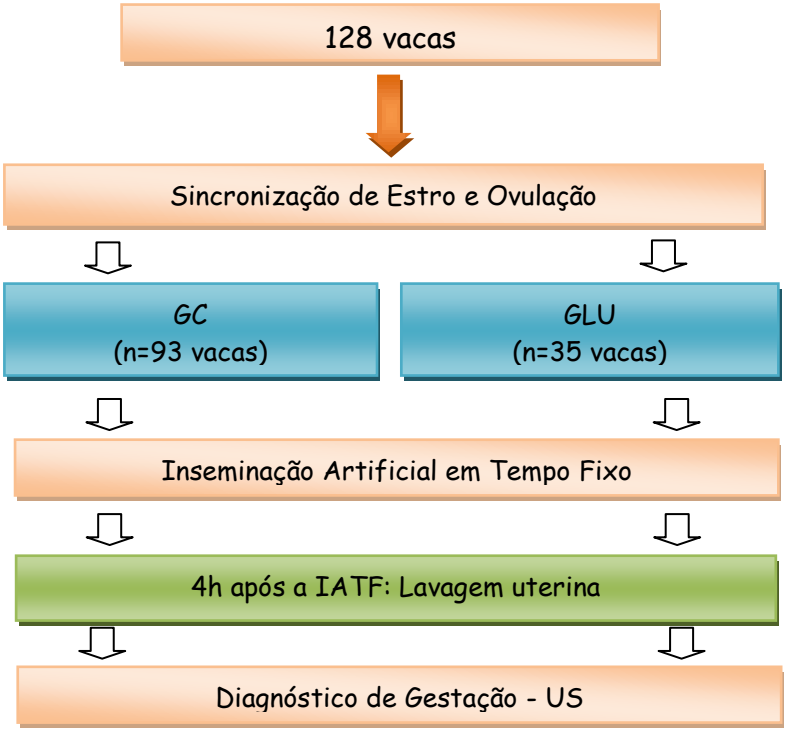
4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus Administrativo de Pirassununga, e na Fazenda Fronteira, localizada no município de Cocalinho, MT. Durante o período de setembro de 2010 a junho de 2011.

4.3.1 Esquema experimental e divisão dos grupos

Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais (GC, n=93 e GLU, n=35), sendo que cada grupo continha partidas A e B do sêmen. Na figura 8 observa-se o esquema experimental da sincronização do estro, momento da IATF, lavagem uterina e diagnóstico de gestação.

Figura 7 - Esquema experimental: os 128 animais foram divididos em 2 grupos experimentais: GC, grupo controle não lavado (93 animais) e GLU, grupo submetido a lavagem uterina (35 animais), sendo este último submetido a lavagem uterina 4 horas após a IA. Trinta dias após a IA, todos os animais passaram por ultrassonografia modo B para diagnóstico de gestação



Fonte: (THOMÉ, 2013)

4.3.2 Avaliação do Sêmen

Foram utilizadas duas partidas comerciais de sêmen de um mesmo touro, as quais foram previamente avaliadas quanto a concentração espermática (em câmara de Neubauer), motilidade total e progressiva (avaliadas pelo sistema computadorizado de análise do sêmen - CASA), morfologia espermática (pela técnica da câmara úmida, sob microscopia de contraste

de interferência diferencial, em aumento de 1.000x) e percentual de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial (PIAIC, pela associação das sondas fluorescentes PI, H342, FITC-PSA e JC-1, descrita por Celeghini et al. 2007a).

As partidas apresentaram-se dentro das características para utilização em IA. A concentração obtida foi $55{,}0 \times 10^6$ espermatozoides/mL em ambas as partidas. As partidas A e B apresentaram motilidade total de 58,4% e 67,5%, motilidade progressiva de 53,2% e 61,6%, PIAIC 23,0% e 44,5% e total de defeitos de 6,0 e 11,0%, respectivamente.

4.3.3 Seleção dos animais

Foram utilizadas 128 vacas, entre 50 e 70 dias pós-parto, avaliadas por palpação transretal e ultrassonografia em modo B, quanto aos escores ovarianos (Quadro 1) e uterinos (Quadro 2) e escore de condição corporal (Quadro 3), como descrito no **Experimento 1**.

Foram excluídas do experimento as vacas que apresentaram escore uterino e/ou ovariano três; e vacas que apresentavam ECC inferior a quatro ou superior a sete. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, em pastagem de capim-Braquiarão (*Brachiaria brizanhta*), com água e sal mineral *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos de forma homogênea em dois grupos experimentais, sendo um controle (GC), não submetido a lavagem uterina (n=93), e um submetido a lavagem uterina (GLU) quatro horas após a IA (n=35). As diferentes partidas de sêmen foram distribuídas aleatoriamente em cada grupo. No GC as vacas foram inseminadas com sêmen da partida A (n=51) e partida B (n=42), e no GLU foram inseminadas 17 vacas com sêmen da partida A e 18 vacas com o da partida B.

4.3.4 Inseminação artificial em tempo fixo

Todas as vacas foram submetidas a um protocolo de sincronização do estro e da ovulação, que consistiu na colocação de um implante subcutâneo contendo 3 mg de norgestomet (Crestar®) mais a aplicação intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol

(Estrogin®). Após oito dias, o implante de progestágeno foi retirado e administrados 1 mg de benzoato de estradiol, 0,5 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio®) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (Novormon®). A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) foi realizada 30 horas depois, por um único inseminador experiente, no corpo do útero dos animais contidos em brete, com o objetivo de minimizar variação da técnica.

4.3.5 Lavagem uterina

O GLU foi submetido a lavagem uterina para a colheita de amostra para a avaliação citológica. O procedimento consistiu na deposição de 20 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9 % no interior do útero, com uma seringa (60 mL) acoplada a uma sonda de *Folley,* introduzida com o auxílio de um mandril de aço inoxidável de 65 cm de comprimento. Após a introdução da sonda, o balonete foi inflado com cerca de 13 mL de ar, o mandril retirado, a solução infundida e, logo em seguida, o líquido foi recuperado do útero por aspiração com pressão negativa dentro da seringa, mensurado e transferido para tubos cônicos de 50 mL. As amostras foram concentradas e duas frações de 100 e 200 µL colocadas em citocentrífuga (Presvac, CT12) a 1000 rotações por minuto, durante 10 minutos, para confecção das lâminas.

Devido ao grande volume recuperado no Experimento 01, quando foram infundidos 60 mL, optou-se em diminuir o volume de infusão para 20 mL.

4.3.6 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IA por ultrassonografia transretal, utilizando o aparelho M5vet Mindray, no modo B.

4.3.7 Análise Estatística

Para avaliação das porcentagens de prenhez, segundo os dois tratamentos (GLU = 1 ou GC = 0) foi utilizado um Modelo Linear Generalizado, pressupondo distribuição Binomial da variável dependente (diagnóstico de gestação positivo=1 ou negativo=0) e função de ligação logística relacionando a variável dependente à parte sistemática do modelo estatístico. Foi desconsiderado o efeito de sêmen A e B, por estes não apresentarem diferenças estatísticas discutidas no experimento 03.

Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.2 (SAS, 2005), utilizando os procedimentos PROC FREQ, PROC MEANS, PROC GENMOD e PROC MIXED.

4.4 RESULTADOS

Para a descrição dos resultados, foi desconsiderada a qualidade do sêmen (partida A e B) por não haver diferença estatística entre esta e o diagnóstico de gestação.

4.4.1 Efeitos da lavagem uterina na fertilidade.

Na tabela 5 pode-se observar que os valores percentuais de vacas prenhes nos grupos de animais não lavados (56,99%) e lavados (54,29%) não diferiram estatisticamente (P>0,01) entre si.

Tabela 5 - Média (±EPM) para diagnóstico de gestação em relação aos grupos lavados (GLU) e não lavados (GC), utilizando (P>0,01)

DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO	
GRUPO	MED ± EPM(%)
GC	56,99 ± 5,13 A
GLU	54,29 ± 8,42 A

Nota: Médias em uma mesma coluna, seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Razão de Verossimilhança.

4.5 DISCUSSÃO

A deposição do sêmen no ambiente uterino desencadeia uma resposta inflamatória em éguas (TROEDSSON et al., 1995) e vacas (KOTILAINEM et al., 1994) após a inseminação, sendo predominante a presença de células polimorfonucleares, e mais acentuada em torno de quatro horas após a deposição (KAUFMAN et al., 2009). Neste momento, o ambiente uterino ainda está sob efeito de altas concentrações de estradiol (BOLLWEIN et al., 2000) o que favorece a vasodilatação e o influxo de células inflamatórias para o local, auxiliando o sistema imunológico na ação contra o agente agressor (sêmen). Deve-se destacar que neste experimento, o lavado uterino foi introduzido ainda no momento em que a defesa celular está bastante atuante.

Em concentrações maiores de progesterona, no período de diestro, existiria um efeito contrário no leito vascular causando a diminuição do fluxo sanguíneo (BOLLWEIN et al., 2000) prejudicando assim a migração de leucócitos para o ambiente uterino.

A presença desta reposta inflamatória muito intensa após a inseminação pode ser prejudicial a fertilização. Quatro horas após a inseminação artificial ainda é um momento favorável para obtenção de amostra citológica deste ambiente uterino para avaliação desta resposta inflamatória, sem que esta colheita prejudique a concepção, uma vez que os espermatozoides que fertilizarão o oócito já estão na tuba uterina.

Apesar de Ball (1988) e Roszel e Freeman (1988) utilizarem baixo volume para lavagem uterina em éguas, e Kasimanickam et al. (2005a) infundirem 60 mL no período pós-parto, estes autores afirmam existir interferência do procedimento de lavagem uterina após a inseminação artificial na fertilidade dos animais, o presente estudo provou o contrário, nos quais os valores percentuais de vacas prenhes nos grupos de animais não lavados (56,99%)

em comparação aos lavados (54,29%), não apresentaram diferença estatística entre si, indicando que esta técnica poderia ser usada com sucesso e confiabilidade na obtenção de amostras endometriais após a inseminação artificial, como validado por Kasimanickam et al. (2004, 2005a), e que não interfere na taxa de fertilidade dos animais.

4.6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste experimento pode-se concluir que:

1. A técnica de lavagem uterina após inseminação artificial em fêmeas bovinas não interfere na taxa de fertilidade.

Experimento 3

5 EXPERIMENTO 3

5.1 OBJETIVOS

Este experimento foi delineado com os seguintes objetivos:

1. Avaliar a taxa de fertilidade a campo em bovinos inseminados com sêmen de diferentes percentuais de espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial (PIAIC).

2. Estudar a resposta inflamatória uterina em bovinos quatro horas após a inseminação artificial com sêmen apresentando diferentes percentuais de espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial (PIAIC) determinadas por sondas fluorescentes.

5.2 HIPÓTESES

Verifica-se na literatura que a qualidade do sêmen é uma importante aliada para aumentar a fertilidade de um rebanho, e que a deposição do sêmen no trato reprodutivo das fêmeas bovinas pode induzir resposta inflamatória uterina, com alterações de fluxo sanguíneo local e, esta resposta inflamatória por sua vez, pode interferir na fertilidade destes animais. Diante disso foram elaboradas as seguintes hipóteses:

1. A utilização de sêmen com maiores percentuais de espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial (PIAIC) na inseminação artificial de fêmeas bovinas aumenta a taxa de fertilidade.

2. A utilização de sêmen com menor percentual de espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial (PIAIC) aumenta a resposta inflamatória uterina após a inseminação artificial em bovinos.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus Administrativo de Pirassununga, SP, e na Fazenda Fronteira, localizada no município de Cocalinho, MT. Durante o período de setembro de 2010 a junho de 2011.

5.3.1 Esquema experimental e divisão de grupos

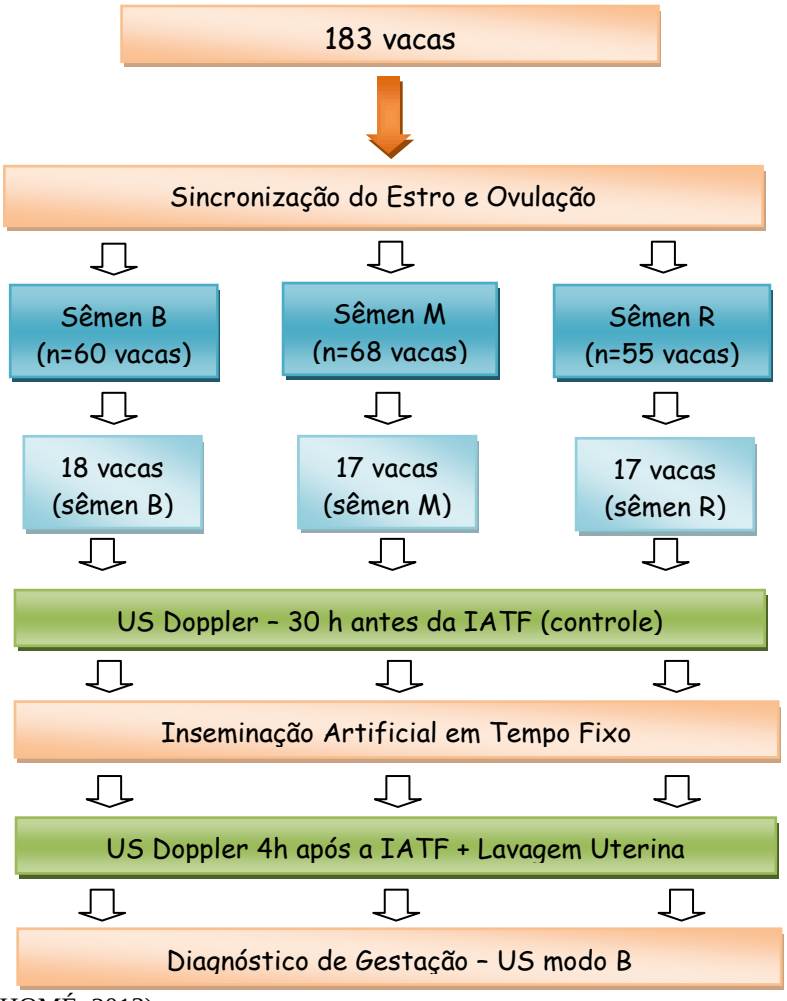
Em acordo com os objetivos, o delineamento experimental será apresentado separadamente. Na figura 8 observa-se esquema experimental da sincronização de ciclo estral, inseminação e diagnóstico de gestação dos 183 animais utilizados no experimento 3 com o objetivo de avaliar a fertilidade de acordo com o sêmen utilizado.

Figura 8 - Esquema experimental: Os animais selecionados foram distribuídos em três grupos experimentais, sincronizados quanto ao estro e ovulação, e inseminados com sêmen B (60 animais), com sêmen M (68 animais) e com sêmen R (55 animais). Trinta dias após a IA, todos os animais passaram por ultrassonografia modo B para diagnóstico de gestação

Fonte: (THOMÉ, 2013)

Na figura 9, dos 183 animais utilizados em todo experimento 3, uma amostragem de 28,42 %, ou seja, 52 animais foram submetidos a ultrassonografia nos modos Espectral e Doppler colorido no momento de 30 horas antes (-30 h) e 4 horas (4 h) após a IATF, e submetidos a lavagem uterina imediatamente após a ultrassonografia 4 horas após a IA, com os objetivos de avaliar a resposta inflamatória uterina frente as diferentes qualidades do sêmen e a relação entre a qualidade do sêmen e a resposta inflamatória.

Figura 9 - Esquema experimental: Dos animais selecionados e distribuídos em três grupos experimentais, sêmen B (60 animais), sêmen M (68 animais) e sêmen R (55 animais), uma amostragem de 18 vacas do grupo B, 17 do grupo M e 17 do grupo R foi submetida à avaliação ultrassonografia nos modos espectral e color Doppler 30 horas antes da IA e 4 horas após a IA, seguida da lavagem uterina. Trinta dias após a IA, todos os animais passaram por ultrassonografia modo B para diagnóstico de gestação



Fonte: (THOMÉ, 2013)

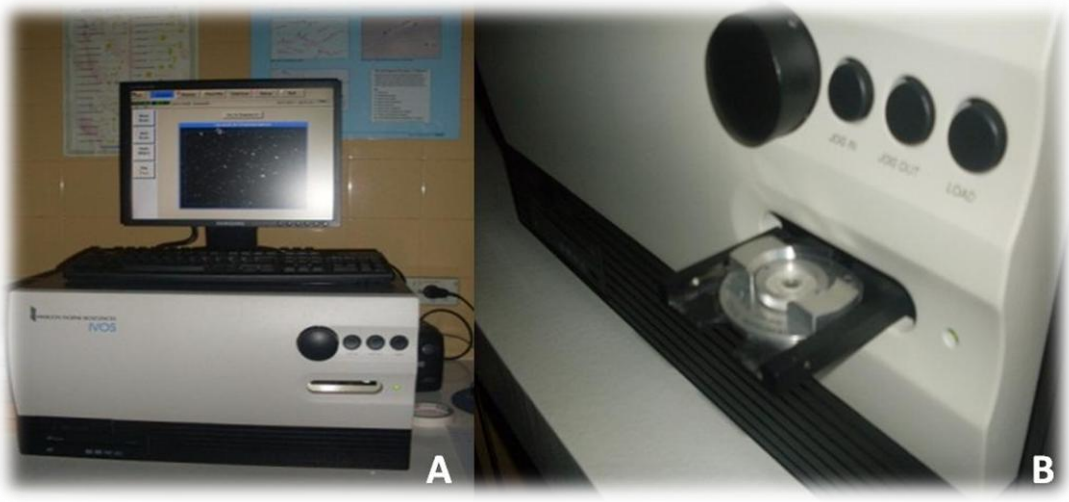
5.3.2 Avaliação do sêmen

Foram analisadas 20 partidas comerciais de sêmen para a separação de três partidas a serem utilizadas no experimento, apresentando diferentes qualidades (Boa, Média e Regular).

Duas palhetas de sêmen de cada partida foram descongeladas (37°C por 30 segundos), o volume total do sêmen foi colocado em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL), homogeneizado e analisado quanto a motilidade, concentração, alterações morfológicas e integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial.

A motilidade espermática foi avaliada pelo sistema computadorizado de análise do sêmen (CASA – Computer-Assisted Semen Analysis). Nessa análise uma amostra do sêmen foi diluída em meio TALP-*sperm* (BAVISTER et al., 1983), na concentração de 25×10^{6} espermatozoides/mL, uma amostra foi colocada na câmara de Makler (Makler® counting chamber, Sefi-Medical Instruments Ltda.), previamente aquecida (37ºC) e inserida no aparelho modelo HTM-Ivos da Hamilthon Thorne Biosciences (Version 12.3) (Bervely, MA, USA) (figura 10), com programação previamente ajustada para a análise de sêmen bovino Anexo A). No mínimo cinco campos foram selecionados para a leitura e análise. As características analisadas foram motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade do trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilinear (VCL, µm/s), deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e células rápidas (%) (ARRUDA, 2000).

Figura 10 – Aparelho para análise computadorizada do sêmen (CASA), modelo HTM-IVOS; marca Hamilton-Thorne Biosciences (Beverly, MA, USA) (A). Detalhe da Câmara de Makler (B) - Pirassununga, SP – 2013



Fonte: (Florez-Rodriguez, 2013)

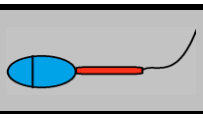
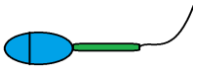
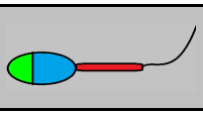
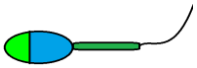
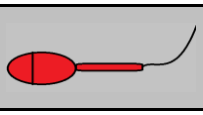
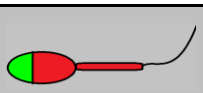
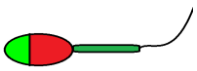
A concentração foi determinada pela leitura em câmara de Neubauer. Para avaliar as alterações morfológicas, o sêmen foi diluído em formol salino tamponado e a leitura realizada em preparações úmidas, sob microscopia de contraste de interferência diferencial (Nikon, modelo Eclipse 80i), com aumento de 1.000 x, contando-se 200 células por amostra e anotando-se as alterações observadas.

A integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial foram avaliadas pela associação das sondas PI, H342, FITC-PSA e JC-1, descrita por Celeghini et al. (2007a). Uma alíquota de sêmen foi retirada das amostras e adicionada ao TALP-*sperm*, em microtubos (1,5 mL) pré-aquecidos a 37°C, a fim de se obter amostras com concentração de 25 x 10^6 sptz/mL em um volume final de 1 mL. Após a diluição colocou-se uma alíquota de 150 µL em um microtubo de 600 µL, e adicionaram-se 3 µL de Iodeto de Propídio (PI-0,5 mg/mL, P4170, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA), 2 µL de Hoechst 33342 (H342 5 mg/mL, Molecular probes Inc., Eugene, Oregon, EUA), a seguir, 5 µL de JC-1 (153 µM, T-3168, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA), conjuntamente com a adição de 50 µL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA-100 µg/mL, L-0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA). Após a adição das sondas fluorescentes a amostra foi homogeneizada e incubada à 37°C por 8 minutos, na ausência de luz. Uma gota de 3 µL desta amostra foi retirada e colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas (37°C) e imediatamente avaliada em microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência, Marca Nikon, Modelo Eclipse 80i), em

um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655).

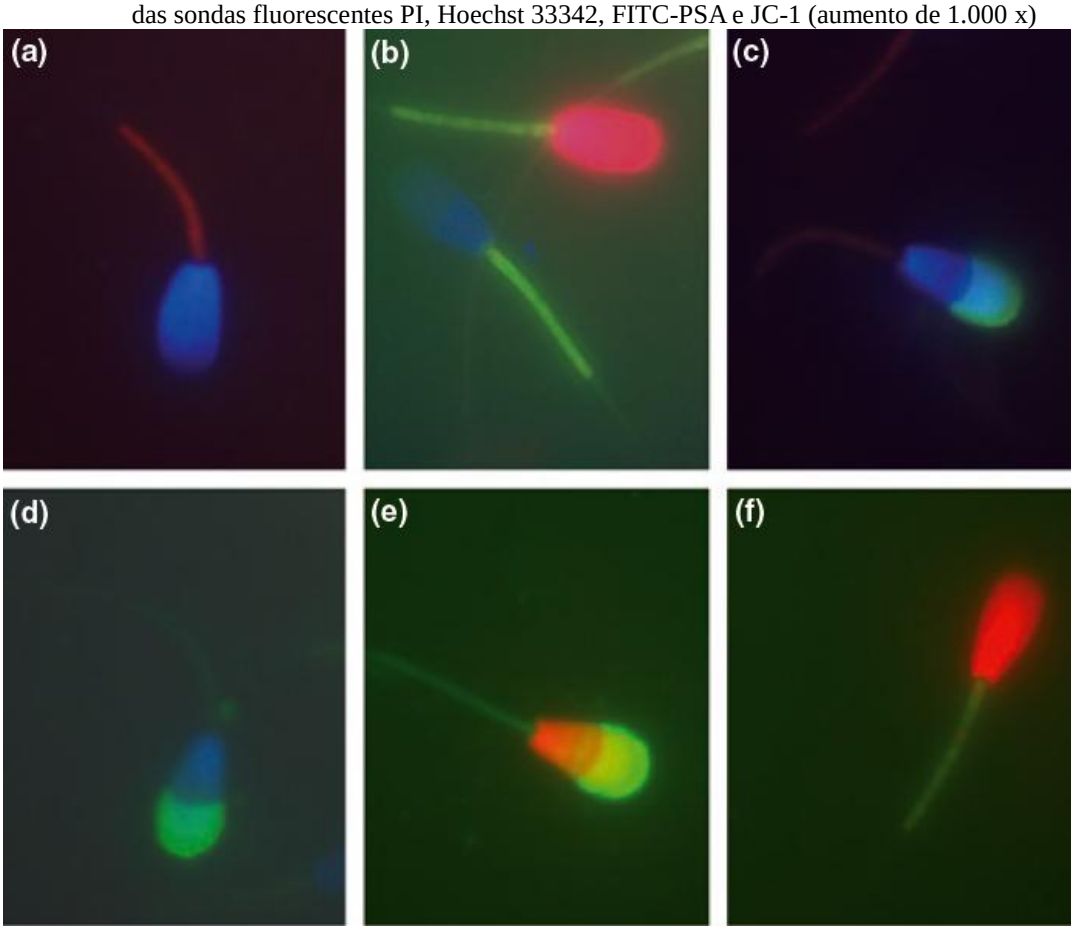
A leitura das lâminas foi realizada em aumento de 1000 x, realizando a contagem de 200 células. As células foram classificadas em oito categorias de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, conforme descrito por Celeghini et al. (2007a) (quadro 5). Das oito categorias de células obtidas nesta técnica foi considerado somente o percentual das células que apresentaram membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com função mitocondrial (PIAIC) (Figura 11) para a divisão dos grupos experimentais.

Quadro 5 – Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de PI, H324, JC-1 e FITC-PSA - Pirassununga – 2013

Parâmetro	**Sigla**		**Descrição da fluorescência**
Membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e com alto potencial mitocondrial	PIAIC		Cabeça azul Peça intermediária vermelha
Membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e baixo potencial mitocondrial	PIAIB		Cabeça azul Peça intermediária verde
Membrana plasmática intacta, acrossoma lesado e com alto potencial mitocondrial	PIALA		Cabeça azul Acrossoma verde intenso Peça intermediária vermelha
Membrana plasmática intacta, acrossoma lesado e baixo potencial mitocondrial	PIALB		Cabeça azul Acrossoma verde intenso Peça intermediária verde
Membrana plasmática lesada, acrossoma intacto e com alto potencial mitocondrial	PLAIA		Cabeça vermelha Peça intermediária vermelha
Membrana plasmática lesada acrossoma intacto e baixo potencial mitocondrial	PLAIB		Cabeça vermelha Peça intermediária verde
Membrana plasmática lesada, acrossoma lesado e com alto potencial mitocondrial	PLALA		Cabeça vermelha Acrossoma verde intenso Peça intermediária vermelha
Membrana plasmática lesada, acrossoma lesado e baixo potencial mitocondrial	PLALB		Cabeça vermelha Acrossoma verde intenso Peça intermediária verde

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013)

Figura 11 - Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI, Hoechst 33342, FITC-PSA e JC-1 (aumento de 1.000 x)



Fonte: (CELEGHINI et al., 2007a).

Legenda: a) Células com membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial; b) Superior: célula com membrana plasmática lesada (núcleo vermelho), acrossoma intacto, com baixo potencial de membrana mitocondrial. Inferior: célula com membrana plasmática intacta, acrossoma intacto, com baixo potencial de membrana mitocondrial; c) Célula com membrana plasmática intacta, acrossoma lesado, com alto potencial de membrana mitocondrial; d) Célula com membrana plasmática intacta, acrossoma lesado, com baixo potencial de membrana mitocondrial; e) Célula com membrana plasmática lesada, acrossoma lesado, com baixo potencial de membrana mitocondrial; f) Célula com membrana plasmática lesada, acrossoma intacto, com baixo potencial de membrana mitocondrial. (CELEGHINI et al., 2007a).

Na tabela 6 estão apresentados os resultados das análises das 20 partidas de sêmen analisadas. Procurou-se separar partidas diferentes de um mesmo touro para evitar efeitos do touro. Foram escolhidas as partidas dois, três e cinco do touro A, que apresentaram percentuais distintos de células PIAIC por palheta pós-criopreservação. Desta forma, foram formados três grupos de qualidades diferentes de sêmen: Sêmen de Boa qualidade (grupo B, partida 15), contendo 44,5 % de espermatozoides PIAIC, Sêmen de qualidade média (grupo M, partida 3), contendo 23,0 % de espermatozoides PIAIC e Sêmen de qualidade regular (grupo R, partida 2), contendo 8,5 % de espermatozoides PIAIC. Todas as partidas

escolhidas eram consideradas adequadas para comercialização e uso na IA e apresentavam motilidade, concentração e porcentagem de alterações morfológicas semelhantes.

Tabela 6 - Valores de motilidade total (%), motilidade progressiva (%), concentração (número de espermatozóides/mL), integridade de membrana plasmática (MPI, %), função mitocondrial (FM, %), integridade de acrossomo (AI, %), porcentagem de células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial mitocondrial (PIAIC, %) e total de defeitos (%) das 20 amostras de sêmen avaliadas

Touro	Partida	Motilidade Total (%)	Motilidade Progressiva (%)	Concentração (n. sptz/mL)	MPI (%)	FM (%)	AI (%)	PIAIC (%)	Total de Defeitos (%)
A	1	45,3	37,2	45,0	8,5	5,5	47,0	5,0	19
A	2	60,4	52,2	50,0	9,5	12,0	50,0	8,5	12
A	3	58,4	53,2	55,0	28,5	26,5	54,0	23,0	6
A	4	63,7	56,3	77,5	32,5	41,0	51,0	31,5	12
A	5	63,3	50,7	65,0	33,0	39,0	75,0	32,0	13
A	6	59,8	51,9	80,0	33,0	38,5	57,5	33,0	17
A	7	68,9	60,2	42,5	34,0	33,0	69,0	33,0	12
A	8	50,2	44,5	62,5	35,0	37,5	61,5	34,0	8
A	9	62,8	57,1	42,5	39,0	34,5	67,5	34,5	15
A	10	47,6	40,8	72,5	35,5	36,5	52,0	34,5	13
A	11	62,4	57,3	50,0	39,0	39,0	58,5	35,5	12
A	12	61,7	56,8	65,0	43,5	42,5	70,5	40,0	8
A	13	63,4	58,4	50,0	41,5	40,5	63,5	40,5	10
A	14	65,3	57,1	87,5	45,0	50,0	68,5	42,5	9
A	15	67,5	61,6	55,0	45,0	61,5	71,0	44,5	11
B	1	64,2	54,7	55,0	58,5	61,5	77,0	57,5	11
C	1	38,7	29,9	50,0	41,5	43,0	67,0	41,5	15
C	2	72,6	67,8	52,5	45,0	51,5	75,5	44,5	13
C	3	39,1	32,4	56,0	35,5	39,5	66,0	35,5	19
C	4	32,4	26,3	42,5	31,0	31,0	64,0	31,0	19

5.3.3 Seleção dos animais

Foram utilizadas 300 vacas, com bezerro ao pé, para a seleção dos animais para os grupos experimentais (Figura 12). Os animais foram avaliados por palpação transretal e ultrassonografia em modo B, quanto aos escores ovariano (Quadro 1), uterino (Quadro 2) e de condição corporal (Quadro 3), como descrito no **Experimento 1**.

Foram excluídas do experimento as vacas que apresentaram escore uterino e/ou ovariano três; e ECC inferior a quatro ou superior a sete. Dessa maneira, 183 vacas da raça Nelore, entre 50 e 70 dias pós-parto, foram selecionadas e mantidas sob as mesmas condições ambientais, em pastagem de capim-Braquiarão (*Brachiaria brizanhta*), com água e sal mineral *ad libitum*.

Figura 12 - Animais disponibilizados para o processo de seleção para realização do Experimento 3 na Fazenda Fronteira, município de Cocalinho, MT - 2011

Fonte: (THOMÉ, 2013)

Os animais selecionados foram distribuídos de forma homogênea nos três grupos experimentais de acordo com a qualidade do sêmen: grupo B (n=60, 44,5% espermatozoides PIAIC), grupo M (n=68, 23,0% espermatozoides PIAIC) e grupo R (n=55, 8,5% espermatozoides PIAIC).

Para facilitar o manejo e a execução dos procedimentos os animais foram distribuídos em dois lotes.

5.3.4 Inseminação artificial em tempo fixo

Todas as vacas selecionadas foram submetidas a um protocolo de sincronização do estro e da ovulação, que consistiu na colocação de um implante subcutâneo contendo 3 mg de norgestomet (Crestar®), mais a aplicação intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®) (Figura 13). Após oito dias, o implante de progestágeno foi retirado e

administrados 1 mg de benzoato de estradiol, 0,5 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio®) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (Novormon®). A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) foi realizada 30 horas após, por um único inseminador experiente, no corpo do útero dos animais contidos em brete, com o objetivo de minimizar variação da técnica.

Figura 13 – Implante de progestágeno (Crestar®) para colocação subcutânea auricular e benzoato de estradiol (Estrogin®) utilizado para sincronização de estro no Experimento 3 na Fazenda Fronteira, município de Cocalinho, MT - 2011

Fonte: (THOMÉ, 2013)

5.3.5 Avaliação da hemodinâmica uterina

Uma amostragem dos animais (28,42 %), num total de 52 vacas, sendo 18 inseminadas com sêmen B, 17 com sêmen M e 17 com sêmen R foi submetida à avaliação da hemodinâmica uterina por ultrassonografia utilizando os modos espectral e Doppler colorido do aparelho (M5vet, Mindray®, China), com probe linear transretal (6,5 mHz), seguindo os padrões estabelecidos no **Experimento 01**. A hemodinâmica uterina foi avaliada em dois períodos: 30 horas antes da inseminação artificial (controle) e quatro horas após. A avaliação da hemodinâmica uterina de uma amostragem dos animais é justificada pelo tempo de duração de cada exame, em média treze minutos (no experimento 1), não sendo viável a avaliação de todos os animais.

5.3.6 Lavagem uterina

Imediatamente após a avaliação ultrassonográfica nos modos espectral e Doppler colorido das quatro horas após a inseminação artificial, as mesmas vacas amostradas (28,42 %) foram submetidas à avaliação uterina pela infusão de solução salina. A lavagem uterina para a colheita de amostra para a avaliação citológica foi realizada com a deposição de 20 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9 % no interior do útero, com uma seringa (60 mL) acoplada a uma sonda de *Folley*, introduzida com o auxílio de um mandril de aço inoxidável de 65 cm de comprimento. Após a introdução da sonda, o balonete foi inflado com cerca de 13 mL de ar, o mandril retirado, a solução infundida e, logo em seguida, o líquido foi recuperado do útero por aspiração com pressão negativa dentro da seringa, mensurado e transferido para tubos cônicos de 50 mL (Figura 14). As amostras foram concentradas e duas frações de 100 e 200 µL colocadas em citocentrífuga (Presvac, CT12) (Figura 15), a 1000 rotações por minuto, durante 10 minutos para confecção das lâminas.

Devido ao grande volume recuperado no Experimento 01, quando foram infundidos 60 mL, optou-se em diminuir o volume de infusão para 20 mL.

Figura 14 – Procedimentos realizados durantes a técnica de lavagem uterina para coleta de amostra citológica uterina. A) Abertura da vulva; B) Introdução da sonda *Folley* acoplada ao mandril de inox; C e D) Infusão da solução fisiológica; E) Retirada da solução fisiológica por pressão negativa exercida com a seringa; F) Conteúdo obtido transferido para tubos cônicos. Cocalinho-MT, 2011

Fonte: (THOMÉ, 2013)

Figura 15 – Citocentrífuga (Presvac, CT12) utilizada para confecção das lâminas, em destaque, Cocalinho-MT - 2011

Fonte: (THOMÉ, 2013)

5.3.7 Coloração e leitura das lâminas

As lâminas foram fixadas em álcool metílico (Synth), coradas por Giemsa modificado (Giemsa's Azure Eosin Methylene Blue Soluction® – Merck Millipore Brazil) por 30 minutos e montadas com resina sintética (Permonunt®) e lamínula. Um microscópio Leica® DM 2000 (Leica, USA) foi utilizado para a avaliação citológica, que consistiu em uma leitura panorâmica de toda a lâmina e a escolha do campo para efetuar a contagem de 300 células nucleadas (endometriais e inflamatórias), em aumento de 200x (Objetiva planacromática de 20x com abertura numérica de 0,40), determinando a porcentagem de células polimorfonucleares (PMN) presentes no material.

As lâminas foram analisadas em busca do número de células inflamatórias (PMN) e endometriais na amostra, limitando-se a contagem de 300 células nucleadas no total, sendo calculada a porcentagem de células inflamatórias encontradas (relação entre PMN e total de células contadas) e classificadas de acordo com Williams et al. (1998) adaptado como demonstrado no quadro 04 do **Experimento 1**.

5.3.8 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IA, por ultrassonografia transretal, utilizando o aparelho M5vet Mindray, no modo B.

5.3.9 Análise estatística

Para a ultrassonografia Doppler, foram comparados os valores médios do índice de resistência (RI) das artérias uterinas direita e esquerda e média dos escores de vascularização (EV) dos cornos uterinos direito e esquerdo em relação a cada momento da análise (30 horas antes da IA e 4 horas após a IA).

Para essas análises, adotou-se um Modelo Linear Misto tradicional que contemplou o efeito fixo de momento (-30 e 4 horas), qualidade de sêmen (B, M ou R), interação momento *versus* qualidade do sêmen, além dos efeitos aleatórios de animal e resíduo.

Para avaliação das porcentagens de células polimorfonucleares, considerando os escores de GRAU (0, 1 e 2), foi utilizado um Modelo Linear Generalizado, pressupondo distribuição Binomial da variável dependente (número de células polimorfonucleares/total de células avaliadas) e função de ligação logística relacionando a variável dependente à parte sistemática do modelo estatístico.

Para avaliação das porcentagens de prenhez, segundo a qualidade de sêmen (B, M e R) foi utilizado um Modelo Linear Generalizado, pressupondo distribuição Binomial da variável dependente (diagnóstico de gestação positivo=1 ou negativo=0) e função de ligação logística relacionando a variável dependente à parte sistemática do modelo estatístico.

Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.2 (SAS, 2005), utilizando os procedimentos PROC FREQ, PROC MEANS, PROC GENMOD e PROC MIXED.

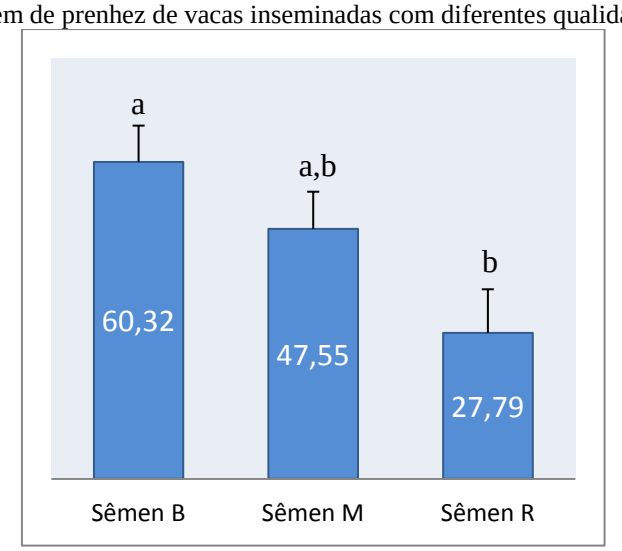
5.4 RESULTADOS

Os resumos das análises das variâncias para a variável células polimorfonucleares considerando os efeitos principais de lote e grau de inflamação, para a variável volume recolhido, considerando os efeitos principais de grau de inflamação, para a variável média de índice de resistência em relação aos tempos de obtenção dos dados, 30 horas antes e 4 horas após a IA, e para a variável média de escore uterino (EV) em relação aos tempos de obtenção dos dados, 30 horas antes e 4 horas após a IA encontram-se no Apêndice B – Experimento 3.

5.4.1 Fertilidade após IA com sêmen de diferentes qualidades

A influência da qualidade do sêmen na fertilidade pode ser verificada no presente experimento (Gráfico 1), onde houve maior (P<0,05) porcentagem de vacas prenhes inseminadas com sêmen B (60,32 ± 6,902%), seguida das vacas inseminadas com sêmen M (47,55 ± 7,091%) e sêmen R (27,79 ± 8,277%). No entanto, diferença estatística (P<0,01) pode ser observada somente entre os grupos B e R.

Gráfico 1 – Porcentagem de prenhez de vacas inseminadas com diferentes qualidades de sêmen



Legenda: B=Bom (n=60, 44,5% espermatozoides PIAIC); M=Médio (n=68, 23,0% espermatozoides PIAIC); R= Regular (n=55, 8,5% espermatozoides PIAIC), Cocalinho-MT, 2011.
[a,b]letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística (P<0,05).

5.4.2 Resposta inflamatória uterina após IA com sêmen de diferentes qualidades

Dos 52 animais amostrados, três não apresentaram celularidade no conteúdo recuperado e foram desconsiderados das análises. Conforme a classificação proposta por Williams et al. (1988), dos 49 animais que apresentaram celularidade quando avaliados por lavagem uterina, 34,7 % (17 animais) apresentaram porcentagem de células inflamatórias polimorfonucleares inferior a 5 % na amostra obtida, considerado normal; 59,2 % (29 animais) porcentagem entre 5 a 25 %, considerado discreto; 4,1 % (2 animais) porcentagem entre 25 a 75 %, considerado grau moderado, e 2 % (1 animal) porcentagem acima de 75 %, considerado processo inflamatório acentuado.

Em resposta ao sêmen utilizado, pode-se observar que 35,3 % dos animais inseminados com o sêmen B e que apresentaram contagem (17/18 animais) foram considerados normais, 58,8 % tiveram endometrite leve e 5,9 % endometrite moderada. Dos animais inseminados com o sêmen M (17 animais), 23,5 % apresentaram se normais, 70,6 % endometrite discreto e 5,9 % endometrite moderada. Dos animais inseminados com sêmen R e que apresentaram celularidade (15/17 animais), 46,7 % apresentaram se normais, 46,7 % endometrite discreto e 6,7 % endometrite acentuada, conforme demonstrado no quadro 6.

Quadro 6 – Distribuição do Grau de resposta inflamatória conforme adaptado ao proposto por Williams et al. (1988) de acordo com a qualidade do sêmen (B, M, R) utilizado na Inseminação Artificial em Tempo Fixo

Grau de Inflamação	**SÊMEN**		
	Bom % (n)	**Médio % (n)**	**Regular % (n)**
0 – Normal	35,3 % (6/17)	23,5 % (4/17)	46,7 % (7/15)
1 – Discreto	58,8 % (10/17)	70,6 % (12/17)	46,7 % (7/15)
2 – Moderado	5,9 % (1/17)	5,9 % (1/17)	-x-
3 – Acentuado	-x-	-x-	6,7 % (1/15)

Notas: B=Bom (44,5% espermatozoides PIAIC); M=Médio (23,0% espermatozoides PIAIC); R= Regular (8,5% espermatozoides PIAIC).

Para a análise estatística, o animal que apresentou grau 3 de inflamação, considerado acentuado, foi excluído por não haver repetições (n=1). Não houve efeito (P>0,05) de lote em relação à porcentagem de células inflamatórias recuperadas nas amostras, desta forma os lotes foram desconsiderados nas análises.

5.4.3 Resposta vascular uterina após IA com sêmen de diferentes qualidades

Em relação ao sêmen utilizado na inseminação artificial e a interferência da qualidade deste no fluxo sanguíneo uterino, esperava-se que, quanto menor a qualidade do sêmen (R, M e B, respectivamente) utilizado para inseminar as vacas, maior seria o fluxo sanguíneo uterino decorrente da resposta inflamatória induzida, havendo diferença significativa entre os tempos -34hs e 4hs, porém não houve diferença entre a qualidade do sêmen e nem interação entre a qualidade e o tempo. Pode se confirmar na tabela 7 que não houve diferença significativa entre as partidas de sêmen utilizadas e o fluxo sanguíneo mensurado na artéria uterina.

Tabela 7 - Média (EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas em relação ao sêmen (B, M e R) utilizado na IA

Sêmen	RI
B	0,6943 ± 0,01518[A]
M	0,6687 ± 0,01562[A]
R	0,7110 ± 0,01562[A]

Notas: [A,B]letras maiúsculas diferentes sobre as médias na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05) pelo Teste *t* de Student. B=Bom (n=60, 44,5% espermatozoides PIAIC); M=Médio (n=68, 23,0% espermatozoides PIAIC); R= Regular (n=55, 8,5% espermatozoides PIAIC).

De acordo com o sêmen utilizado na inseminação artificial e possível interferência da qualidade deste na vascularização do corno uterino, esperava-se que, quanto menor a qualidade do sêmen utilizado, maior seria a vascularização sanguínea uterina decorrente da resposta inflamatória induzida. Porém, pode se notar que houve diferença estatística entre os tempos -34 e 4hs, e interação entre os tempos e as diferentes qualidades de sêmen. Não houve diferença apenas em relação à qualidade do sêmen isolada.

A tabela 8 evidencia que houve diferença significativa entre o período de -30 e 4 horas somente para as partidas de sêmen B e M, e com relação ao momento -30 horas exclusivamente, houve diferença significativa entre o sêmen M e R, não havendo diferença entre o sêmen B neste momento e nem entre as partidas B, M e R no momento de quatro horas após a IA.

Tabela 12 - Média (±EPM) do escore de vascularização (EV) uterina (0 a 4) nas artérias uterinas em relação ao sêmen (B, M e R) utilizado na inseminação artificial (IA) e o tempo da análise (-30 e 4 horas em relação à IA)

Tempo em relação à IA	**EV (0 a 4)**		
	B	**M**	**R**
-30 horas	1,94 ± 0,1075[b; A,B]	1,75 ± 0,1107[b; B]	2,15 ± 0,1107[a; A]
4 horas	2,56 ± 0,1278[a; A]	2,46 ± 0,1315[a; A]	2,24 ± 0,1315[a; A]

Notas: [a,b]letras minúsculas diferentes sobre as médias na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05)
[A,B] letras maiúsculas diferentes sobre as médias na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05)
B=Bom (n=60, 44,5% espermatozoides PIAIC); M=Médio (n=68, 23,0% espermatozoides PIAIC); R= Regular (n=55, 8,5% espermatozoides PIAIC).

5.4.4 Correlação entre Reposta inflamatória uterina e vascularização uterina

Na tabela 9 descreve-se a correlação obtida entre porcentagem de células inflamatórias (%PMN) versus índice de resistência vascular (RI), porcentagem de células inflamatórias (%PMN) versus escore vascular (EV), porcentagem de células inflamatórias (%PMN) versus grau de inflamação (Grau de endometrite), grau de inflamação (Grau de endometrite) versus índice de resistência vascular (RI), grau de inflamação (Grau de endometrite) versus escore vascular (EV) e índice de resistência vascular (RI) versus escore vascular (EV).

Tabela 9 – Valores obtidos das correlações entre a porcentagem de células inflamatória (%PMN), índice de resistência vascular (RI), escore vascular (EV) e grau de inflamação (Grau de endometrite) dos animais avaliados neste experimento

Características	**R**	**P**
%PMN X RI	-0,088	0,5384
%PMN X EV	-0,093	0,5116
%PMN X Grau de endometrite	0,797	<0,0001
Grau de endometrite X RI	-0,079	0,5930
Grau de endometrite X EV	-0,143	0,3294
RI X EV	-0,184	0,1938

Pode se observar que houve correlação positiva (r = 0,797) significativa (P<0,0001) somente entre a porcentagem de células inflamatórias (%PMN) e o grau de inflamação (Grau de endometrite) observado no útero dos animais analisados.

5.5 DISCUSSÃO

Grandes perdas econômicas têm ocorrido em decorrência de afecções uterinas em vacas leiteiras, tendo a endometrite considerada participação devido a sua alta incidência (BARTLETT et al., 1986; GUARD, 1994), que varia de 7,8 a 61,6% segundo Curtis et al. (1985) e Gilbert et al. (1998), e de 12% a 94% de acordo com Raab (2004); Gilbert et al. (2005); Hammon et al. (2006) e Barlund et al. (2008). Quanto ao gado de corte, poucos estudos têm sido realizados visando investigar a interferência da endometrite nas perdas econômicas devido a dificuldade de aplicação de técnicas para sua avaliação (KASIMANICKAM et al., 2005a; SANTOS et al., 2009). Este fato justifica o desenvolvimento e a realização deste experimento, onde se buscou avaliar a correlação entre o processo inflamatório uterino após a inseminação artificial com o uso de sêmen de diferentes qualidades e o índice de prenhez obtido.

Em diversas espécies, estudos relatam que a monta natural ou a IA são seguidas por migração de leucócitos para o lúmen e tecido uterino (GUVENC et al., 2005; RIBEIRO et al., 2006), e que no caso das éguas o sêmen induz resposta neutrofílica no útero após a IA (TROEDSSON, 1999), tendo o pico desta resposta entre 6 e 12 horas, e diminuindo após 24 horas (KATILA, 1995). Do ponto de vista imunológico, este sêmen depositado no trato reprodutivo das fêmeas é estranho ao organismo, causando assim reação inflamatória, que é considerada fisiológica e transitória, porém extremamente importante para remoção do excesso de espermatozoides mortos e outros contaminantes uterinos (TROEDSSON, 1999; ROBERTSON, 2005). Esta resposta caracteriza se inicialmente pelo evidente aumento do fluxo sanguíneo local e a rápida infusão de leucócitos, sobretudo os polimorfonucleares (WERNER, 2010).

O atraso em debelar o processo inflamatório pode ocorrer em razão de intensa resposta inflamatória, o que caracterizaria, de acordo com Kasimanickam et al. (2005b); Gilbert et al. (2005) e Kaufmann et al. (2009), endometrite subclínica. A avaliação da resposta inflamatória subclínica por meio do exame citológico endometrial, um excelente meio de diagnóstico, (KASIMANICKAM et al., 2004; GILBERT et al., 2005; KASIMANICKAM et al. 2005a; BARLUND et al., 2008; KAUFMANN et al., 2009) poderia auxiliar na diminuição das perdas econômicas.

Diante disto, buscou-se o estudo da resposta inflamatória uterina em vacas de corte após a inseminação artificial com sêmen de diferentes qualidades (B=Bom, 44,5 %

espermatozoides PIAIC; M=Médio, 23,0 % espermatozoides PIAIC; R= Regular, 8,5 % espermatozoides PIAIC), utilizando a técnica de lavagem uterina para a coleta de amostra endometrial, visando avaliar a interferência do tipo de sêmen na resposta inflamatória uterina, na hemodinâmica uterina e na taxa de prenhez dos animais.

Poucos estudos investigam o impacto da inflamação por meio da citologia imediatamente antes da inseminação (WILLIAMS et al., 1988) ou após a IA (KAUFMANN et al., 2009). Esta última se torna interessante uma vez que Troedsson et al. (1995) afirmam que a deposição do sêmen em éguas induziu resposta inflamatória, e que os primeiros neutrófilos foram encontrados no útero 30 minutos após a IA, sendo mais numerosos entre 4 e 24 horas (KATILA, 1995). Resposta inflamatória acentuada foi descrita Kotilainen et al. (1994) pela deposição intrauterina de sêmen congelado. Porém, Wendt et al. (2006) afirmam que as células espermáticas não desencadeiam resposta imunológica detectável em vacas, independentemente da preparação do sêmen.

Em acordo com Kotilainen et al. (1994) e Katila (1995). Troedsson et al. (1995) e Kaufmann et al. (2009) e seguindo a classificação proposta por Williams et al. (1988), foram encontradas endometrite de acentuada (acima de 75 % de células polimorfonucleares) em 2 % dos animais, endometrite de grau moderado (25 a 75 % de células polimorfonucleares) em 4,1 % dos animais e endometrite discreta (5 a 25 % de células polimorfonucleares) em 59,2 %, totalizando uma incidência de 65,3 % de casos de endometrite em vacas de corte diagnosticada através da lavagem uterina com solução salina após a inseminação artificial, incidência esta semelhante as citadas por Raab (2004), Gilbert et al. (2005); Hammon et al. (2006) e Barlund et al. (2008). Contradizendo o proposto por Wendt et al. (2006).

Pôde se observar que os animais que apresentaram graus variados de processo inflamatório (29 animais com Grau 1, dois animais com grau 2 e um animal com grau 3), apresentaram índice de prenhez inferior (34,4 % - 11/32 animais) àqueles que não apresentaram resposta inflamatória (52,9 % - 9/17 animais), indicando que o processo interfere negativamente na fertilização, exige novos serviços e aumenta o custo de produção, conforme também descrito por Borsberry e Dobson (1989); Kinsel (1996); Heuwieser et al. (2000) e Gilbert et al. (2005). Kasimanickam et al. (2004) também observaram que a endometrite subclínica causou redução da taxa de primeiro serviço significativamente diferente entre vacas com endometrite subclínica (18 %) e normais (32 %). Estes autores afirmam ainda que a taxa de concepção também foi significativamente diferente entre vacas com endometrite subclínica (35 %) e normais (61 %), e a taxa de prenhez em vacas leiteiras com endometrite foi de (41 a 51 %) em comparação às normais (68 %) no primeiro serviço.

Williams et al. (1988) afirmam ainda que endometrite subclínica antes da IA também apresenta correlação negativa com a concepção, e segundo Kaufmann et al. (2009), no período pós inseminação a endometrite pode ainda prejudicar o ambiente uterino e dificultar a implantação e o desenvolvimento do embrião, o que também foi constatado neste experimento.

Além disso, Januskauskas et al. (2001) afirmam que a qualidade do sêmen e sua relação com a fertilidade é um dos pontos mais importantes do sistema de produção, e que não há um único teste isolado capaz de predizer a fertilidade de uma amostra de sêmen com alta sensibilidade, o que também é confirmado por Verstegen et al. (2002); Arruda et al. (2004, 2005, 2006a, b, 2007); Freitas-Dell´Aqua et al. (2009) e Arruda et al. (2011). Para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia e atividade metabólica normal (ARRUDA et al., 2011), dependendo da integridade e função de todas as estruturas que compõem a célula espermática, como membrana plasmática, flagelo, mitocôndrias, acrossomo e cromatina (YANAGIMACHI, 1994; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997; ARRUDA et al., 2004, CELEGHINI, 2005; GILLAN, et al., 2005; ARRUDA et al., 2006b; CELEGHINI et al., 2010b, ARRUDA et al., 2011).

Essas estruturas espermáticas vinham sendo avaliadas separadamente por meio de técnicas fluorescentes que nem sempre correspondiam à capacidade fecundante do sêmen (CENTOLA et al., 1990; GRAHAM et al., 1990; SUKARDI et al., 1997; THOMAS et al., 1997; NAGY et al., 2003; CELEGHINI, 2005; ANDRADE et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007a; CELEGHINI et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2008; CELEGHINI et al., 2010b). Celeghini et al. (2007a) descreveram o uso da associação das sondas de iodeto de propídio (PI), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA) e JC-1, para avaliar concomitantemente a função de membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial, destacando a classificação desta última em alto e baixo potencial pelo marcador JC-1.

Baseado nisso, utilizou-se o protocolo descrito por Celeghini et al. (2007a) para classificar a células espermáticas em membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e alto potencial mitocondrial (PIAIC) em diferentes amostras de sêmen comercial, a fim de selecionar e classificar em Sêmen R, de qualidade regular, os que apresentavam cerca de 5 a 10 % de células espermáticas PIAIC, Sêmen M, de qualidade média, os que apresentavam 20 a 30 % de espermatozóides PIAIC e Sêmen B, de qualidade boa, os que continham cerca de 40 a 50 % de espermatozóides PIAIC. Esta classificação foi realizada com o intuito de

avaliar a interferência do sêmen na resposta inflamatória e na fertilidade dos animais.

Com relação a influência da qualidade do sêmen na fertilidade, conforme mencionada por Januskauskas et al. (2001); Verstegen et al. (2002); Arruda et al. (2004, 2005, 2006a,b, 2007); Celeghini (2005); Andrade et al. (2007); Freitas-Dell´Aqua et al. (2009) e Arruda et al. (2011) pode-se verificar que houve porcentagem maior de vacas prenhes inseminadas com sêmen B (60,32 %), seguida de porcentagem um pouco inferior de vacas inseminadas com o sêmen M (47,55 %), e queda maior na porcentagem de vacas inseminadas com o sêmen R (27,79 %), ocorrendo diferença significativa estatisticamente somente entre os sêmens B e R.

Concordando com Arruda et al. (2011) no que se refere a qualidade espermática estar relacionada a integridade e ao funcionamento de suas estruturas, e com Celeghini (2005) na afirmação de que células espermáticas com a membrana plasmática intacta, com acrossomo intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIC) refletem de forma mais direta a viabilidade dos espermatozoides. Tartaglione e Ritta (2004) também verificaram que a integridade das membranas plasmática e acrossomal estão correlacionadas com a taxa de fertilização (78 %) *in vitro* e 82,4 % quando incluídos resultados de Trypan blue/Giemsa. Já Brito et al. (2003) não encontraram esta mesma correlação de forma significativa. Alm et al. (2001) observaram baixa correlação (P = 0,016) entre fertilidade e viabilidade espermática, detectada pelo PI.

As correlações entre fertilidade a campo e espermatozóides com membrana plasmática lesada, detectada por PI, foram negativas entre partidas (r = -0,39) e touros (r = -0,57) de acordo com Januskauskas et al. (2001), que acrescentam correlações positivas entre fertilidade e espermatozoides com membrana plasmática intacta, avaliadas por H258, observadas entre partidas (r = 0,50) e touros (r = 0,58). Resultados similares foram observados por Januskauskas et al. (2003), que encontraram correlação significativa (P<0,05) entre fertilidade a campo após IA com sêmen criopreservado bovino, e espermatozóides com membrana plasmática lesada, positivas ao PI, sobre partidas de sêmen (r = -0,40) e sobre touros (r = -0,56). Anzar et al. (2002) também observaram correlação negativa entre fertilidade a campo e espermatozóides corados com PI (r = >-0,87) em sêmen fresco bovino. No entanto, no presente trabalho não foi possível avaliar a correlação entre a qualidade da membrana plasmática, acrossoma e potencial mitocondrial com a taxa de prenhez.

Tartaglione e Ritta (2004) sugerem que quanto maior o número de análises realizadas, maior a possibilidade em predizer a fertilidade, sendo assim a técnica validada

por Celeghini et al. (2007a) apresenta resultados bastante satisfatórios sobre o *status* das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides bovinos, utilizando metodologia prática para aplicação comercial, e de funcionalidade comprovada neste experimento.

5.6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste experimento, pode-se concluir que:

1. A utilização de sêmen com menor percentual de espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial (PIAIC) causa redução na taxa de fertilidade em bovinos.

2. A deposição de sêmen com menores percentuais de espermatozoides PIAIC no trato reprodutivo de fêmeas bovinas não altera a resposta inflamatória uterina após IA, detectáveis por citologia endometrial, ou alterações da hemodinâmica uterina avaliada por ultrassonografia.

3. A hemodinâmica uterina em vacas é influenciada pelo momento de avaliação.

Referências

REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira de Industrias Exportadoras de Carne. Estatística: balanço de pecuária. 2013. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/texto.asp?id=8>. Acessado em: 15 abr. 2013.

ALGHAMDI, A. S.; FOSTER, D. N.; TROEDSSON, M. H. T. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. **Reproduction**, v. 127, p. 593-600, 2004.

ALM, K.; TAPONEN, J.; DAHLBOM, M.; TUUNAINEN, E.; KOSKINEN, E.; ANDRESSON, M. A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. **Theriogenology**, v. 56, p. 677-684, 2001.

ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M. M. K.; RAPHAEL, C. F.; MORETTI, A. S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction Domestic Animal**, v. 42, p.190-194, 2007.

ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M. M.; KROETSCH, T. G.; PAULS, K. P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytomtetry and its relationship with fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 354-360, 2002.

ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C. C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 8-16, 2007.

ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; ZAFFALON, F. G.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; TARRAGÓ, O. F. B.; MARTINS, S. M. M. K.; ALONSO, M. A. Addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation in post-thawed equine sperm. **Animal Reproduction Science,** v. 7, p. 285-285, 2010a.

ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; GARCIA, A. R.; LIU, I. K. M. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. **Theriogenology**, v. 58, p. 253-256, 2002.

ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozóides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 226-227, 2003. Supplement.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; GARCIA, A. R.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; SOUZA, L. W. O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina, PR. Londrina: [s.n.], 2004. v. 1, p. 166-179.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; PERES, K. R. Biotécnicas aplicadas a la evaluación de sêmen criopreservado bovino. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCION EN

GRANDES ANIMALES**,** 5., Bogotá, Colômbia. Bogota: [s.n.], 2006a.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; PERES, K. R.; NEVES, L. C. Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina, PR. Londrina: [s.n.], 2006b. p.157-164.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; SOUZA, L. W. O.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; GARCIA, A. R. Importance of semen quality in fixed-time artificial insemination and embryo transfer program. **Acta Scientiae Veterinariae,** v. 33, p. 145-150, 2005.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.

ARRUDA, R. L.; ORROS, I. R.; PASSOS, T. S.; COSTA E SILVA, E. V.; ZÚCARI, C. E. S. N. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 168-184, 2010b.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 145-151, 2011.

ASBIA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. **Relatório anual**. São Paulo: ASBIA, 2011. p. 1-21.

AX, R. L.; DALLY, M. R.; DIDION, B. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E. Inseminação Artificial. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal.** 7. ed. Barueri, SP : Manole, 2004. p. 381-394.

BAGGIOLINI, M.; BOULAY, F.; BADWEY, J. A.; CURNUTTE, J. T. Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. **Faseb Journal**, v. 7, p. 1004-1010, 1993.

BALL, B. A. Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. **Theriogenology,** v. 29, p. 1269–1283, 1988.

BARLUND, C. S.; CARRUTHERS, T. D.; WALDNER, C. L.; PALMER, C. W. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 714–723, 2008.

BARTLETT, P. C.; KIRK, J. H.; WILKE, M. A.; MATHER, E. C. Metritis complex in Michigan Holstein–Friesian cattle: incidence descriptive epidemiology and estimated economic impact. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 4, p. 235–248, 1986.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.

BERGER, T. Fertilization in ungulates. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 351-360, 1996.

BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; WOSCHEE, I.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine and umbilical blood flow during pregnancy in mares. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 499-509, 2004.

BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 597-605, 2003.

BOLLWEIN, H.; MEYER, H. H.; MAIERL, J.; WEBER, F.; BAUMGARTNER, U.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2053–2061, 2000.

BONNETT, B. N.; MILLER, R. B.; ETHERINGTON, W. G.; MARTIN, S. W.; JOHNSON, W. H. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows-I. Technique, histological criteria and results. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 55, p. 155–161, 1991.

BORSBERRY, S.; DOBSON, H. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. **Veterinary Records**, v. 124, p. 217–219, 1989.

BOURKE, M.; MILLS, J. N.; BARNES, A. L. Collection of endometrial cells in the mare. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, p. 755–758, 1997.

BRAUNDMEIER, A. G.; MILLER, D. J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1915-1925, 2001.

BRETZLAFF, K. N. Rationale for treatment of endometritis in the dairy cow. **Veterinary Clinics of North America**, (Food Anim Pract), v. 3, p. 593–607, 1987.

BRITO, L. F.; BARTH, A. D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. L.; KASTELIC, J. P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology,** v. 60, n. 8, p. 1539-1551, 2003.

BROOK, D. Uterine cytology. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.). **Equine reproduction.** 2nd ed. London: Lea and Febiger, 1993. p. 246–254.

BUTT, B. M.; SENGER, P. L.; WIDDERS, P. R. Neutrophil migration into bovine uterine lumen following intrauterine inoculation with killed Haemophilus somnus. **Journal Reproduction & Fertilit*y***, v. 93, p. 341–345, 1993.

CARD, C. Post-Breeding inflammation end endometrial cytology in mares. **Theriogenology**, v. 64, p. 580-588, 2005.

CARVALHO, C. F.; ADDAD, C. A. Doppler: histórico e princípios físicos. In: CARVALHO, C. F. **Ultrassonografia doppler em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2009. p. 3-14.

CBRA. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49 p.

CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.;

TICIANELLI, J. S.; ARRUDA, R. P. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 1285-1292, 2010a.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J., RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopresrvation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science,** v. 104, p. 119-131, 2008.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction of Domestic Animals,** v. 42, p. 479-488, 2007a.

CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes of ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 62, p. 536-543, 2010b.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes.** 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ALBUQUERQUE, R.; SILVA, F. H. A.; FARIA, D. E.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Utilization of fluorescent probe association for simultaneous assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes in fowl spermatozoa. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, p. 143-149, 2007b.

CENTOLA, G. M.; MATTOX, J. H.; BURDE, S. LEARY, J. F. Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. **Molecular Reproduction and Development,** v. 27, p. 130-135, 1990.

CHUANG, H. Y.; CHENG, T. C.; HUANG, C. C.; LEE, M. S. Doppler ultrasound assessment of ascendant uterine artery perfusion in IVF programme. **Journal of Reproduction and Infertility**, v. 8, n. 4, p. 174-180, 1999.

COLEMAN, D. A.; THAYNE, W. V.; DAILEY, R. A. Factors affecting reproductive performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 1793–1803, 1985.

COSSON, J. A. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, v. 20, p. 83-94, 1996.

CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 635-641, 1989.

CROSS, N. L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J. W.; HANSON, F. W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Research,** v. 15, p. 213-226, 1986.

CURTIS, C. R.; ERB, H. N.; SNIFFEN, C. J.; SMITH, R. D.; KRONFELD, D. S. Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders and mastitis in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2347–2360, 1985.

DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D.; ALVARENGA, M. A.; MACEDO, L. P.; MELO, C. M. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen, **Animal Reproduction Science,** v. 94, p. 270-273, 2006.

DIJKHUIZEN, A. A.; STELWAGEN, J.; RENKEMA, J. A. Economic aspects of reproductive failure in dairy cattle. I. Financial loss at the farm level. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 3, p. 251–263, 1985.

DOBSON, H.; SHELDON, I. M. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**, v. 68, p. 549–559, 2007.

ELLENBERGER, C.; RODENBUSCH, S.; HAUFFE, C.; LENZ, M.; KIEßLING, A.; SOBIRAJ, A.; SCHOON, H. A. Subklinische fertilitätsstörungen beim rind - Welchen beitrag kann die pathologie leisten? **Subklinische Fruchtbarkeitsstörungen beim Rind**., Leipzig 2006. 28–36.

FERGUSON, J. D.; GALLIGAN, D. T. Assessment of reproductive efficiency in dairy herds. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian,** v. 22, p. S150–S158, 2000.

FERREIRA, J. C.; IGNÁCIO, F. S.; MEIRA, M. Uterine vascular perfusion and spectral-Doppler measurements during the early gestation in mares: news concepts of evaluation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 10., 2010, Lexington, KY, USA. **Proceedings…** Lexington: Elsevier, 2010. v. 1. p. 281-283.

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

FIALA, S. M. E.; PIMENTEL, C. A.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology,** v. 67, p. 556-562, 2007.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FLOREZ RODRIGUEZ, S. A. **Efeitos de diferentes diluidores sobre a cinética, membranas, morfologia e cromatina espermáticas durante a refrigeração do sêmen equino.** 2013. 153 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2013.

FORD, S. P.; CHENAULT, J. R.; ECHTERNKAMP, S. E. Uterine blood flow of cows during the oestrous cycle and early pregnancy: effect of the conceptus on the uterine blood supply. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 56, p. 53–62, 1979.

FORD, S. P. Control of uterine and ovarian blood flow throughout the estrous cycle and pregnancy of ewes, sows and cows. **Agriculture and Home Economics Experience,** Sta the Iowa. n. 10418, p. 2443-2444, 1994.

FOURICHON, C.; SEEGERS, H. Malher X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. **Theriogenology**, v. 53, p. 1729–1759, 2000.

FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 213-222, 2009.

GARNER, D. L.; PINKEL, D. P.; JOHNSON, L. A. PACE, M. M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986.

GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, E. C. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reprodction,** v. 57, p. 1401-1406, 1997.

GILBERT, R. O.; GROHN, Y. T.; MILLER, P. M.; HOFFMAN, D. J. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 36, p. 75–82, 1993.

GILBERT, R. O.; SHIN, S. T.; GUARD, C. L.; ERB, H. N. Incidence of endometritis and effects on reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 251, 1998.

GILBERT, R. O. Bovine endometritis: the burden of proof. **Cornell Veterinary**, v. 82, p. 11–14, 1992.

GILBERT, R. O.; SHIN, S. T.; GUARD, C. L.; ERB, H. N.; FRAJBLAT, M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology,** v. 64, p. 1879-1888, 2005

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.

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

GINTHER, O. J.; MATTHEW, D. U. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24 p. 516-526, 2004.

GLENTHOJ, A.; BOSTOFTE, E.; RANK, F. Brush cytology from the uterine endocervix. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica Journal**, v. 65, p. 689–691, 1986.

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytomitry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; BAUMBER, J.; BALL, B. A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology,** v. 53, p. 1691-1703, 2000.

GREISS, F. C.; ANDERSON, S. G. Uterine vascular changes during the ovarian cycle. American Journal Obstetric Gynecology. v. 103, p. 629, 1969.

GUARD, C. L. Costs of clinical disease in dairy cows. In: ANNUAL CORNELL CONFERENCE ON VETERNITY**,** 66, 1994, Ithaca, NY. Proceedings… Ithaca, NY: Cornell University, 1994.

GUVENC, K.; REILAS, T.; KATILA, T. Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. **Theriogenology,** v. 63, p. 2504–2512, 2005.

HAMMON, D. S.; EVJEN, I. M.; DHIMAN, T. R.; GOFF, J. P.; WALTERS, J. L. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. **Veterinay Immunol Immunopathology,** v. 113, p. 21–29, 2006.

HAMMON, D. S.; HOLYOAK, G. R.; JENSON, J.; BINGHAM, H. R. Effects of endometritis at the beginning of the breeding period on reproductive performance in dairy cows. In: ANNUAL CONFERENCE AMERICAN ASSOCIATION BOVIVE PRACTICE, 34., Vancouver. **Proceedings…** 2001. p. 142–143.

HARRINGTON, K. F.; CAMPBELL, S.; BEWLEY, S.; BOWER, S. Doppler velocimetry studies of the uterine artery in the early prediction of pre-eclampsiaa nd intra-uterineg rowth retardation. **European Journal of Obstetrics & Gynecology Reprodutive Biology**, v. 42, p. 14-20, 1991.

HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. Applications of doppler utrasonography in cattle reproduction. **Reproduction in Domestic Animal,** v. 42, p. 51-58, 2007.

HEUWIESER, W.; TENHAGEN, B. A.; TISCHER, M.; LUHR, J.; BLUM, H. Effect of three programs for the treatment of endometritis on the reproductive performance of a dairy herd. **Veterinary Records**, v. 146, p. 338–341, 2000.

HOLDEN, C. A.; ROSS, V. H.; SATHANANTHAN, A. H.; TROUNSON, A. O. Assessment of the human sperm acrosome reaction using concavalian A lectin. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, p. 247-257, 1990.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from swedish AI bulls. **Theriogenology**, v. 55, p. 947-981, 2001.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology,** v. 60, p. 743-758, 2003.

JONES, K. H.; SENEFT, J. A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate – propidium iodide. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 33, n. 1, p. 77-79, 1985.

KASIMANICKAM, R.; CORNWELL, J. M.; NEBEL, R. L. Effect of presence of clinical and subclinical endometritis at the initiation of Presynch- Ovsynch program on the first service pregnancy in dairy cows. **Animals Reproduction Science**, v. 95, p. 214–223, 2006.

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A.; GARTLEY, C. J.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S. JOHNSON, W. H. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 62, p. 9-

23, 2004.

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A.; GARTLEY, C. J.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. **Canadian Veterinary Journal**, v. 46, p. 255–259, 2005a.

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A.; GARTLEY, C. J.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. The effect of a single administration of cephapirin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 63, p. 818–830, 2005b.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 515–517, 1995.

KATILA, T. Sperm – uterine interactions: a review. **Animal Reproduction Science,** v. 68, p. 267–272, 2001.

KAUFMANN, T. B.; DRILLICH, M.; TENHAGEN, B. A.; FORDERUNG, D.; HEUWIESER, W. Prevalence of bovine subclinical endometritis 4 h after insemination and its effects on first service conception rate. **Theriogenology**, v. 71, p. 385-391, 2009.

KAVAK, Z. N.; EREN, F.; PEKIN, S.; KULLU, S. A randomised comparison of the 3 Papanicolaou smear collection methods. **Australian New Zealand Journal Obstetric & Gynaecology**, v. 65, p. 689–691, 1995.

KOTILAINEN, T.; HUTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, v. 41, p. 629–636, 1994.

KINSEL, M. L. Dairy cow postpartum disease: definition, decision and dilemma. In: ANNUAL CONVENTION PROCEEDINGS OF AMERICAN ASSOCIATION OF BOVINE PRACTITIONERS, 29., 1996, San Diego, CA, USA, **Proceedings…** 1996. p. 3–7.

LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v. 60/61, p. 327-336, 2000.

LEBLANC, M. M.; MAGSIG, J.; STROMBERG, A. J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**, v. 68, p. 403–412, 2007.

LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; KEEFE, G. P.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 2223–36, 2002.

LINCKE, A. **Untersuchung zur Behandlung von subklinischen Endometritiden des Milchrindes mit proteolytischen Enzymen oder Prostaglandin F2alpha**. Dissertation: Free University of Berlin, 2006.

MADUREIRA, E. H.; PIMENTEL, J. R. V. IATF como uma ferramenta para melhorar eficiência reprodutiva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 16, 2005, Goiânia, **Anais..**. Goiânia, GO. 2005.

MATEUS, L.; LOPES DA COSTA, L.; BERNARDO, F.; ROBALO SILVA, J. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 31–35, 2002a.

MATEUS, L.; LOPES DA COSTA, L.; CARVALHO, H.; SERRA, P.; ROBALO SILVA, J. Blood and intrauterine leukocyte profile and function in dairy cows that spontaneously recovered from postpartum endometritis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 176–180, 2002b.

MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Análise computarizada de espermatozóides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 225-232, 2008.

MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Evaluation of ovarian blood by color Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. **The Veterinary Journal**, v. 181, n. 3, p. 1-9, 2008.

MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometricsorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 1165-1178, 1997.

MEDAN, M. S.; EL-ATY, A. M. A. Advances in ultrasonography and its applications in domestic ruminants and other farm animals reproduction. **Journal of Advanced Research**, n. 1, p. 123-128, 2010.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; HAYASHI, K. G.; KAMADA, D.; KAWASHIMA, C.; KANEKO, E.; ACOSTA, T. J.; MATSUI, M. A pontential use of colo ultrasound as a tool for reproductive management: New observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. **Journal of Reproduction and Development,** v. 52, n. 1, p. 153-160, 2006.

MILLER, H. V.; KIMSEY, P. B.; KENDRICK, J. W.; DARIEN, B.; DOERING, L.; FRANTI, C.; HORTON, J. Endometritis of dairy cattle: diagnosis, treatment, and fertility. **Bovine Practice,** v. 15, p. 13–23, 1980.

NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E.K.; GADELLA, B. M. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma –and acrosome membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biology of Reproduction,** v. 68, p. 1828-1835, 2003.

NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F. ALONSO, M. A.; CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. Effects of sperm concentration and volume of straws on motion characteristics and plasma, acrosomal and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 351-358, 2008.

NASH, D. M.; SHELDON, I. M.; HERATH, S.; LANE, E. A. Markers of the uterine innate immune response of the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 31-39, 2010.

NEBEL, R. L. Optimizing fertility in the dairy herd. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION, 38., 1999. Nashville, TN, USA, **Proceedings…** 1999. p. 443–452.

NIKOLAKOPOULOS, E.; WATSON, E. D. Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares. **Equine Veterinary Journal,** v. 32, n. 2, p. 164-166, 2000.

OLIVEIRA, B. M. M. **Hemodinâmica uterina avaliada por ultrassom Doppler colorido e taxa de fertilidade de vacas submetidas à IATF com sêmen analisado por sondas fluorescentes.** 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2012.

ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v. 122, p. 105-151, 1990.

PAPA, F. O.; GABALDI, S. H.; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelação de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, p. 39-44, 2000.

PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; ROLDAN, E. R. S. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or the eosin: accuracy in the assessment of cell viability. **Journal of Reproduction & Fertility,** v. 118, p. 145-152, 2000.

RAAB, D. **Evaluierung der Cytobrush-Methode zur Diagnostik von subklinischen Endometritiden und Auswirkungen der Entzu¨ndung auf die folgende Fruchtbarkeitsleistung von Milchku hen**. Dissertation. Free Universitiy of Berlin, 2004.

REERS, M.; SMITH, T. W.; CHEN, L. B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicador of membrane potencial. **Biochemistry**, v. 30, n. 18, p. 4480-4486, 1991.

RIBEIRO, A. P.; VICENTE, W. R.; APPARICIO, M.; GADELHA, C. R.; ALVES, A. E.; COVIZZI, G. J. Uterine leucocyte infiltration after artificial insemination in bitches. **Theriogenology,** v. 66, p. 1462–1464, 2006.

ROBERTSON, S. A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. **Cellular and Tissue Research**, v. 322, p. 43-52, 2005.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ZHANG, B. R.; LARSSON, B. Bovine semen quality and the ability to produce embryos *in vivo* and *in vitro*. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 25, p. 108-126, 1997. Supplement.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction of Domestic Animal**, v. 38, p. 312-318, 2003.

ROSZEL, J. F.; FREEMAN, K. P.; Equine endometrial cytology. **Veterinary Clinics of North American: Equine Practice**, v. 4, p. 247–262, 1988.

ROZEBOOM, K. J.; TROEDSSON, M. H.; CRABO, B. G. Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 114, p. 195–199, 1998.

SAACKE, R. G.; NADIR, S.; DALTON, J.; NEBEL, R.L.; BAME, J. Involvement of the bull and artificial insemination in fertility and embryo quality. In: REUNIÃO ANUAL DA

SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 10., 1995, São Paulo, SP. 1995. p. 1-17.

SANTOS, N. R.; LAMB, G. C.; BROWN, D. R.; GILBERT, R. O. Postpartum endometrial cytology in beef cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 739-745, 2009.

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 35-50, 2004. Supplement.

SAS Institute Inc., **SAS OnlineDoc**, v. 9.1.3, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2005.

SCHOLTES, M. C.; WLADIMIROFF, J. W.; VAN-RIJEN, H. J.; HOP, W. C. Uterine and ovarian flow velocity waveforms in the normal menstrual cycle: a transvaginal Doppler study. **Fertility and Sterility**, v. 52, p. 981-985, 1989.

SHELDON, I.M.; LEWIS, G. S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R. O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 1516–1530, 2006.

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

SILVA, L. A.; GINTHER, O. J. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. **Reproduction Research,** n. 139, p. 453–463, 2010.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.

SLAMA, H.; VAILLANCOURT, D.; GOFF, A. K. Control of in vitro prostaglandin F2 alpha and E2 synthesis by caruncular and allantochorionic tissues from cows that calved normally and those with retained fetal membranes. **Domestic Animals Endocrinology**, n. 11, p. 175–185, 1994.

SPITZER, J. C. Influences of nutrition on reproduction in beef cattle. In: MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p. 231-234.

STUDER, E.; MORROW, D. A. Postpartum evaluation of bovine reproductive potential: Comparison of findings from genital tract examination per rectum, uterine culture and endometrial biopsy. **Journals American Veterinary Medical Association**, v. 172, p. 489–494, 1978.

SUAREZ, S. S. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 103–110, 2007

SUAREZ, S. S.; PACEY, A. A. Sperm transport in the female reproductive tract. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 1, p. 23–37, 2006.

SUGULLE, A. H.; BHUIYAN, M. M. U.; SHAMSUDDIN, M. Breeding soudness of bulls and the quality of their frozen semen used in cattle artificial insemination in Bangladesh. **Livestock Reseach R. Development**, v. 18, n. 54, 2006. Disponível em: <http://www.lrrd.org/lrrd18/4/sugu18054.htm>. Acesso em: 12 abr. 2012.

SUKARDI, S.; CURRY, M. R.; WATSON, P. F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science**, v. 46, p. 89-96, 1997.

TAN, S. L.; ZAIDI, J.; CAMPBELL, S.; DOYLE, P.; COLLINS, W. Blood flow changesin the ovarian and uterine arteries during the normal menstrual cycle. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 175, p. 625-631, 1996.

TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology,** v. 62, p. 1245-1252, 2004.

THOMAS, C. A.; GARNER, D. L.; DEJARNETTE, J. M. Fluorometric assessments of acrossomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 991-998, 1997.

TROEDSSON, M. H. T. Uterine response to semen deposition on the mare. Proc Soc ***Theriogenology***, p.130–5, 1995.

TROEDSSON, M. H. T.; IBRAHIM, N. M.; KING, V. L.; FOSTER, D. N.; CRABO, B. G. Post-breeding endometritis: the role of seminal components. **Pferdeheilkunde,** v. 13, p. 542, 1997.

TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in mare. **Theriogenology,** v. 52, p. 461-471, 1999.

TROEDSSON, M. H. T.; LOSET, K.; ALGHAMDI, B.; et al. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. **Animal Reproduction Science,** v. 68, p. 238–273, 2001.

TROEDSSON, M. H. T. Breeding-induced endometritis in the mare. In Carnevale EM, editor. **Veterinary Clinics of North American: Equine Practice**, v. 2, p. 705–712, 2006.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology,** v. 57, p. 149-179, 2002.

WAITE, L. R.; FORD, S. P.; YOUNG, D. F.; CONLEY, A. J. Use of ultrasonic Doppler waveforms to estimate changes in uterine artery blood flow and vessel compliance. **Journal Animal Science,** v. 68, p. 2450-245, 1990.

WATSON, E. D.; DIEHL, N. K.; EVANS, J. F. Antibody response in the bovine genital tract to intrauterine infusion of Actinomyces pyogenes. **Research in Veterinary Science**, v. 48, p. 70–75, 1990.

WATSON, E. D. The causes of reduced fertility with frozen semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION**,** 14., 2000. p. 481–492.

WENDT, H.; ZERBE, H.; MICHELMANN, H. W.; SCHUBERTH, H. J.; RATH, D. Immunological response in the bovine uterus after artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, Hannover Germany, v. 41, p. 40, 2006. Supplement, 1.

WERNER, R. P. **Patologia geral vaterinária aplicada**. São Paulo: Roca, 2010. p. 223-270.

WILLIAMS, E. J.; FISCHER, D. P.; NOAKES, D. E.; ENGLAND, G. C.; RYCROFT, A.; WINGFIELD-DIGBY, N. J. The technique and clinical application of endometrial cytology in mares. **Equine Veterinary Journal,** v. 10, p. 176–180, 1987.

YANAGIMACHI, R. MAMMALIAN FERTILIZATION. IN: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p. 189-317.

YANIK, L. The basics of Doppler ultrasonography. **Veterinary Medicine,** v. 3, p. 388-400, 2002.

Anexos

ANEXO A – SETUP-HAMILTON THORNE BIOSCIENCES PARA ANAÁLISE DE SEMEN BOVINO

Característica	**Ajuste**
Número de imagens adquiridas (Image capture: frames)	30
Taxa de aquisição das imagens (Image caprure: frames per sec)	60 Hz
Contraste mínimo da célula (Cell detection: minimum contrast)	80 pixels
Tamanho mínimo da célula (Cell detection: minimum size)	5 pixels
Tamanho para células imóveis (Defauts: cell size)	5 pixels
Intensidade para células imóveis (Defauts: cell intensity)	80 pixels
Referência de VAP para células progressivas (Progressive cells: VAP)	40,0 µm/s
Referência de STR para células progressivas (Progressive cell: STR)	60%
Referência de VAP para células lentas (Slow cells: VAP Cut-off)	30,0 µm/s
Referência de VSL para células lentas (Slow cells: VSL Cut-off)	15,0 µm/s
Limite superior de tamanho da célula (Qc plots: Static size gates-Max)	3,92
Limite inferior do tamanho da célula (Qc plots: Static size gates-Min)	0,1
Limite superior de intensidade da célula (Qc plots: Static intensity gates-Max	1,7
Limite inferior da intensidade da célula (Qc plots: Static intensity gates-Min)	0,3
Limite superior de alongamento da célula (Qc plots: Cell elongation-Max)	97%
Limite inferior de alongamento da célula (Qc plots: Cell elongation-Min)	8%
Aumento (optics: Magnification)	1,89
Temperatura (Stage: Set stage temperature) 37°C	37°C

Apêndice

APÊNDICE A – EXPERIMENTO 1

Resumo da análise da variância para os grupos EU e LU, em relação aos momentos de coleta

Fontes de variação	GL do Numerador	GL do Denominador	Valor de F	Pr > F
Tempo	1	15	156,92	< 0,0001**
Grupo	1	15	14,84	0,0016**
Tempo X Grupo	1	15	0,53	0,4776 ns

Notas: **P<0,01(significativo a 1% de probabilidade); ns = P>0,05(não-significativo).

Resumo da análise da variância para a média de índice de resistência (RI) das artérias uterinas nos grupos de tratamento (LU e SE)

Fontes de variação	GL do Numerador	GL do Denominador	Valor de F	Pr > F
Tempo	3	51	5,43	0,0026**
Grupo	1	17	0,17	0,6894 ns
Interação Tempo x Grupo	3	51	0,84	0,4771 ns

Notas: **P<0,01(significativo a 1% de probabilidade); ns = P>0,05 (não-significativo).

Resumo da análise da variância para a média dos escores de vascularização (0 a 4) uterina para os grupos de tratamento (EU e LU)

Fontes de variação	GL do Numerador	GL do Denominador	Valor de F	Pr > F
Tempo	3	51	5,89	0,0016**
Grupo	1	17	1,95	0,1804 ns
Interação Tempo x Grupo	3	51	0,04	0,9873 ns

Notas: **P<0,01(significativo a 1% de probabilidade); ns = P>0,05 (não-significativo)

APÊNDICE B – EXPERIMENTO 3

Resumo da análise da variância para o efeito de lote e grau de inflamação endometrial, em relação a porcentagem de células inflamatórias

Fontes de variação	GL do Numerador	GL do Denominador	Valor de F	Pr > F
Lote	1	43	1,45	0,2358 ns
Grau de inflamação	2	43	290,07	<0,0001**

Notas: **P<0,01 (significativo a 1% de probabilidade); nsP>0,05 (não-significativo).

Resumo da análise da variância para o lote e grau de inflamação endometrial, em relação ao volume recuperado na coleta

Fontes de variação	GL do Numerador	GL do Denominador	Valor de F	Pr > F
Lote	1	43	0,01	0,9417 ns
Grau de inflamação	2	43	0,69	0,5062 ns

Notas: **P<0,01 (significativo a 1% de probabilidade); nsP>0,05 (não-significativo).

Resumo da análise da variância para a variável média de índice de resistência (RI) em relação aos tempos de obtenção dos dados, 34 horas antes da inseminação e 4 horas após a IA

Fontes de variação	GL do Numerador	GL do Denominador	Valor de F	Pr > F
Tempo	1	49	63,70	<0,0001 **
Sêmen	2	49	1,87	0,1656 ns
Tempo x Sêmen	2	49	0,12	0,8913 ns

Notas: **P<0,05 (significativo a 5% de probabilidade); nsP>0,05 (não-significativo).

Resumo da análise da variância para a variável média de escore de vascularização (EV) uterina em relação aos tempos de obtenção dos dados, 30 horas antes da inseminação e 4 horas após a IA

Fontes de variação	GL do Numerador	GL do Denominador	Valor de F	Pr > F
Tempo	1	49	26,86	<0,0001 **
Sêmen	2	49	0,66	0,5223 ns
Tempo x Sêmen	1	49	4,45	0,0167 *

Notas: **P<0,05 (significativo a 5% de probabilidade); nsP>0,05 (não-significativo).