BRUNA MARCELE MARTINS DE OLIVEIRA

Hemodinâmica uterina avaliada por ultrassom Doppler colorido e taxa de fertilidade de vacas submetidas à IATF com sêmen analisado por sondas fluorescentes

São Paulo

2012

BRUNA MARCELE MARTINS DE OLIVEIRA

Hemodinâmica uterina avaliada por ultrassom Doppler colorido e taxa de fertilidade de vacas submetidas à IATF com sêmen analisado por sondas fluorescentes

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Prof^a Dr^a Eneiva Carla Carvalho Celeghini

São Paulo

2012

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

3/11/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2537
FMVZ

Oliveira, Bruna Marcelle Martins de

Hemodinâmica uterina avaliada por ultrassom Doppler colorido e taxa de fertilidade de vacas submetidas à IATF com sêmen analisado por sondas fluorescentes / Bruna Marcelle Martins de Oliveira. -- 2012.
92 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini.

1. Vascularização uterina. 2. Endometrite pós-cobertura. 3. Qualidade seminal.
4. Bovinos. 5. Associação de sondas fluorescentes. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Hemodinâmica uterina avaliada por ultrassom Doppler colorido e taxa de fertilidade de vacas submetidas à IATF com sêmen avaliado por sondas fluorescentes", protocolado sob o nº 2050/2010, utilizando 370 (trezentos e setenta) 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 hemodynamics assessed by color Doppler ultrasound and fertility rate of cows submitted to FTAI with semen evaluated by fluorescent probes", protocol number 2050/2010, utilizing 370 (three hundred and seventy) 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, 19 de dezembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome : OLIVEIRA, Bruna Marcelle Martins de

Título: Hemodinâmica uterina avaliada por ultrassom Doppler colorido e taxa de fertilidade de vacas submetidas à IATF com sêmen analisado por sondas fluorescentes.

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Dedico aos meus pais e irmãos, com muito amor e carinho.

É uma alegria imensa tê-los em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Por todas as graças concedidas, pela conclusão dessa dissertação e por permitir que eu continue trabalhando na construção da minha profissão.

Aos meus pais Osni e Telma,

Por todo amor, carinho, atenção, dedicação e torcida por minhas vitórias. Por entenderem minha ausência em festas de aniversário e eventos familiares e por valorizarem meu esforço, compreendendo a importância da carreira acadêmica e se orgulhando por eu trilhar esse caminho. Amo vocês!

Aos meus irmãos Camila, Anicky e Leandro,

Pelos momentos maravilhosos que temos juntos, pelo amor incondicional, pela cumplicidade, pelas conversas de madrugada, pelos momentos de consolo e aconchego no ombro de cada um, por vocês existirem! Cada simples momento se torna prazeroso se vocês estiverem comigo. Eu não seria completa sem vocês, meus amores!

À Profª Drª Eneiva Carla Carvalho Celeghini,

Por servir de exemplo, pela orientação, pelos ensinamentos, pela confiança e principalmente por toda compreensão e carinho que pude desfrutar nesse tempo de convívio. Com você meu aprendizado não foi somente técnico. Você é um ser humano raro e será sempre uma referência para mim. Ser sua primeira orientada é uma honra!

Ao Leonardo Trindade Martines,

Por ter me estimulado sempre, confiando e acreditando em mim. Compreendendo minhas viagens e momentos de ausência. Se você não acreditasse, a realização deste trabalho teria sido muito mais difícil. Obrigada por se orgulhar de mim. Te amo!

Aos irmãos Bruno e Flávio,

Existem algumas pessoas que Deus resolve colocar nas nossas vidas e a partir deste momento elas se tornam importantíssimas. Agradeço por vocês serem uma delas. Irmão não precisa necessariamente ter o mesmo sangue correndo nas veias.

Ao Milton Maturana Filho,

Por toda ajuda na realização prática deste trabalho e na estatística. Por todos os ensinamentos, por me dar espaço para praticar, perguntar e aprender. Agradeço principalmente pela amizade que construímos, tenho certeza de que é para vida inteira.

Aos meus avós Ismênia (*in memoriam*), Francisco, Aparecida e José,

Por terem participado de tantos momentos comigo. A vida é muito mais gostosa quando os avós estão presentes. O meu amor por vocês é um dos sentimentos mais puros que existe. Se estou aqui hoje é porque vocês foram fortes para enfrentar todas as batalhas.

Ao Helder Esteves Thomé,

Pelo trabalho em equipe e por toda a grande ajuda neste trabalho.

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.

Aos funcionários da Fazenda Fronteira,

Que pacientemente auxiliaram na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano Andrade Silva,

Por toda paciência, pelos ensinamentos e por não medir esforços para sanar minhas dúvidas. Sua humildade e simpatia são admiráveis.

Ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda,

Por compartilhar sua ampla experiência, trabalhando sempre pela formação e educação de profissionais competentes. Obrigada por participar da construção da minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira,

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

À Profª Drª Claudia Barbosa Fernandes,

Por ter me acolhido como “sua” orientada, pelas oportunidades que me concedeu, pelas hospedagens, pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. André Furugen de Andrade,

Pela boa vontade e colaboração na estatística.

À Drª Juliana Nascimento Bittar,

Por ter me incentivado a ingressar na pós-graduação. Obrigada por todo apoio.

Aos bolsistas de treinamento técnico Carina Guimarães e Guilherme Oliveira,

Pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, cumplicidade e momentos que passamos juntos.

À Nadya Garcia Bianchi Pereira,

Que me auxiliou nos momentos difíceis, me acalmando quando necessário, fazendo com que eu sempre acreditasse em mim e me mostrando os caminhos mais corretos.

Aos amigos pós-graduandos,

Shirley Florez, Carina Guimarães, Fernanda Regazzi, Gisele Veiga, Liege Garcia, Cristina Lúcio, Daniel Angrimani e todos os outros que tornaram meus dias mais alegres. Agradeço pelas experiências trocadas, pelos momentos de diversão, pelas risadas e pelos ensinamentos que levo de cada um.

À família Trindade Martines,

Que me acolheu com tanto carinho, sempre fazendo questão de participar dos momentos importantes, me incentivando e dividindo comigo minhas conquistas.

À Harumi Doi Shiraishi,

Por toda atenção e disponibilidade em atender os pós-graduandos.

Aos professores e funcionários do VRA,

Pelo convívio e apoio na execução deste trabalho.

A todos os membros da FMVZ,

Que de alguma maneira contribuíram para que esse trabalho fosse realizado. Obrigada pelo acolhimento.

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

Pelo auxílio financeiro (processos n. 2009/50365-0 e 2010/03997-8).

Muito obrigada!

RESUMO

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. [Uterine hemodynamics assessed by color Doppler ultrasound and fertility rate of cows submitted to FTAI with semen analyzed by fluorescent probes]. 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Após a inseminação artificial, as fêmeas apresentam reação inflamatória transitória e fisiológica, que pode resultar em alterações na vascularização uterina. A ultrassonografia Doppler colorido é uma técnica não invasiva, que vem sendo utilizada para estudar a hemodinâmica do trato reprodutivo de bovinos. Os objetivos deste trabalho foram verificar a resposta inflamatória uterina por ultrassonografia Doppler colorido e a taxa de fertilidade em bovinos após inseminação artificial (IA) com sêmen avaliado por sondas fluorescentes. Para isso foram delineados dois experimentos. O experimento 1 foi realizado para estudar a hemodinâmica uterina por ultrassonografia Doppler colorido em bovinos após a IA. Foram utilizadas 18 vacas da raça Nelore, submetidas a um protocolo para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e divididas em dois grupos: Grupo não inseminado (controle, GC, n=9) e grupo submetido à inseminação artificial (GIA, n=9). Avaliações por ultrassonografia foram realizadas em cinco momentos em modo espectral (30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA) para avaliar o índice de resistência (RI) da artéria uterina e em quatro momentos em modo color Doppler (4, 24, 48 e 168 horas após a IA) para avaliar a vascularização dos cornos uterinos. O diagnóstico de gestação foi feito após 30 dias da IA. No experimento 2 objetivou-se verificar se o percentual de espermatozóides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial (PIAIC) avaliadas por sondas fluorescentes influencia a fertilidade e estudar a hemodinâmica uterina após a deposição do sêmen com diferentes percentuais de espermatozóides PIAIC. Foram utilizadas 182 vacas paridas da raça Nelore, submetidas a um protocolo para IATF e divididas em três grupos de acordo com a qualidade do sêmen: Bom (B) 44,5%, Médio (M) 23% e Regular (R) 8,5% de espermatozóides PIAIC/palheta. Uma amostra de 30% das fêmeas (54, sendo 18 de cada grupo) foram submetidas a avaliações com ultrassonografia Doppler colorido 30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA. Foram considerados os RI das artérias uterinas direita (AD) e esquerda (AE) e vascularização subjetiva dos cornos uterinos direito (CD) e esquerdo (CE). Posteriormente, foram separados levando em consideração o lado do ovário contendo o

folículo dominante para comparar RI das artérias ipsi (AI) e contralateral (AC) e vascularização subjetiva dos cornos uterinos ipsi (CI) e contralateral (CC). O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IA. Para a análise estatística foi utilizado o programa SAS versão 9.2 (SAS 2010). As variáveis foram analisadas pelo PROC MIXED, utilizando modelo linear misto para medidas repetidas no tempo. Foram considerados os efeitos fixos de grupo, tempo e interação grupo x tempo. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Duncan, pelo PROC GLM. A análise de Qui-Quadrado foi utilizada para determinar a taxa de prenhez, de acordo com a qualidade do sêmen pelo PROC FREQ. O nível de significância considerado foi de 5%. No experimento 1 não foram observadas diferenças dos parâmetros avaliados por ultrassom Doppler entre GIA e GC, mas foram notados efeitos do tempo para RI, sendo mais baixos 4 horas após a IA. Quando os dados foram avaliados de acordo com o lado do folículo dominante foi observado que 4 e 24 horas após a IA, RI da AC do GIA foi mais baixo do que o GC. No experimento 2 não houve diferença entre os animais inseminados com sêmen B, M ou R quanto a hemodinâmica uterina, mas houve efeito do tempo, sendo que 4 horas após a IA verificou-se menor valor de RI e maior fluxo sanguíneo. A taxa de prenhez dos animais inseminados com o sêmen B (64,7%) foi maior quando comparada ao sêmen R (36,2%), sendo que ambos não diferiram do sêmen M (50,0%). Pode-se concluir que não é possível detectar por ultrassonografia Doppler alterações na hemodinâmica uterina devido à IA em fêmeas bovinas. A deposição de sêmen com diferentes qualidades não altera a hemodinâmica uterina de forma detectável por ultrassonografia Doppler em bovinos. Por outro lado, é possível detectar por ultrassonografia Doppler mudanças na perfusão sanguínea do útero em relação ao tempo da IA, o que pode ser devido a alterações hormonais que ocorrem durante o ciclo estral. Por fim, a IA com sêmen contendo menor percentual de espermatozoides PIAIC causa redução na taxa de fertilidade em bovinos.

Palavras-chave: Vascularização uterina. Endometrite pós-cobertura. Qualidade seminal. Bovinos. Associação de sondas fluorescentes.

ABSTRACT

OLIVEIRA, B. M. M. **Uterine hemodynamics assessed by color Doppler ultrasound and fertility rate of cows submitted to FTAI with semen analyzed by fluorescent probes.** [Hemodinâmica uterina avaliada por ultrassom Doppler colorido e taxa de fertilidade de vacas submetidas à IATF com sêmen analisado por sondas fluorescentes]. 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

After insemination, females have physiological and transient inflammatory reaction, which can result in changes in the uterine vasculature. The color Doppler ultrasound is a noninvasive technique that has been used to study the hemodynamics of cattle reproductive tract. The purposes of this work were to verify uterine inflammatory response by color Doppler ultrasound and fertility rate in cattle after artificial insemination (IA) with semen evaluated by fluorescent probes. For this, two experiments were delineated. The first experiment was conducted to study the uterine hemodynamic by color Doppler ultrasound in cattle after AI. Were used 18 Nellore cows that were subjected to a protocol for fixed timed artificial insemination (IATF). The animals were divided in two groups: Not inseminated group (control, GC, n=9) and inseminated group (GIA, n=9). Ultrasonografic evaluation were done in five moments on spectral mode (30 hours before AI, 4, 24, 48 e 168 hours after IA) to evaluate the resistance index (RI) of uterine artery and in four moments in color Doppler mode to evaluate the uterine horns vascularization. The pregnancy diagnostic was done 30 days after IA. In the second experiment the objective was to evaluate whether the percentage of sperm with plasma membrane integrity and acrossomal and mitochondrial function (PIAIC) assessed by fluorescent probes influences fertility and study the uterine hemodynamic after the deposition of semen with different percentages of PIAIC sperm. Were used 182 Nellore cows submitted to a protocol for IATF and divided into three groups according to semen quality: Good (B) 44.5%, Medium (M) 23% and Regular (R) 8.5% of PIAIC sperm/blade. A sample of 30% of female (54, 18 in each group) were submitted to evaluation by color Doppler ultrasound 30 hours before IA, 4 and 24 hours after IA. Were considered RI of right (AD) and left (AE) uterine arteries and subjective vascularization of right (CD) and left (CE) uterine horns. Later, they were separated taking into account the side of the ovary containing the dominant follicle to compare RI of ipsi (AI) and contralateral (AC) arteries and subjective vascularization of ipsi (CI) and contralateral (CC) uterine horns. The pregnancy diagnostic was done 30 days after IA. Statistical analysis was performed using the program SAS version 9.2 (SAS 2010). The variables were analyzed by PROC MIXED, using mixed linear model for repeated measures in time. We considered effects of group, time

and group x time interaction. The data obtained were submitted to ANOVA and Duncan test, using PROC GLM. The chi-square analysis was used to determine pregnancy rate, according to the quality of semen by PROC FREQ. the significance level was 5%. In experiment 1 there were no differences of the parameters evaluated by Doppler ultrasound between GIA and GC, but time effects were noted for RI, it was lower four hours after IA. When the data were evaluated according to the side of the dominant follicle was observed that 4 and 24 hours after IA, RI of AC of GIA was lower when it was compared with GC. In experiment 2 there was no difference between animals inseminated with semen B, M or R about uterine hemodynamics, but there were effects of time, so that 4 hours after IA showed lower value of RI and increased blood flow. The pregnancy rate of animals inseminated with semen B (64.7%) was higher when compared with semen R (36.2%), both of them did not differ of semen M (50.0%). It can be concluded that is not possible to detect uterine hemodynamic changes by Doppler ultrasound due to IA in cattle. The deposition of semen with different qualities does not change the uterine hemodynamics enough to be detectable by Doppler ultrasonography in cattle. On the other hand, is possible to detect changes in blood perfusion of the uterus in relation to the time of IA by Doppler ultrasound, which may be due to hormonal changes that occur during the estrous cycle. Finally, IA with semen containing a lower percentage of PIAIC sperm causes a reduction in fertility rate in cattle.

Keywords: Uterine vasculature. Endometritis post-mating. Semen quality. Fluorescent probes association.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – 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 mínima 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), 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 _____ **43**

Figura 2 – Imagem ultrassonográfica do corte longitudinal (6,5 mHz), do útero bovino para 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 _____ **44**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas direita (AD) e esquerda (ae) dos animais submetidos à inseminação artificial (GIA) ou não (GC) nos diferentes momentos de avaliação (30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA) _____ **52**
- Tabela 2 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas direita (AD) e esquerda (AE) dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA) _____ **53**
- Tabela 3 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos escores subjetivos (0 a 4) dos cornos uterinos direito (CD) e esquerdo (CE) dos animais submetidos à inseminação artificial (GIA) ou não (GC) nos diferentes momentos após a inseminação artificial (4, 24, 48 e 168 horas) _____ **55**
- Tabela 4 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos escores subjetivos (0 – 4) da vascularização dos cornos uterinos direito (CD) e esquerdo (CE) dos animais avaliados nos diferentes momentos após a inseminação artificial (4, 24, 48 e 168 horas) _____ **55**
- Tabela 5 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos índices de resistência (RI) das artérias uterinas ipsilateral (AI) e contralateral (AC) ao ovário que continha o folículo dominante, dos animais submetidos à inseminação artificial (GIA) ou não (GC) nos diferentes momentos de avaliação (30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA) _____ **56**
- Tabela 6 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas ipsilateral (AI) e contralateral (AC) ao ovário contendo o folículo dominante dos animais nos diferentes momentos de avaliação (30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA) _____ **57**
- Tabela 7 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos escores subjetivos (0 a 4) dos cornos uterinos ipsilateral (CI) e contralateral (CC) ao ovário que continha o folículo dominante dos animais submetidos a inseminação artificial (GIA) ou não (GC) nos diferentes momentos após a inseminação artificial (4, 24, 48 e 168 horas) _____ **59**
- Tabela 8 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos escores subjetivos (0 a 4) de vascularização dos cornos uterinos ipsilateral (CI) e contralateral (CC) ao ovário que continha o folículo dominante dos animais nos diferentes momentos de avaliação (4, 24, 48 e 168 horas após a IA) _____ **60**
- Tabela 9 – Valores de motilidade (%), vigor (1-5), concentração (número de espermatozóides por ml), integridade de membrana plasmática (MPI, %), função mitocondrial (FM,

%), integridade de acrossomo (AI, %), porcentagem de células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com potencial mitocondrial (PIAIC, %), defeitos maiores (%), defeitos menores (%) e total de defeitos (%) das 20 amostras de sêmen avaliadas _____ **61**

Tabela 10 - Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas direita (AD) e esquerda (AE) dos animais submetidos a inseminação artificial com sêmen de diferentes qualidades: Bom (B), Médio (M) e Regular (R), em cada momento da avaliação (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA) _____ **62**

Tabela 11 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas direita (AD) e esquerda (AE) dos animais nos diferentes momentos de avaliação (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA) _____ **63**

Tabela 12 - Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos escores subjetivos (0 a 4) da vascularização dos cornos uterinos direito (CD) e esquerdo (CE) dos animais submetidos à inseminação artificial com sêmen de diferentes qualidades: Bom (B), Médio (M) e Regular (R), em cada momento da avaliação (30 horas antes da ia, 4 e 24 horas após a IA) _____ **65**

Tabela 13 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos escores subjetivos (0 a 4) da vascularização dos cornos uterinos direito (CD) e esquerdo (CE) dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da ia, 4 e 24 horas após a IA) _____ **65**

Tabela 14 - Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) índice de resistência (RI) da artéria uterina ipsilateral (AI) e contralateral (AC) Ao ovário que continha o folículo dominante dos animais submetidos a inseminação artificial com sêmen de diferentes qualidades: Bom (B), Médio (M) e Regular (R), em cada momento da avaliação (30 horas antes de ia, 4 e 24 horas após a IA) _____ **68**

Tabela 15 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do índice de resistência (RI) DAS artérias uterinas ipsilateral (AI) e contralateral (AC) Ao ovário contendo o folículo dominante dos animais nos diferentes momentos de avaliação (30 horas antes da ia, 4 e 24 horas após a IA) _____ **69**

Tabela 16 - Média $\pm$ erro padrão da média (epm) do escore de avaliação subjetiva dos cornos uterinos ipsilateral (CI) e contralateral (CC) ao ovário que continha o folículo dominante dos animais submetidos à inseminação artificial com sêmen de diferentes qualidades: Bom (B), Médio (M) e Regular (R), em cada momento da avaliação (30 horas antes de ia, 4 e 24 horas após a IA) _____ **71**

Tabela 17 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do escore de avaliação subjetiva da vascularização dos cornos uterinos ipsilateral (CI) e contralateral (CC) ao folículo dominante dos animais nos diferentes momentos de avaliação (30 horas antes da ia, 4 e 24 horas após a IA) _____ **72**

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (ri) da artéria uterina direita dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da ia, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA) _____ **54**
- Gráfico 2 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (ri) da artéria uterina esquerda dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da ia, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA) ____ **54**
- Gráfico 3 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (ri) da artéria uterina ipsilateral ao ovário que continha o folículo dominante dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da ia, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA) _____ **58**
- Gráfico 4 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (ri) da artéria uterina contralateral ao ovário que continha o folículo dominante dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA ia, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA) _____ **58**
- Gráfico 5 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (ri) da artéria uterina direita dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da ia, 4 e 24 horas após a IA) _____ **64**
- Gráfico 6 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (ri) da artéria uterina esquerda dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da ia, 4 e 24 horas após a IA) _____ **64**
- Gráfico 7 – Média e erro padrão da média do escore de vascularização da avaliação subjetiva (0 a 4) do corno uterino direito dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA) _____ **70**
- Gráfico 8 – Média e erro padrão da média do escore de vascularização avaliada de forma subjetiva (0 a 4) do corno uterino esquerdo dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da ia, 4 e 24 horas após a IA) _____ **67**
- Gráfico 9 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (ri) da artéria uterina ipsilateral ao ovário contendo o folículo dominante dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da ia, 4 e 24 horas após a IA) _____ **70**

- Gráfico 10 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (ri) da artéria uterina contralateral ao ovário contendo o folículo dominante dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da ia, 4 e 24 horas após a IA) _____ **70**
- Gráfico 11 – Média e erro padrão da média do escore de avaliação subjetiva do corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o folículo dominante (ci) dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da ia, 4 e 24 horas após a IA) _____ **73**
- Gráfico 12 – Média e erro padrão da média do escore de avaliação subjetiva do corno uterino contralateral ao ovário contendo folículo dominante (ci) dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da ia, 4 e 24 horas após a IA) _____ **73**
- Gráfico 13 – Taxa de prenhez (%) de acordo com a qualidade do sêmen utilizado para a inseminação artificial: boa (B) = 40 A 50% De espermatozóides piaic, média (M) = 20 A 30% de espermatozóides piaic e regular (R) = 5 A 10% de espermatozóides PIAIC _____ **74**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Artéria uterina contralateral ao ovário que continha o folículo dominante
AD	Artéria uterina direita
AE	Artéria uterina esquerda
AI	Artéria uterina ipsilateral ao ovário que continha o folículo dominante
AI	Integridade de acrossomo
ATP	Adenosina trifosfato
B	Sêmen bom (44,5% de espermatozoides PIAIC/palheta)
CASA	Computer-Assisted Semen Analysis
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CC	Corno uterino contralateral ao ovário que continha o folículo dominante
CD	Corno uterino direito
CE	Corno uterino esquerdo
CI	Corno uterino ipsilateral ao ovário que continha o folículo dominante
ED	Final diastólico
EPM	Erro padrão da média
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FITC-PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada ao isotiocianato de fluoresceína
FM	Função mitocondrial
GC	Grupo controle
GIA	Grupo inseminado
H342	Hoechst 33342
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial

IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IM	Intramuscular
JC-1	5,5',6,6'- tetracloro-1,1',3,3' iodeto de tetraetilbenzimidazol carbocianina
M	Sêmen médio (23% de espermatozoides PIAIC/palheta)
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg	Miligramas
mHz	Mega-hertz
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 <i>Pisum sativum</i>
R	Sêmen regular (8,5% de espermatozoides PIAIC/palheta)
RI	Índice de resistência
S/D	Relação entre sístole e diástole
TAMAX	Taxa de velocidade máxima
UI	Unidade internacional

LISTA DE SÍMBOLOS

=	Igual
%	Porcentagem
$\geq$	Maior ou igual
<	Menor
>	Maior
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
+	Mais
-	Menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN	28
2.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA PÓS COBERTURA	30
2.3 ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER COLORIDO	32
4 OBJETIVOS	38
Experimento 1	38
Experimento 2	38
5 MATERIAL E MÉTODO	40
5.1 EXPERIMENTO 1	40
5.1.1 Seleção dos Animais	40
5.1.2 Inseminação Artificial	41
5.1.3 Avaliação da Hemodinâmica Uterina	42
5.1.4 Diagnóstico de Gestação	45
5.2 EXPERIMENTO 2	45
5.2.1 Avaliação do Sêmen	45
5.2.2 Seleção dos Animais	46
5.2.3 Inseminação Artificial	47
5.2.4 Avaliação da Dinâmica Folicular	47
5.2.5 Avaliação da Hemodinâmica Uterina	47

5.2.6 Diagnóstico de Gestação	48
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5.3.1 Experimento 1	48
5.3.1 Experimento 2	49
6 RESULTADOS	51
6.1 EXPERIMENTO 1	51
6.1.1 Hemodinâmica Uterina	51
6.1.2 Comparação da hemodinâmica do corno ipsi e contralateral ao ovário contendo o folículo dominante	55
6.1.3 Diagnóstico de Gestação	60
6.2 EXPERIMENTO 2	60
6.2.1 Avaliação do sêmen	60
6.2.2 Hemodinâmica Uterina	61
6.2.3 Comparação da hemodinâmica dos cornos uterinos ipsi e contralateral ao ovário contendo o folículo dominante	67
6.2.4 Taxa de Prenhez	74
7 DISCUSSÃO	76
Experimento 1	76
Experimento 2	79
8 CONCLUSÕES	84
Experimento 1	84
Experimento 2	84
REFERÊNCIAS	86

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A fertilidade é um dos parâmetros de maior importância em um rebanho bovino comercial, esta é influenciada por vários fatores, entre eles podem-se citar as condições do trato reprodutivo das fêmeas e a qualidade do sêmen utilizado, além de todos os eventos físicos e bioquímicos que os gametas sofrem até a fecundação.

A capacitação espermática e o desenvolvimento embrionário e fetal dependem intimamente da sanidade do trato reprodutivo feminino. Logo após a deposição do sêmen no trato reprodutivo, as fêmeas apresentam uma reação inflamatória. Esta reação inflamatória induzida pós-inseminação é fisiológica e transitória, e serve para remoção do excesso de espermatozoides mortos e outros contaminantes uterinos introduzidos com a deposição do sêmen, sendo caracterizada pela rápida infusão de polimorfonucleares (PMN) (TROEDSSON, 1999).

Para que o ambiente uterino esteja adequado para o desenvolvimento do embrião, é necessário que o processo inflamatório pós-inseminação seja controlado e que as condições uterinas normais sejam restabelecidas. Todavia, um atraso em debelar o processo inflamatório pode ocorrer em razão de intensa resposta inflamatória pela deposição de maior quantidade de espermatozoides inviáveis durante a inseminação, o que caracterizaria, de acordo com Kasimanickam et al. (2005b); Gilbert et al. (2005) e Kaufmann et al. (2009) uma endometrite subclínica.

Dessa forma, é importante estabelecer as interações que ocorrem entre qualidade do sêmen e o processo inflamatório pós-inseminação em bovinos e seus efeitos sobre a fertilidade. A avaliação da resposta inflamatória uterina pode ser realizada por diferentes técnicas, tais como swab endometrial, lavagem uterina e biópsia do endométrio (KASIMANICKAM et al., 2005a), que por apresentarem característica invasiva, poderão mascarar a real resposta inflamatória. A ultrassonografia Doppler colorido é uma técnica não invasiva, que já vem sendo utilizada para avaliar a hemodinâmica do crescimento folicular e desenvolvimento embrionário (MIYAMOTO et al., 2006; HERZOG; BOLLWEIN, 2007; HONNENS et al., 2008a; MOTOZUMI; MIYAMOTO, 2008) e pode ser utilizada para estudar a relação entre a deposição do sêmen e a perfusão vascular do útero com comprometimento endometrial (BOLLWEIN et al., 2000). A artéria uterina pode ser avaliada por meio do modo espectral para estudar a perfusão sanguínea do útero (BOLLWEIN et al., 2000). Estudos vem sendo desenvolvidos examinando diretamente o tecido alvo, como,

endométrio, parede do folículo e corpo lúteo em equinos (SILVA et al., 2005; SILVA; GINTHER, 2006; FERREIRA et al., 2008).

A qualidade do sêmen depositado no útero pode influenciar na resposta inflamatória pós-cobertura, e esta qualidade depende da integridade e função de todas as estruturas que compõem a célula espermática, tais 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 realizar sua função.

Técnicas para avaliar mais características espermáticas simultaneamente, como integridade de membrana plasmática e acrossomal e função mitocondrial, vem sendo desenvolvidas (CELEGHINI et al., 2007). 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. Atualmente, 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.

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.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura abordará os temas relevantes para melhor compreensão dos procedimentos realizados e resultados obtidos.

2.1 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN

O aumento da produtividade da pecuária nacional pode ser obtido com o emprego de biotécnicas para otimizar o sistema de produção, buscando melhores resultados, diminuindo os custos e maximizando o uso de animais geneticamente superiores (CELEGHINI et al., 2008).

A inseminação artificial tem sido muito utilizada, pois apresenta bons resultados nos programas de melhoramento genético do rebanho, com a utilização de sêmen de reprodutores de comprovado valor genético. A técnica requer criterioso controle nas suas diferentes etapas, que vão da seleção dos reprodutores doadores de sêmen, até o treinamento do inseminador (OHASHI, 2002).

A utilização de sêmen de qualidade é fundamental para melhores resultados na taxa de prenhez do rebanho. A contribuição do sêmen para a eficiência reprodutiva é de grande importância, bem como sua avaliação prévia, já 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).

A qualidade do sêmen depende da integridade e função de todas as estruturas que compõem a célula espermática, tais 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 e promover o desenvolvimento embrionário. Estas estruturas vêm sendo avaliadas por técnicas separadas, que nem sempre correspondem à capacidade fecundante do sêmen, visto que cada espermatozoide precisa apresentar um conjunto de características para cumprir sua função (CELEGHINI, 2005; CELEGHINI et al., 2010).

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 apresentar pelo menos 10×10^6 espermatozoides com motilidade progressiva, sendo $\geq 30\%$ de motilidade progressiva, escore ≥ 3 de vigor e $< 30\%$ de defeitos morfológicos totais. No entanto, nenhuma técnica de avaliação de sêmen utilizada de forma isolada apresenta sensibilidade suficiente para a determinação da fertilidade, por isso, a combinação dos diversos métodos tem agregado maior precisão para a estimativa do potencial de fertilização das amostras de sêmen bovino (VERSTEGEN et al., 2002; ARRUDA et al., 2007; FREITAS-DELL'AQUA et al., 2009; ARRUDA et al., 2011).

Na técnica descrita por Celeghini et al. (2007), são associadas as sondas fluorescentes iodeto de propídio (PI), Hoechst 33342 (H342), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e 5,5',6,6'- tetracoloro-1,1',3,3' iodeto de tetraetilbenzimidazol carbocianina (JC-1), e permite avaliar simultaneamente a integridade das membranas plasmática e acrossomal, bem como a função mitocondrial, e pode corresponder de forma mais precisa à real capacidade fertilizante do sêmen.

A avaliação da membrana plasmática é fundamental já que sua integridade é um pré-requisito para que ocorram os eventos fisiológicos relacionados ao processo de fertilização, que incluem ligação à zona pelúcida, reação acrossomal e fusão dos gametas (PAPA et al., 2000; ARRUDA et al., 2007).

O PI passa através da membrana plasmática somente quando danificada e se liga ao DNA, produzindo fluorescência vermelha no núcleo das células, ou seja, é excluído de células com membrana plasmática intacta (JONES; SENFT, 1985). Este corante é de fácil preparação e aplicabilidade, sendo eficiente para avaliar a membrana plasmática, seja isoladamente ou em associação a outras sondas (ARRUDA et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007). O H342 apresenta especificidade com o DNA, sendo usado para determinar a integridade da membrana plasmática (CELEGHINI et al., 2007). Quando associado a outra sonda de coloração distinta, como o PI por exemplo, atua como um marcador de membrana plasmática intacta (MAXWELL et al., 1997) emitindo fluorescência azul (CELEGHINI, 2005).

O acrossomo deve permanecer intacto até ocorrer a ligação com a zona pelúcida (SILVA; GADELLA, 2006). Esta estrutura é composta por enzimas hidrolíticas (RAMALHO-SANTOS et al., 2002) que quando se ligam com a zona pelúcida provocam reação acrossômica, resultando na liberação e ativação das enzimas acrossomais que auxiliam na fertilização (HONDA et al., 2002). A PSA se liga aos glicoconjugados da matriz acrossomal, especificamente ao açúcar α -manosidase encontrado no conteúdo acrossomal. Esta aglutinina, quando conjugada à FITC, marca o acrossomo espermático lesado em verde-amarelado

(CELEGHINI, 2005). A ausência da fluorescência indica que o acrossomo está intacto e a fluorescência evidencia lesões acrossomais (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 JC-1 possui a habilidade de diferenciar as mitocôndrias coradas com alto ou baixo potencial de membrana. Na mitocôndria com alto potencial de membrana, o JC-1 emite fluorescência vermelho-alaranjada. Enquanto que nas mitocôndrias com baixo potencial de membrana, emite fluorescência verde (REERS et al., 1991).

As estruturas avaliadas pela associação de sondas fluorescentes desempenham papel fundamental na fertilização. Santos (2003) cita que a utilização de um único teste para avaliação do sêmen é pouco eficaz pelo fato de que cada espermatozoide apresenta múltiplos compartimentos subcelulares com diferentes funções a serem avaliadas portanto, a realização de exames mais detalhados que possam garantir a qualidade seminal apresentam grande potencial para prever a capacidade fertilizante da amostra avaliada.

A qualidade do sêmen e sua relação com a fertilidade é um dos pontos importantes do sistema de produção. Testes que avaliam a qualidade seminal são realizados rotineiramente para determinar a aceitabilidade do sêmen (JANUSKAUSKAS et al., 2001).

Alguns trabalhos demonstram que a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal é mais confiável para prever a taxa de fertilidade *in vitro* do que a motilidade e morfologia espermática (TARTAGLIONE; RITTA, 2004). A campo, a percentagem de espermatozoides normais apresenta correlação positiva ($r=0,59$) com a fertilidade (CORREA, et al., 1997).

Januskauskas et al. (2001) relacionaram a taxa de fertilidade com a qualidade seminal avaliada pelo CASA, sondas fluorescentes e estrutura da cromatina por citometria de fluxo, e notaram que esses testes podem prever a capacidade fertilizante do sêmen.

2.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA PÓS COBERTURA

Na inseminação artificial, apenas uma pequena quantidade de espermatozoides férteis e em estágio adequado de maturação é transportado até o sítio de fertilização, sendo que as células restantes permanecem no ambiente uterino e precisam ser removidas para

garantir a higidez do útero (KATILA, 1995).

Na vaca, a maioria dos processos inflamatórios no útero ocorre no período pós-parto ou pós-abortamento, no entanto, a endometrite também pode se desenvolver após o coito ou inseminação artificial, principalmente quando se utiliza sêmen de má qualidade (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

Logo após a deposição do sêmen no trato reprodutivo, o útero se torna um ambiente hostil para o espermatozoide devido à reação inflamatória que ocorre para que as células mortas e outros contaminantes sejam removidos (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) (TROEDSSON, 1999).

Acreditava-se que esta resposta inflamatória uterina pós-cobertura se deva à contaminação bacteriana. Hoje, sabe-se que esta inflamação transitória é primariamente induzida pela presença de espermatozoides no lúmen uterino (NASH et al., 2010).

A função imune do trato reprodutivo é importante para a sanidade e manutenção de condições favoráveis à fertilização. Não se sabe até que ponto as gestações em animais domésticos podem ser comprometidas pelo fato do sistema imune materno não estar apropriadamente regulado (HANSEN, 2004).

A função do sistema imune no trato reprodutivo também é regulada por hormônios reprodutivos como o 17β -estradiol e a progesterona. O estrógeno aumenta a vascularização, favorecendo a migração de PMN e a progesterona parece ter um papel mais importante durante a gestação, inibindo respostas imunes uterinas (HANSEN, 2004).

Estudos realizados em éguas demonstram que os primeiros neutrófilos são encontrados no útero 30 minutos após a inseminação artificial e maior quantidade é observada entre 4 e 24 horas (KATILA, 1995). Também em éguas, em outro experimento, foi detectado maior número de PMN 48 horas após a deposição de sêmen no útero (NIKOLAKOPOULOS; WATSON, 2000).

Ainda em éguas, Kotilainen e colaboradores, em 1994, observaram que a deposição intrauterina de sêmen congelado causa maior resposta inflamatória e associaram este fato ao grande número de espermatozoides mortos durante a criopreservação.

Rozeboom et al. (1999) observaram que 36 horas após a inseminação artificial de porcas ainda havia PMN no útero. Bischof et al. (1994) estudaram as mudanças no ambiente uterino de porcas após a cobertura e observaram uma resposta inflamatória aguda no endométrio que resulta na maior distribuição de leucócitos. Os mesmos autores afirmam que a

deposição do plasma seminal no trato reprodutivo da fêmea representa um estímulo para a resposta inflamatória pós-cobertura, que envolve mudanças no tecido e nos componentes celulares do útero.

Poucos estudos foram realizados com bovinos, Kaufmann et al. (2009) demonstraram que vacas com alta proporção de PMN endometriais (>15%) 4 horas após a IA apresentaram redução na taxa de concepção, sugerindo que este seja um indicativo de endometrite subclínica.

Para que o ambiente uterino esteja adequado para o desenvolvimento do embrião, é necessário que o processo inflamatório pós-inseminação seja controlado e que as condições uterinas normais sejam restabelecidas. Todavia, um atraso em debelar o processo inflamatório pode ocorrer em razão de intensa resposta inflamatória pela deposição de maior quantidade de espermatozoides inviáveis durante a inseminação, caracterizando endometrite subclínica (KASIMANICKAM et al., 2005b; GILBERT et al., 2005; KAUFMANN et al., 2009).

Estudos que estabelecem 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.

A avaliação da resposta inflamatória uterina pode ser realizada por diferentes técnicas (KASIMANICKAM et al., 2005a), que por apresentarem característica invasiva, poderão mascarar a real resposta inflamatória. Deste modo, é necessário verificar a aplicação de novas técnicas que possam avaliar o processo inflamatório.

2.3 ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER COLORIDO

Desde que a ultrassonografia em tempo real foi introduzida na Medicina Veterinária, a possibilidade de acompanhar as mudanças no trato reprodutivo por uma técnica não-invasiva tornou-se possível (BOLLWEIN et al., 2000). Trata-se de um método de diagnóstico para exploração de estruturas por meio da emissão de ultrassom e captação de ecos. A aplicação da técnica, a partir da década de 80 foi tida como uma ferramenta importante para o estudo e entendimento dos eventos fisiológicos que ocorrem no ciclo estral e gestação de diversas espécies. A ultrassonografia proporciona maior eficiência reprodutiva aos animais já que permite maior precisão e segurança para o diagnóstico, prognóstico e terapêutica (NEVES et al., 2001).

O ultrassom é uma onda sonora com frequência (> 20.000 Hz) superior à percebida pelo ouvido humano. As ondas são emitidas a uma velocidade constante até encontrarem uma superfície refletora, dependendo da densidade dessa superfície, parte da onda emitida é refletida e captada pelo transdutor. O transdutor possui cristais com propriedades piezelétricas, ou seja, capaz de transformar a energia mecânica em elétrica. O aparelho entende essa transformação em pontos de luz em uma tela conversora de varredura, desse modo a imagem de órgãos e tecidos é reconstituída (NEVES et al., 2001).

Com a ultrassonografia Doppler, pode-se estudar o fluxo sanguíneo e, portanto, identificar alterações reprodutivas (CHUANG et al., 1999). Este método tornou possível o estudo não invasivo da hemodinâmica corporal, analisando a presença e direção do fluxo sanguíneo em diversos vasos e órgãos (CARVALHO; ADDAD, 2009a). Deste modo é possível ter uma visão da fisiologia, além da anatomia da estrutura avaliada. Na medicina humana, a técnica tem sido utilizada para avaliar alterações fisiológicas e patológicas na circulação sanguínea no útero (BOLLWEIN et al., 2000) e tem sido aplicada na obstetrícia e na ginecologia humana e de várias espécies animais (BOLLWEIN et al., 2004).

A ultrassonografia Doppler apresenta três diferentes modos de trabalho. O modo B (bidimensional) é utilizado para identificação anatômica de estruturas do organismo animal que posteriormente podem ser avaliadas pelos modos coloridos. Este modo apresenta a imagem em escalas de cinza. O modo color Doppler estima a vascularização do tecido avaliado, fornecendo imagens coloridas onde o fluxo sanguíneo está presente. Utilizando o modo color Doppler é possível estimar a perfusão sanguínea do tecido, observando a percentagem de tecido com pontos coloridos durante o exame (GINTHER; MATTHEW, 2004). Esta técnica permite avaliar a presença, direção e qualidade do fluxo sanguíneo de modo mais rápido que qualquer outra técnica não invasiva (CARVALHO; ADDAD, 2009b). O modo espectral fornece valores exatos de índices relacionados com a vascularização (GINTHER; MATTHEW, 2004).

O princípio da ultrassonografia Doppler é detectar a movimentação das hemácias, que são transportadas no interior dos vasos sanguíneos, em relação ao transdutor (GINTHER et al., 2007). Atualmente sugere-se que seja detectada a movimentação das hemácias devido ao seu maior tamanho em relação às outras células do sangue (CARVALHO; ADDAD, 2009a). As alterações de velocidade e sentido do fluxo sanguíneo são representadas por imagens com cores diferentes. As cores apresentam-se 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. Os fluxos de maior velocidade são expressos por tonalidades mais claras da mesma cor (YANIK, 2002).

O modo espectral fornece os valores de pico sistólico, final diastólico, relação entre sístole e diástole, índice de resistência, taxa de velocidade máxima do fluxo sanguíneo e batimentos cardíacos por minuto, para que estes valores obtidos sejam reais é preciso que haja angulação correta entre a probe e o vaso sanguíneo avaliado (GINTHER et al., 2007).

Silva et al. (2005) relatam que os valores do índice de resistência (RI) e índice de pulsatilidade (PI) podem ser utilizados para a avaliação do trato reprodutivo, pois não são influenciados pela angulação da probe em relação ao vaso.

Quanto menores os valores de RI e PI maior será o fluxo sanguíneo do vaso em questão, ou seja, RI e PI são inversamente proporcionais ao fluxo sanguíneo do tecido avaliado (SCHOLTES et al., 1989; CHUANG et al., 1999; BOLLWEIN, MAYER, STOLLA, 2003; GINTHER et al., 2007).

A vascularização pode ser avaliada de forma subjetiva utilizando o modo color Doppler. Silva et al. (2005) avaliaram o 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.

Além disso, a ultrassonografia Doppler é uma ferramenta importante para o estudo da viabilidade endometrial, assim como para a interação conceito-maternal. Informações sobre a fisiologia do fluxo sanguíneo de vasos, tecidos e órgãos do aparelho reprodutor também podem ser obtidas por meio da ultrassonografia Doppler e é provável que, no futuro, esta técnica possa ser empregada no diagnóstico auxiliar de endometrites pós-cobertura (FERREIRA; MEIRA, 2011).

3 HIPÓTESES

Com base na literatura consultada foram definidos dois experimentos para testar as seguintes hipóteses:

Experimento 1

Após a deposição do sêmen no trato reprodutivo das fêmeas bovinas, há aumento do fluxo sanguíneo uterino, possivelmente provocado pela resposta inflamatória.

Experimento 2

1. O fluxo sanguíneo uterino aumenta após a deposição de sêmen com maior porcentagem de espermatozoides lesados, ou seja, com menores percentuais de células espermáticas com membrana plasmática intacta, acrossomo íntegro e com alto potencial mitocondrial.
2. Ocorre redução na taxa de fertilidade após a inseminação artificial com menor percentual de espermatozoides com membrana plasmática intacta, acrossomo íntegro e com alto potencial mitocondrial.

Objetivos

4 OBJETIVOS

Os experimentos foram delineados com os seguintes objetivos:

Experimento 1:

1. Estudar a hemodinâmica uterina em bovinos após a inseminação artificial por ultrassonografia Doppler colorido, levando em consideração o índice de resistência das artérias uterinas e o escore de vascularização dos cornos uterinos.
2. Avaliar os efeitos do tempo em relação à inseminação artificial sobre o índice de resistência das artérias uterinas e o escore de vascularização dos cornos uterinos.

Experimento 2:

1. Estudar a hemodinâmica uterina em bovinos, considerando o índice de resistência das artérias uterinas e o escore de vascularização dos cornos uterinos, após a deposição do sêmen com diferentes percentuais de espermatozoides com membrana plasmática intacta, acrossomo íntegro e com alto potencial mitocondrial.
2. Avaliar os efeitos do tempo em relação à inseminação artificial com sêmen de diferentes qualidades quanto ao índice de resistência das artérias uterinas e ao escore de vascularização dos cornos uterinos.
3. Verificar se o percentual de espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial, avaliadas simultaneamente por associação de sondas fluorescentes, influencia a fertilidade em bovinos.

Material e Método

5 MATERIAL E MÉTODO

A metodologia do trabalho será dividida de acordo com os procedimentos realizados nos experimentos 1 e 2.

5.1 EXPERIMENTO 1

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.

5.1.1 Seleção dos animais

Foram utilizadas 18 vacas entre 30 e 50 dias pós-parto da raça Nelore avaliadas previamente quanto ao escore uterino e ovariano e escore de condição corporal.

O útero foi classificado em escores de 1 a 3, sendo 1 o útero com involução completa, sem líquido, apto a desenvolver nova gestação; o escore 2 correspondente ao útero que apresenta pequena quantidade de líquido em sua luz, ainda com involução incompleta, apresentando-se pouco distendido; e o escore 3 corresponde ao útero que apresenta líquido em sua luz, podendo apresentar algum tipo de infecção, apresenta-se distendido e sem involução. O escore ovariano foi classificado de 1 a 3 (MADUREIRA; PIMENTEL, 2005), sendo 1 o ovário que apresentava 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, o escore 2 correspondia ao ovário menor que 30 mm com folículos entre 5 e 8,5 mm; e o escore 3 correspondia ao ovário com diâmetro menor que 12 mm com folículos que apresentavam até 5 mm de diâmetro. Os animais apresentando escores uterino e/ou ovariano 3 foram excluídos do experimento.

O escore de condição corporal foi classificado de 1 a 9 (SPITZER, 1986), sendo 1 a vaca extremamente magra, sem nenhuma gordura detectável entre as vértebras e costelas, com as extremidades ósseas muito aparentes. O escore 2 correspondia a vaca muito magra, com as extremidades ósseas menos aparentes, apresentando pequena cobertura de gordura. O escore 3 correspondia a vaca magra que apresentavam as costelas ainda perceptíveis, com alguma cobertura de gordura sobre o coxal. O escore 4 correspondia as vacas que apresentavam as costelas e vértebras mais recobertas de camadas de gordura. O escore 5 correspondia ao animal com boa aparência geral com maior cobertura de gordura sobre as costelas e vértebras. O escore 6 correspondia a vaca com boa aparência geral que apresentava bastante gordura palpável sobre as costelas e ao redor da inserção da cauda. O escore 7 correspondia ao animal com aparência gorda e com grande quantidade de gordura sobre as costelas. O escore 8 correspondia a vaca muito gorda, com grande depósito de gordura sobre as costelas, na inserção de cauda e abaixo da vulva. O escore 9 correspondia ao animal obeso. A estrutura óssea não está aparente e é difícil de senti-la. Nenhum dos animais avaliados no experimento apresentou escore de condição corporal <4 e >7 .

5.1.2 Inseminação Artificial

Todas as vacas selecionadas foram submetidas a um protocolo de sincronização do estro e da ovulação e divididas em dois grupos experimentais homogêneos: grupo controle (GC, $n=9$), não inseminado e grupo submetido à inseminação artificial (GIA, $n=9$). A distribuição dos grupos experimentais foi realizada de forma homogênea, considerando os escores uterino, ovariano e de condição corporal, previamente avaliados.

O protocolo de sincronização do estro e da ovulação 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, foi administrado 1 mg de benzoato de estradiol, 0,5 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio[®]) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (Novormon[®]), realizando-se a IATF 30 horas depois.

O sêmen utilizado foi avaliado previamente e apresentava um total de $15,625 \times 10^6$ espermatozoides por palheta com 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).

5.1.3 Avaliação da Hemodinâmica Uterina

A hemodinâmica uterina foi avaliada utilizando um aparelho de ultrassonografia Doppler com probe linear transretal (6,5 mHz), (M5vet, Mindray[®], China) no modo espectral em cinco períodos pré-determinados: 30 horas antes da IA (no momento da aplicação do hormônio indutor da ovulação), 4, 24, 48 e 168 horas após a IA e no modo color Doppler, em quatro períodos: 4, 24, 48 e 168 horas após a IA.

O modo espectral foi utilizado para 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 avaliação foi o índice de resistência (RI) das artérias uterinas direita (AD) e esquerda (AE), como exemplificado na figura 1.

Figura 1 – 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 mínima 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), 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

O exame foi realizado até que fossem obtidas, no mínimo, nove ondas semelhantes do ciclo cardíaco. Os dados foram salvos e posteriormente 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 com as outras duas ondas medianas dos próximos ciclos obtidos. Para a análise estatística foi utilizada a média das três ondas.

O modo color Doppler foi utilizado para a avaliação subjetiva da vascularização dos cornos uterinos, sendo classificado em escores de 0 a 4, de acordo com a imagem obtida de cada corno uterino (Figura 2), sendo 0 (zero) referente a vascularização mínima e 4 (quatro) à vascularização máxima. As imagens foram gravadas e analisadas por dois avaliadores diferentes. 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 2 – Imagem ultrassonográfica do corte longitudinal (6,5 mHz), do útero bovino para 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

Posteriormente, os dados da avaliação da hemodinâmica foram separados levando em consideração o lado do ovário contendo o folículo dominante para comparar RI das artérias ipsi (AI) e contralateral (AC) e vascularização subjetiva dos cornos uterinos ipsi (CI) e contralateral (CC) ao ovário que continha o folículo dominante.

5.1.4 Diagnóstico de Gestação

O diagnóstico de gestação do GIA foi realizado 30 dias após a IA por ultrassonografia transretal, utilizando o modo B.

5.2 EXPERIMENTO 2

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. No período de setembro de 2010 a junho de 2011.

5.2.1 Avaliação do Sêmen

Foram analisadas 20 amostras de sêmen comercial para a separação de três partidas a serem utilizadas no experimento apresentando qualidades diferentes (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, vigor, concentração, alterações morfológicas e integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial.

A motilidade espermática foi avaliada subjetivamente e pelo sistema

computadorizado de análise do sêmen (CASA – Computer-Assisted Semen Analysis). O vigor foi avaliado em escores de 1 a 5, subjetivamente. 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 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. (2008). As células foram classificadas em oito categorias de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, conforme descrito por Celeghini et al. (2007).

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) para a divisão dos grupos experimentais. Desta forma, as partidas foram divididas em grupos de acordo com o percentual de células PIAIC por palheta pós-criopreservação: Boa (B) = 40 a 50% de espermatozoides PIAIC, Média (M) = 20 a 30% de espermatozoides PIAIC e Regular (R) = 5 a 10% de espermatozoides PIAIC.

5.2.2 Seleção dos animais

Foram disponibilizados 300 animais para que os grupos experimentais fossem selecionados. Os animais foram avaliados por palpação transretal e ultrassonografia em modo B, quanto aos escores ovarianos e uterinos, conforme descritos no experimento 1. Vacas que apresentaram escore uterino e/ou ovariano 3 foram excluídas do experimento. O escore de condição corporal foi classificado de 1 a 9, como descrito anteriormente, e as vacas que apresentavam escores <4 foram excluídas do experimento. Nenhum animal apresentou escore de condição corporal >7.

Dessa maneira, foram selecionadas 182 vacas da raça Nelore, com bezerro ao pé, ente 50 e 70 dias pós parto, mantidas sob as mesmas condições ambientais, em pastagem de capim-Braquiarião (*Brachiaria brizantha*), com água e sal mineral *ad libitum*.

5.2.3 Inseminação Artificial

Para serem inseminadas, as fêmeas foram submetidas a um protocolo de sincronização do estro e da ovulação, para permitir a IATF. O protocolo consistiu na colocação de um implante subcutâneo contendo 3 mg de norgestomet (Crestar[®]) mais a aplicação IM de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin[®]), 8 dias depois foi retirado o implante de progestágeno, administrado 1 mg de benzoato de estradiol, 0,5 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio[®]) e 300 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (Novormon[®]), realizando-se a IATF 30 horas depois. A IA foi realizada pela deposição do sêmen no corpo do útero com aplicador universal por um único inseminador experiente, com os animais contidos em brete.

5.2.4 Avaliação da dinâmica folicular

O folículo dominante foi mensurado por ultrassonografia transretal, em modo B, no momento da retirada do implante de progestágeno, no momento da aplicação do benzoato de estradiol e no momento da IA. Foi anotado o ovário que continha o folículo dominante.

5.2.5 Avaliação da hemodinâmica uterina

As avaliações da hemodinâmica uterina foram realizadas em três períodos, definidos após análise dos resultados do experimento 1: 30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA.

Os 182 animais foram distribuídos de forma homogênea, considerando escores ovariano, uterino e corporal nos três grupos experimentais de acordo com a qualidade do sêmen: Boa (Sêmen B, n=68), Média (Sêmen M, n=56) e Regular (Sêmen R, n=58). Para viabilizar a realização do experimento, tanto para a IATF quanto para a avaliação ultrassonográfica, os animais foram divididos em dois lotes: Lote 1 (n=92) e Lote 2 (n=90), cada um contendo os três grupos experimentais distribuídos homogeneamente.

Uma amostragem de 30% dos animais (54 vacas, sendo 18 de cada grupo de

tratamento) foi submetida à avaliação da hemodinâmica uterina por ultrassonografia utilizando os modos espectral e color Doppler do aparelho, como descrito no experimento 1. A avaliação da hemodinâmica uterina de uma amostragem dos lotes 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.

5.2.6 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.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística será descrita separadamente para os experimentos 1 e 2.

5.3.1 Experimento 1

As variáveis, índice de resistência (RI) das artérias uterinas direita (AD) e esquerda (AE), nos tempos 30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA e vascularização subjetiva dos cornos uterinos direito (CD) e esquerdo (CE) nos tempos 4, 24, 48 e 168 horas após a IA, foram avaliadas em 18 animais, sendo 9 inseminadas e 9 do grupo controle. Os dados foram analisados pelo procedimento PROC MIXED do SAS versão 9.2 (SAS, 2010), utilizando modelo linear misto para medidas repetidas no tempo. Esse procedimento permite melhor ajuste na estrutura da matriz que descreve as covariâncias de medidas repetidas no tempo. Na avaliação dessas variáveis foram considerados os efeitos fixos de grupo (GIA ou GC), tempo (-30, 4, 24, 48, 168 para RI e 4, 24, 48 e 16 para vascularização subjetiva) e interação grupo x tempo.

Posteriormente os valores de RI foram separados considerando o lado do ovário

contendo o folículo dominante para comparar as artérias ipsi (AI) e contralateral (AC) e vascularização subjetiva dos cornos uterinos ipsi (CI) e contralateral (CC) ao lado da ovulação. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e ao teste de Duncan, pelo PROC GLM do SAS versão 9.2 (SAS, 2010).

Os dados estão expressos pela média como medida de tendência central e o erro padrão da média como medida de dispersão. O nível de significância utilizado para rejeitar hipótese h_0 (hipótese de nulidade) para todos os dados obtidos foi de 5%.

5.3.2 Experimento 2

As variáveis, índice de resistência (RI) das artérias uterinas direita (AD) e esquerda (AE), nos tempos 30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após IA e vascularização subjetiva dos cornos uterinos direito (CD) e esquerdo (CE) nos mesmos tempos, foram avaliadas em 182 animais, divididos em 3 grupos de acordo com a qualidade do sêmen (Sêmen B, $n=68$, M, $n=56$ e R, $n=58$) pelo PROC MIXED do SAS versão 9.2 (SAS, 2010), utilizando modelo linear misto para medidas repetidas no tempo. Na avaliação dessas variáveis foram considerados os efeitos fixos de Sêmen (B, M e R), tempo (-30, 4 e 24 horas da IA) e interação grupo x tempo.

Posteriormente os valores de RI foram separados considerando o ovário contendo o folículo dominante para comparar as artérias ipsi (AI) e contralateral (AC) e vascularização subjetiva dos cornos uterinos ipsi (CI) e contralateral (CC) ao lado da ovulação. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e ao teste de Duncan, pelo PROC GLM do SAS versão 9.2 (SAS, 2010).

A análise de Qui-Quadrado foi utilizada para determinar a taxa de prenhez, de acordo com a qualidade do sêmen pelo PROC FREQ do SAS versão 9.2 (SAS, 2010).

Os dados obtidos estão expressos pela média como medida de tendência central e o erro padrão da média como medida de dispersão. O nível de significância utilizado para rejeitar hipótese h_0 (hipótese de nulidade) para todos os dados obtidos foi de 5%.

Resultados

6 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em sessões separadas. Primeiramente serão expostos os dados do experimento 1, seguidos do experimento 2.

6.1 EXPERIMENTO 1

Os resultados do experimento 1 serão apresentados em três sessões.

6.1.1 Hemodinâmica Uterina

As médias e erros padrão da média dos índices de resistência (RI) obtidas no escaneamento das artérias uterinas direita (AD) e esquerda (AE), utilizando o modo espectral do aparelho de ultrassonografia, nos períodos previamente estabelecidos, estão apresentados na tabela 1. Não houve diferença estatística nos valores de RI entre GIA e GC

Tabela 1 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas direita (AD) e esquerda (AE) dos animais submetidos à inseminação artificial (GIA) ou não (GC) nos diferentes momentos de avaliação (30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA)

Tempo em relação à IA	RI	Grupo	Média $\pm$ EPM	Probabilidade
-30 horas	AD	GIA	0,70 $\pm$ 0,04	0,55
		GC	0,67 $\pm$ 0,02	
	AE	GIA	0,64 $\pm$ 0,03	0,15
		GC	0,73 $\pm$ 0,04	
4 horas	AD	GIA	0,63 $\pm$ 0,02	0,74
		GC	0,64 $\pm$ 0,01	
	AE	GIA	0,62 $\pm$ 0,01	0,11
		GC	0,67 $\pm$ 0,02	
24 horas	AD	GIA	0,71 $\pm$ 0,03	0,31
		GC	0,77 $\pm$ 0,04	
	AE	GIA	0,67 $\pm$ 0,04	0,14
		GC	0,78 $\pm$ 0,05	
48 horas	AD	GIA	0,80 $\pm$ 0,03	0,77
		GC	0,81 $\pm$ 0,04	
	AE	GIA	0,78 $\pm$ 0,02	0,43
		GC	0,82 $\pm$ 0,04	
168 horas	AD	GIA	0,79 $\pm$ 0,04	0,48
		GC	0,84 $\pm$ 0,04	
	AE	GIA	0,75 $\pm$ 0,05	0,47
		GC	0,81 $\pm$ 0,04	

Como não houve diferença estatística entre GIA e GC, os valores de RI das artérias uterinas direita e esquerda foram avaliados desconsiderando os grupos de tratamento para verificar efeito do tempo em relação à IA (Tabela 2).

Tabela 2 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas direita (AD) e esquerda (AE) dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA)

Tempo em relação à IA	RI*	
	AD	AE
-30 horas	0,68 $\pm$ 0,02 ^{b,c}	0,69 $\pm$ 0,03 ^b
4 horas	0,64 $\pm$ 0,01 ^c	0,65 $\pm$ 0,01 ^b
24 horas	0,74 $\pm$ 0,03 ^{b,a}	0,73 $\pm$ 0,03 ^{b,a}
48 horas	0,81 $\pm$ 0,02 ^a	0,80 $\pm$ 0,02 ^a
168 horas	0,81 $\pm$ 0,03 ^a	0,78 $\pm$ 0,03 ^a
Probabilidade	<0,0001	0,002

^{a, b, c} Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística.

*Não houve diferença entre os valores de AD e AE nos diferentes tempos ($P>0,05$).

Quatro horas após a IA o valor de RI da AD foi mais baixo quando comparados com 24, 48 e 168 horas após a IA, não sendo observada diferença em relação à avaliação 30 horas antes da IA. O valor de RI da AD também foi menor 30 horas antes da IA em comparação a 48 e 168 horas após a IA. Não foram observadas diferenças entre as avaliações de RI da AD 24, 48 e 168 horas após a IA. Em relação ao RI da AE, foram observados valores mais altos somente 48 e 168 horas após a IA em relação ao período -30 e 4 horas da IA.

As médias e erro padrão dos índices de resistência (RI) obtidos das artérias uterinas direita e esquerda podem ser melhor visualizados, respectivamente nos gráficos 1 e 2.

^{a, b, c} Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística.

Gráfico 1 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (RI) da artéria uterina direita dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA)

^{a, b} Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística.

Gráfico 2 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (RI) da artéria uterina esquerda dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA)

Os valores das médias e erro padrão da média dos escores de vascularização dos cornos uterinos avaliados 4, 24, 48 e 168 horas após a IA estão descritos na tabela 3. Não houve diferença estatística entre os escores de vascularização de GIA e GC.

Tabela 3 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos escores subjetivos (0 a 4) dos cornos uterinos direito (CD) e esquerdo (CE) dos animais submetidos à inseminação artificial (GIA) ou não (GC) nos diferentes momentos após a inseminação artificial (4, 24, 48 e 168 horas)

Tempo após IA	Corno uterino	Tratamento	Média $\pm$ EPM	Probabilidade
4 horas	CD	GIA	2,22 $\pm$ 0,21	0,4802
		GC	2,00 $\pm$ 0,22	
	CE	GIA	2,19 $\pm$ 0,20	0,4701
		GC	2,00 $\pm$ 0,16	
24 horas	CD	GIA	1,97 $\pm$ 0,15	0,8939
		GC	1,94 $\pm$ 0,13	
	CE	GIA	1,94 $\pm$ 0,16	0,5499
		GC	2,08 $\pm$ 0,16	
48 horas	CD	GIA	1,86 $\pm$ 0,09	0,3257
		GC	2,13 $\pm$ 0,25	
	CE	GIA	1,97 $\pm$ 0,21	0,6143
		GC	2,13 $\pm$ 0,23	
168 horas	CD	GIA	1,91 $\pm$ 0,23	0,8317
		GC	1,86 $\pm$ 0,10	
	CE	GIA	1,94 $\pm$ 0,16	0,2502
		GC	2,22 $\pm$ 0,16	

Como não houve diferença estatística entre os grupos de tratamento GIA e GC, os valores das variáveis CD e CE foram avaliados quanto à variação entre os tempos após IA. Os valores das médias e EPM dos escores de vascularização dos cornos uterinos avaliados nos momentos previamente estabelecidos estão descritos na tabela 4. Não foi observada diferença estatística entre os escores de avaliação subjetiva nos diferentes períodos de avaliação.

Tabela 4 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos escores subjetivos (0 – 4) da vascularização dos cornos uterinos direito (CD) e esquerdo (CE) dos animais avaliados nos diferentes momentos após a inseminação artificial (4, 24, 48 e 168 horas)

Tempo após a IA	Vascularização	
	CD	CE
4 horas	2,11 $\pm$ 0,01	2,09 $\pm$ 0,01
24 horas	1,95 $\pm$ 0,09	2,01 $\pm$ 0,11
48 horas	2,00 $\pm$ 0,13	2,05 $\pm$ 0,15
168 horas	1,88 $\pm$ 0,12	2,08 $\pm$ 0,11
Probabilidade	0,6732	0,9711

6.1.2 Comparação da hemodinâmica do corno ipsi e contralateral ao ovário contendo o folículo dominante

Os valores da média e erro padrão da média de RI para AI e AC dos grupos GIA e GC, de acordo com os tempos da avaliação previamente descritos, estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos índices de resistência (RI) das artérias uterinas ipsilateral (AI) e contralateral (AC) ao ovário que continha o folículo dominante, dos animais submetidos à inseminação artificial (GIA) ou não (GC) nos diferentes momentos de avaliação (30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA)

Tempo em relação à IA	RI	Grupo	Média $\pm$ EPM	Probabilidade
-30 horas	AI	GIA	0,64 $\pm$ 0,03	0,5781
		GC	0,67 $\pm$ 0,02	
	AC	GIA	0,67 $\pm$ 0,02	0,3305
		GC	0,73 $\pm$ 0,05	
4 horas	AI	GIA	0,65 $\pm$ 0,02	0,8491
		GC	0,64 $\pm$ 0,01	
	AC	GIA	0,61 $\pm$ 0,01	0,0300
		GC	0,69 $\pm$ 0,02	
24 horas	AI	GIA	0,68 $\pm$ 0,04	0,5259
		GC	0,72 $\pm$ 0,04	
	AC	GIA	0,67 $\pm$ 0,03	0,0073
		GC	0,85 $\pm$ 0,04	
48 horas	AI	GIA	0,79 $\pm$ 0,04	0,4770
		GC	0,83 $\pm$ 0,04	
	AC	GIA	0,80 $\pm$ 0,02	0,7583
		GC	0,82 $\pm$ 0,04	
168 horas	AI	GIA	0,81 $\pm$ 0,05	0,9066
		GC	0,80 $\pm$ 0,05	
	AC	GIA	0,74 $\pm$ 0,03	0,1643
		GC	0,83 $\pm$ 0,04	

Foram observados efeitos de grupo somente 4 e 24 horas após a IA, sendo que os RI da AC do GIA foram mais baixos quando comparados ao GC, não sendo observadas diferenças entre os grupos em outros momentos.

Não houve interação entre grupo e tempo, desta forma, os efeitos do tempo após a IA

Tabela 6 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas ipsilateral (AI) e contralateral (RIAC) ao ovário contendo o folículo dominante dos animais nos diferentes momentos de avaliação (30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA)

Tempo em relação a IA	RI*	
	AI	AC
-30 horas	0,66 $\pm$ 0,02 ^b	0,70 $\pm$ 0,02 ^{cb}
4 horas	0,64 $\pm$ 0,01 ^b	0,65 $\pm$ 0,01 ^c
24 horas	0,70 $\pm$ 0,03 ^b	0,76 $\pm$ 0,03 ^b
48 horas	0,81 $\pm$ 0,02 ^a	0,81 $\pm$ 0,02 ^a
168 horas	0,80 $\pm$ 0,03 ^a	0,79 $\pm$ 0,03 ^a
Probabilidade	< 0,0001	0,0008

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística.

*Não houve diferença entre os valores de AI e AC nos diferentes tempos ($P > 0,05$).

O RI da AI apresentou valores semelhantes 30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA, estes valores foram mais altos 48 horas após a IA e mantiveram o mesmo padrão 168 horas após a IA. O valor de RI da AC foi mais baixo 4 horas após a IA quando comparado com 24, 48 e 168 horas após a IA, não sendo diferente daqueles obtidos 30 horas antes da IA. Os maiores valores de RI da AC foram observados 48 e 168 horas após a IA.

Os valores das médias e erro padrão da média dos índices de RI para as AI e AC podem ser melhor visualizados, respectivamente nos gráficos 3 e 4.

^{a, b} Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística.

Gráfico 3 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (RI) da artéria uterina ipsilateral ao ovário que continha o folículo dominante dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA)

^{a, b, c} Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística.

Gráfico 4 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (RI) da artéria uterina contralateral ao ovário que continha o folículo dominante dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4, 24, 48 e 168 horas após a IA)

A tabela 7 apresenta os valores da média e erro padrão da média de CI e CC dos

grupos GIA e GC, de acordo com os tempos da avaliação previamente descritos.

Tabela 7 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos escores subjetivos (0 a 4) dos cornos uterinos ipsilateral (CI) e contralateral (CC) ao ovário que continha o folículo dominante dos animais submetidos a inseminação artificial (GIA) ou não (GC) nos diferentes momentos após a inseminação artificial (4, 24, 48 e 168 horas)

Tempo após IA	Corno uterino	Tratamento	Média $\pm$ EPM	Probabilidade
4 horas	CI	GIA	1,88 $\pm$ 0,11	0,6487
		GC	2,02 $\pm$ 0,27	
	CC	GIA	1,88 $\pm$ 0,18	0,8394
		GC	1,94 $\pm$ 0,19	
24 horas	CI	GIA	2,41 $\pm$ 0,20	0,2462
		GC	2,11 $\pm$ 0,15	
	CC	GIA	1,86 $\pm$ 0,27	0,6380
		GC	2,02 $\pm$ 0,21	
48 horas	CI	GIA	2,22 $\pm$ 0,16	0,1067
		GC	1,80 $\pm$ 0,17	
	CC	GIA	2,33 $\pm$ 0,10	0,0315
		GC	1,91 $\pm$ 0,14	
168 horas	CI	GIA	2,00 $\pm$ 0,17	1,000
		GC	2,00 $\pm$ 0,14	
	CC	GIA	2,08 $\pm$ 0,12	0,5971
		GC	1,97 $\pm$ 0,16	

Houve efeito de tratamento somente 48 horas após a IA, sendo que o CC dos animais não inseminados foi mais baixo do que aqueles submetidos à IA. Todavia, não foi verificada interação entre grupo e tempo. Para verificar efeitos do tempo após a IA, os valores das variáveis CI e CC foram avaliadas desconsiderando os grupos de tratamento. Não foram notados efeitos do tempo sobre os escores de vascularização para CI e CC (Tabela 8).

Tabela 8 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos escores subjetivos (0 a 4) de vascularização dos cornos uterinos ipsilateral (CI) e contralateral (CC) ao ovário que continha o folículo dominante dos animais nos diferentes momentos de avaliação (4, 24, 48 e 168 horas após a IA)

Tempo após a IA	Vascularização*	
	CI	CC
4 horas	1,95 $\pm$ 0,14	1,91 $\pm$ 0,13
24 horas	2,26 $\pm$ 0,12	1,94 $\pm$ 0,16
48 horas	2,01 $\pm$ 0,12	2,12 $\pm$ 0,09
168 horas	2,00 $\pm$ 0,10	2,02 $\pm$ 0,10
Probabilidade	0,3316	0,6615

*Não houve diferença entre os valores de CI e CC nos diferentes tempos ($P > 0,05$).

6.1.3 Diagnóstico de Gestação

Apresentaram diagnóstico positivo de gestação cinco vacas das nove submetidas à IA, ou seja, taxa de 55,55% de prenhez do GIA.

6.2 EXPERIMENTO 2

Os resultados do experimento 2 serão apresentados em sessões separadas.

6.2.1 Avaliação do sêmen

Os resultados das análises das 20 amostras de sêmen estão apresentados na tabela 9. De acordo com os dados obtidos, procurou-se utilizar partidas diferentes de um mesmo touro para evitar efeitos do touro; desta forma, foram escolhidas as amostras de número 2 (Regular = 5 a 10% de espermatozóides PIAIC), 3 (Média = 20 a 30% de espermatozóides PIAIC) e 15 (Boa = 40 a 50% de espermatozóides PIAIC) para inseminar os diferentes grupos. A amostra 1, apesar de possuir o mais baixo percentual de PIAIC, não foi selecionada devido a baixa

motilidade (< 30%), que não é recomendada comercialmente. A escolha da amostra 15 é justificada pela maior porcentagem de células PIAIC apresentada nas partidas do touro A.

Tabela 9 – Valores de motilidade (%), vigor (1-5), concentração (número de espermatozoides por mL), integridade de membrana plasmática (MPI, %), função mitocondrial (FM, %), integridade de acrossomo (AI, %), porcentagem de células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com potencial mitocondrial (PIAIC, %), defeitos maiores (%), defeitos menores (%) e total de defeitos (%) das 20 amostras de sêmen avaliadas.

Ordem	Touro	Partida	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Concentração (n. sptz/mL)	Número sptz/palheta	MPI (%)	FM (%)	AI (%)	PIAIC (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Menores (%)	Total de Defeitos (%)
1	A	1	25	2,5	45,0	11,250	8,5	5,5	47,0	5,0	15	4	19
2	A	2	40	2,5	50,0	12,500	9,5	12,0	50,0	8,5	11	1	12
3	A	3	50	3,0	55,0	13,750	28,5	26,5	54,0	23,0	5	1	6
4	A	4	65	3,0	77,5	19,375	32,5	41,0	51,0	31,5	10	2	12
5	A	5	65	3,0	65,0	16,250	33,0	39,0	75,0	32,0	10	3	13
6	A	6	60	3,0	80,0	20,000	33,0	38,5	57,5	33,0	16	1	17
7	A	7	70	3,0	42,5	10,625	34,0	33,0	69,0	33,0	10	2	12
8	A	8	55	3,0	62,5	15,625	35,0	37,5	61,5	34,0	6	2	8
9	A	9	65	3,0	42,5	10,625	39,0	34,5	67,5	34,5	13	2	15
10	A	10	65	3,0	72,5	18,125	35,5	36,5	52,0	34,5	12	1	13
11	A	11	50	3,0	50,0	12,500	39,0	39,0	58,5	35,5	9	3	12
12	A	12	65	3,0	65,0	16,250	43,5	42,5	70,5	40,0	7	1	8
13	A	13	65	2,5	50,0	12,500	41,5	40,5	63,5	40,5	8	2	10
14	A	14	65	3,0	87,5	21,875	45,0	50,0	68,5	42,5	7	2	9
15	A	15	65	3,0	55,0	13,750	45,0	61,5	71,0	44,5	6	5	11
16	B	1	65	3,0	55,0	13,750	58,5	61,5	77,0	57,5	8	3	11
17	C	1	40	2,5	50,0	12,500	41,5	43,0	67,0	41,5	14	1	15
18	C	2	70	2,5	52,5	13,125	45,0	51,5	75,5	44,5	12	1	13
19	C	3	40	2,5	56,0	14,000	35,5	39,5	66,0	35,5	18	1	19
20	C	4	35	2,5	42,5	10,625	31,0	31,0	64,0	31,0	18	1	19

6.2.2 Hemodinâmica Uterina

Os valores da média e erro padrão da média dos índices de resistência (RI) das artérias uterinas direita e esquerda, dos animais inseminados com os sêmen B, M e R, de acordo com os tempos da avaliação previamente descritos, estão apresentados na tabela 10. Não houve diferença estatística entre as médias dos RI das artérias uterinas dos animais inseminados com sêmen de diferentes qualidades (B, M e R), nos diferentes momentos da avaliação.

Tabela 10 - Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas direita (AD) e esquerda (AE) dos animais submetidos a inseminação artificial com sêmen de diferentes qualidades: Bom (B), Médio (M) e Regular (R), em cada momento da avaliação (30 horas antes de IA, 4 e 24 horas após a IA)

Tempo em relação à IA	RI	Sêmen	Média $\pm$ EPM	Probabilidade
-30 horas	AD	B	0,77 $\pm$ 0,02	0,8534
		M	0,75 $\pm$ 0,02	
		R	0,77 $\pm$ 0,02	
	AE	B	0,72 $\pm$ 0,03	0,4170
		M	0,72 $\pm$ 0,02	
		R	0,77 $\pm$ 0,02	
4 horas	AD	B	0,61 $\pm$ 0,01	0,3177
		M	0,61 $\pm$ 0,01	
		R	0,64 $\pm$ 0,01	
	AE	B	0,62 $\pm$ 0,02	0,6572
		M	0,65 $\pm$ 0,01	
		R	0,64 $\pm$ 0,02	
24 horas	AD	B	0,68 $\pm$ 0,01	0,4811
		M	0,70 $\pm$ 0,02	
		R	0,71 $\pm$ 0,01	
	AE	B	0,63 $\pm$ 0,02	0,5652
		M	0,67 $\pm$ 0,02	
		R	0,64 $\pm$ 0,02	

Como não houve diferença estatística entre os grupos inseminados com sêmen de diferentes qualidades (B, M e R), os valores de RI das AD e AE foram avaliados quanto aos efeitos do tempo em relação à IA, desconsiderando os grupos de tratamento (Tabela 11).

Tabela 11 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas direita (AD) e esquerda (AE) dos animais nos diferentes momentos de avaliação (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA)

Tempo em relação à IA	RI*	
	AD	AE
-30 horas	0,76 $\pm$ 0,01 ^a	0,74 $\pm$ 0,01 ^a
4 horas	0,62 $\pm$ 0,01 ^c	0,64 $\pm$ 0,01 ^b
24 horas	0,70 $\pm$ 0,01 ^b	0,65 $\pm$ 0,01 ^b
Probabilidade	<0,0001	0,002

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística.

*Não houve diferença entre os valores de AI e AC nos diferentes tempos ($P > 0,05$).

Quatro horas após a IA os valores de RI da AD foram mais baixos quando comparados com 30 horas antes da IA e 24 horas após a IA, estes valores também foram mais baixos 24 horas após a IA do que 30 horas antes da IA. Em relação a RI da AE, foram observados valores mais baixos 4 e 24 horas após a IA comparados com 30 horas antes da IA, não sendo observada diferença entre 4 e 24 horas após a IA.

Os valores das médias e erro padrão da média dos índices de resistência (RI) obtidos podem ser visualizados no gráfico 5 para a artéria uterina direita e no gráfico 6 para a artéria uterina esquerda.

^{a,b,c} Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística.

Gráfico 5 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (RI) da artéria uterina direita dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA).

^{a,b} Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística.

Gráfico 6 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (RI) da artéria uterina esquerda dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA).

Os valores da média e erro padrão da média das avaliações subjetivas dos cornos uterinos, dos animais inseminados com sêmen B, M e R, de acordo com o tempo da avaliação previamente descrito estão apresentados na tabela 12. Não houve diferença estatística entre as

médias dos escores de vascularização dos cornos uterinos dos animais inseminados com sêmen de diferentes qualidades (B, M e R), em cada momento da avaliação.

Tabela 12 - Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos escores subjetivos (0 a 4) da vascularização dos cornos uterinos direito (CD) e esquerdo (CE) dos animais submetidos à inseminação artificial com sêmen de diferentes qualidades: Bom (B), Médio (M) e Regular (R), em cada momento da avaliação (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA)

Tempo em relação à IA	Variável	Sêmen	Média $\pm$ EPM	Probabilidade
-30 horas	CD	B	1,41 $\pm$ 0,29	0,2444
		M	1,88 $\pm$ 0,23	
		R	1,66 $\pm$ 0,20	
	CE	B	2,22 $\pm$ 0,09	0,0728
		M	2,22 $\pm$ 0,18	
		R	2,00 $\pm$ 0,16	
4 horas	CD	B	2,44 $\pm$ 0,16	0,2651
		M	2,41 $\pm$ 0,17	
		R	2,58 $\pm$ 0,17	
	CE	B	2,61 $\pm$ 0,22	0,9674
		M	2,19 $\pm$ 0,16	
		R	2,75 $\pm$ 0,17	
24 horas	CD	B	2,22 $\pm$ 0,15	0,5981
		M	2,19 $\pm$ 0,12	
		R	2,04 $\pm$ 0,12	
	CE	B	2,37 $\pm$ 0,12	0,8440
		M	2,45 $\pm$ 0,09	
		R	2,44 $\pm$ 0,10	

Como não houve diferença estatística entre os grupos inseminados com sêmen de diferentes qualidades (B, M e R), foram verificados efeitos do tempo em relação à IA sobre os valores de CD e CE (Tabela 13).

Tabela 13 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos escores subjetivos (0 a 4) da vascularização dos cornos uterinos direito (CD) e esquerdo (CE) dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA)

Tempo em relação à IA	Vascularização*
-----------------------	-----------------

	CD	CE
-30 horas	1,88±0,09 ^c	2,20±0,06 ^c
4 horas	2,55±0,07 ^a	2,68±0,07 ^a
24 horas	2,15±0,07 ^b	2,42±0,06 ^b
Probabilidade	<0,0001	<0,0001

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística.

*Não houve diferença entre os valores de AI e AC nos diferentes tempos ($P > 0,05$).

Quatro horas após a IA os escores de vascularização dos CD e CE foram mais altos quando comparados com 30 horas antes e 24 horas após a IA. A vascularização dos CD e CE ainda se manteve mais intensa 24 horas após a IA do que aquela apresentada 30 horas antes da IA, apesar de ter reduzido em relação a 4 horas após a IA.

Os valores das médias e erro padrão da média dos escores subjetivos obtidos do corno uterino direito estão apresentados no gráfico 7, enquanto do esquerdo estão apresentados no gráfico 8.

^{a,b,c} Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística.

Gráfico 7 – Média e erro padrão da média do escore de vascularização da avaliação subjetiva (0 a 4) do corno uterino direito dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA)

Gráfico 8 – Média e erro padrão da média do escore de vascularização avaliada de forma subjetiva (0 a 4) do corno uterino esquerdo dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA)

6.2.3 Comparação da hemodinâmica dos cornos uterinos ipsi e contralateral ao ovário contendo o folículo dominante

Os valores da média e erro padrão da média de RI da AI e AC dos animais inseminados com sêmen B, M e R, de acordo com os tempos da avaliação previamente descritos, estão apresentados na tabela 14. Não houve diferença entre os parâmetros avaliados.

Tabela 14 - Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) índice de resistência (RI) da artéria uterina ipsilateral (AI) e contralateral (AC) ao ovário que continha o folículo dominante dos animais submetidos a inseminação artificial com sêmen de diferentes qualidades: Bom (B), Médio (M) e Regular (R), em cada momento da avaliação (30 horas antes de IA, 4 e 24 horas após a IA)

Tempo em relação à IA	RI	Sêmen	Média $\pm$ EPM	Probabilidade
-30 horas	AI	B	0,75 $\pm$ 0,02	0,7445
		M	0,73 $\pm$ 0,02	
		R	0,76 $\pm$ 0,02	
	AC	B	0,74 $\pm$ 0,03	0,6171
		M	0,74 $\pm$ 0,02	
		R	0,77 $\pm$ 0,02	
4 horas	AI	B	0,61 $\pm$ 0,01	0,1428
		M	0,61 $\pm$ 0,01	
		R	0,65 $\pm$ 0,01	
	AC	B	0,62 $\pm$ 0,02	0,5531
		M	0,66 $\pm$ 0,01	
		R	0,64 $\pm$ 0,02	
24 horas	AI	B	0,67 $\pm$ 0,01	0,3034
		M	0,70 $\pm$ 0,01	
		R	0,66 $\pm$ 0,02	
	AC	B	0,64 $\pm$ 0,02	0,5169
		M	0,67 $\pm$ 0,02	
		R	0,68 $\pm$ 0,02	

Como não houve diferença estatística entre os grupos inseminados com sêmen de diferentes qualidades (B, M e R), os valores de RI da AI e da AC foram avaliados quanto ao tempo em relação à IA (Tabela 15).

Tabela 15 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do índice de resistência (RI) das artérias uterinas ipsilateral (AI) e contralateral (AC) ao ovário contendo o folículo dominante dos animais nos diferentes momentos de avaliação (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA)

Tempo em relação a IA	RI*	
	AI	AC
- 30 horas	0,75 $\pm$ 0,01 ^a	0,75 $\pm$ 0,01 ^a
4 horas	0,62 $\pm$ 0,01 ^c	0,64 $\pm$ 0,01 ^b
24 horas	0,68 $\pm$ 0,01 ^b	0,68 $\pm$ 0,01 ^b
Probabilidade	< 0,0001	< 0,0001

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística.

*Não houve diferença entre os valores de AI e AC nos diferentes tempos ($P > 0,05$).

O valor mais alto de RI da AI foi observado trinta horas antes da IA, sendo seu valor mais baixo encontrado 4 horas após a IA, aumentando 24 horas após a IA, mas ainda inferior àquele encontrado 30 horas antes da IA. Quanto ao RI da AC, sofreu redução 4 horas após a IA comparado aquele encontrado 30 horas antes da IA; todavia, esta redução se manteve até 24 horas após a IA. Os valores das médias e erro padrão da média dos índices de resistência da artéria uterina ipsilateral ao ovário contendo o folículo dominante podem ser visualizados no gráfico 9. O gráfico 10 corresponde aos valores das médias e erro padrão da média dos índices de resistência da artéria uterina contralateral ao ovário com folículo dominante.

^{a, b, c} Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística.

Gráfico 9 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (RI) da artéria uterina ipsilateral ao ovário contendo o folículo dominante dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA)

^{a, b, c} Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística.

Gráfico 10 – Média e erro padrão da média do índice de resistência (RI) da artéria uterina contralateral ao ovário contendo o folículo dominante dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA)

Os valores da média e erro padrão da média de CI e CC dos animais inseminados

com os sêmens B, M e R, de acordo com os tempos da avaliação previamente descritos, estão apresentados na Tabela 16. Não houve diferença entre os parâmetros avaliados.

Tabela 16 - Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do escore de avaliação subjetiva dos cornos uterinos ipsilateral (CI) e contralateral (CC) ao ovário que continha o folículo dominante dos animais submetidos à inseminação artificial com sêmen de diferentes qualidades: Bom (B), Médio (M) e Regular (R), em cada momento da avaliação (30 horas antes de IA, 4 e 24 horas após a IA)

Tempo em relação à IA	Corno uterino	Sêmen	Média $\pm$ EPM	Probabilidade
-30 horas	CI	B	1,84 $\pm$ 0,19	0,2394
		M	2,11 $\pm$ 0,14	
		R	1,74 $\pm$ 0,11	
	CC	B	2,15 $\pm$ 0,10	0,2106
		M	2,34 $\pm$ 0,11	
		R	2,05 $\pm$ 0,11	
4 horas	CI	B	2,48 $\pm$ 0,11	0,2145
		M	2,48 $\pm$ 0,12	
		R	2,73 $\pm$ 0,10	
	CC	B	2,66 $\pm$ 0,13	0,9438
		M	2,62 $\pm$ 0,16	
		R	2,69 $\pm$ 0,13	
24 horas	CI	B	2,27 $\pm$ 0,16	0,6668
		M	2,15 $\pm$ 0,11	
		R	2,11 $\pm$ 0,11	
	CC	B	2,31 $\pm$ 0,10	0,4987
		M	2,50 $\pm$ 0,09	
		R	2,37 $\pm$ 0,12	

Os valores da média e erro padrão da média dos escores de avaliação subjetiva da vascularização dos cornos uterinos ipsi (CI) e contralateral (CC) ao ovário que continha o folículo dominante, de acordo com os tempos da avaliação previamente descritos, desconsiderando os grupos de tratamento estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) do escore de avaliação subjetiva da vascularização dos cornos uterinos ipsilateral (CI) e contralateral (CC) ao folículo dominante dos animais nos diferentes momentos de avaliação (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA)

Tempo em relação a IA	Vascularização do corno uterino	
	CI	CC
-30 horas	1,90 $\pm$ 0,08 ^{cA}	2,18 $\pm$ 0,06 ^{cB}
4 horas	2,56 $\pm$ 0,06 ^a	2,66 $\pm$ 0,06 ^a
24 horas	2,18 $\pm$ 0,07 ^{bA}	2,39 $\pm$ 0,06 ^{bB}
Probabilidade	< 0,0001	< 0,0001

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística.

^{A,B} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística.

Quatro horas após a deposição do sêmen houve um aumento da vascularização dos cornos uterinos ipsi e contralaterais comparado a 30 horas antes da IA. Vinte e quatro horas após a IA houve uma redução desta vascularização (CI e CC) em relação a 4 horas, mas mantendo-se mais alta, em CI e CC, do que aquela encontrada 30 horas antes da IA.

Quando os valores de CI e CC foram comparados, foi observada maior vascularização no corno contralateral ao ovário que continha o folículo dominante 30 horas antes da IA e 24 horas após a IA, de modo que quatro horas após a IA os valores foram semelhantes.

Os valores das médias e erro padrão da média dos escores subjetivos do corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o folículo dominante (CI) podem ser visualizados no gráfico 11. O gráfico 12 corresponde aos valores das médias e erro padrão da média dos escores subjetivos do corno uterino contralateral ao ovário contendo o folículo dominante (CC).

a, b, c Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística.

Gráfico 11 – Média e erro padrão da média do escore de avaliação subjetiva do corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o folículo dominante (CI) dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA)

a, b, c Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística.

Gráfico 12 – Média e erro padrão da média do escore de avaliação subjetiva do corno uterino contralateral ao ovário contendo folículo dominante (CI) dos animais avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA)

6.2.4 Taxa de Prenhez

A taxa de prenhez (%) de acordo com o grupo de tratamento quanto à qualidade do sêmen utilizado na inseminação artificial está apresentada no gráfico 13.

^{a,b} Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística.

Gráfico 13 – Taxa de prenhez (%) de acordo com a qualidade do sêmen utilizado para a inseminação artificial: Boa (B) = 40 a 50% de espermatozóides PIAIC, Média (M) = 20 a 30% de espermatozóides PIAIC e Regular (R) = 5 a 10% de espermatozóides PIAIC

A taxa de prenhez dos animais inseminados com o sêmen B foi maior quando comparada com o sêmen R. Não foi observada diferença na taxa de prenhez dos animais inseminados com o sêmen M quando comparada com a taxa de prenhez dos demais grupos.

7 DISCUSSÃO

Experimento 1

Este experimento foi desenvolvido na busca de uma técnica não invasiva para avaliar a resposta inflamatória uterina em decorrência da deposição de sêmen de qualidade conhecida, assim os princípios da ultrassonografia Doppler para avaliar alterações na hemodinâmica uterina, já citados por Silva et al. (2005) poderiam contribuir neste estudo.

Bollwein et al. (2000), Bollwein, Mayer e Stolla (2003) e Ginther et al. (2007) consideram que a diminuição no valor do índice de resistência (RI) indica redução da impedância do fluxo de sangue no vaso avaliado, ou seja, quando o RI diminui, aumenta o volume de sangue que passa pelo vaso em questão. Da mesma forma, Carvalho e Addad (2009b) afirmam que geralmente ocorre vasodilatação como resposta a processos inflamatórios, promovendo diminuição da resistência vascular e aumento do fluxo, sendo assim, esperava-se que o fluxo sanguíneo fosse maior após a deposição do sêmen no trato reprodutivo da fêmea devido à resposta inflamatória que ocorre após este procedimento. Entretanto, neste experimento ao se comparar o grupo de vacas submetidas à IA (GIA) com o grupo não inseminado (GC) não foram notadas alterações significativas quanto a hemodinâmica uterina.

Com relação aos períodos de avaliação, o menor valor de RI para a artéria uterina direita ocorreu 4 horas após a IA, coincidindo com o período que se esperaria como pico da resposta inflamatória (KAUFFMAN et al., 2009), os valores obtidos neste experimento são sugestivos de maior vascularização uterina no período. Entretanto, vale salientar que o comportamento da artéria uterina esquerda foi diferente da direita. Para o RI da artéria uterina esquerda, os valores foram semelhantes 30 horas antes da ovulação, 4 e 24 horas após a IA, atingindo valores mais altos somente 48 e 168 horas após a IA.

Apesar dos grupos GIA e GC não apresentaram diferenças com relação aos valores de RI quando foram comparados os lados direito e esquerdo, foram notados comportamentos diferentes entre ambos em relação ao tempo da IA, o que não se justifica cientificamente. Assim, para tentar elucidar as diferenças encontradas, a avaliação passou a ser realizada tratando-se do RI das artérias uterinas ipsi (AI) e contralateral (AC) ao ovário que continha o folículo dominante e vascularização dos cornos uterinos ipsi (CI) e contralateral (CC) ao ovário contendo o folículo dominante. Foram encontrados menores valores de RI da AC para

GIA 4 e 24 horas após a IA do que para GC, o que indica maior perfusão sanguínea no grupo submetido à AI. Estes achados são contraditórios aos de Bollwein, Sowade e Stolla (2003), que afirmam que há aumento do fluxo sanguíneo após a deposição de sêmen no útero de éguas, no entanto observaram que este aumento ocorre apenas na vascularização ipsilateral ao folículo dominante.

Resultados semelhantes aos observados para a artéria uterina esquerda foram notados para o RI da artéria uterina ipsilateral, sendo que foram observados valores semelhantes nos períodos 30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA e mais altos nos demais períodos avaliados. Em contrapartida o RI da artéria contralateral apresentou o menor valor 4 horas após a IA, valores intermediários 30 horas antes da IA e 24 horas após a IA e 48 e 168 horas após a IA seguiram padrão semelhante, apresentando-se mais elevados que nos demais períodos. Tais resultados demonstram que a vascularização mais intensa aconteceu quatro horas após a IA e que de 24 a 48 horas após a IA a vascularização uterina se estabiliza.

Esses dados coincidem com os achados de Herzog e Bollwein (2007) que relatam que estudos realizados em vacas durante o ciclo estral mostraram que o fluxo sanguíneo do útero é maior durante os períodos de proestro e estro, devido à ação do estrógeno, que causa vasodilatação, bem como redução do fluxo sanguíneo quando a concentração de progesterona plasmática aumenta, devido ao efeito negativo que o hormônio causa sobre a perfusão uterina. Concordam também com Nascimento e Santos (2003), que afirmam que o endométrio sofre modificações estruturais e funcionais de acordo com atividade endócrina do ovário, de forma que com a ação do estrógeno ocorre proliferação das glândulas endometriais, maior vascularização, maior fluxo sanguíneo e maior atividade metabólica.

No mesmo sentido, estudos realizados por Ford e Chenault (1981) demonstraram que o fluxo sanguíneo da artéria uterina foi menor quando a concentração de progesterona era maior e que o fluxo aumentou quando o hormônio predominante era o estrógeno. Ford et al. (1979) citam que o fluxo sanguíneo sofre alterações durante o ciclo estral em vacas e também afirmam que durante a fase luteal o fluxo sanguíneo uterino é menor.

Kaufmann et al. (2009) notaram o aumento de células inflamatórias na citologia uterina de vacas que haviam sido inseminadas há quatro horas. Como as alterações da vascularização ocorreram apenas na artéria uterina contralateral ao ovário que continha o folículo dominante, 4 e 24 horas após a IA não foi possível afirmar, utilizando a ultrassonografia Doppler colorido, qual é o momento exato que ocorre o pico da reação inflamatória uterina após a deposição do sêmen no trato reprodutivo da fêmea, o qual se caracteriza pelo aumento da vascularização e consequente aumento das células PMN.

Com as alterações observadas de acordo com períodos de avaliação, pode-se sugerir que as mudanças fisiológicas que acontecem durante o ciclo estral influenciaram a vascularização uterina de vacas.

A técnica da avaliação da vascularização uterina por escores subjetivos foi utilizada por Silva et al. (2005), que avaliaram o útero de éguas prenhes. O estudo indica que o escore mais alto representa maior vascularização do corno uterino avaliado. Os grupos GIA e GC não apresentaram diferença com relação aos escores de avaliação quando os dados foram avaliados levando em consideração os cornos uterinos direito e esquerdo, nem quando foram considerados os cornos uterinos ipsi e contralateral ao ovário que continha o folículo dominante, sugerindo que não há diferença entre a vascularização uterina de animais inseminados e não inseminados em bovinos, detectáveis pelo modo color da ultrassonografia Doppler. Utilizando esta técnica, também não foi encontrada diferença entre os tempos de avaliação. De acordo com Herzog e Bollwein (2007) os escores deveriam ser mais altos nos períodos de proestro e estro, ou seja, 30 horas antes da IA e 4 horas após a IA. Os resultados também confrontam os achados de Troedsson (1999) que cita que após a deposição do sêmen no trato reprodutivo, as éguas apresentam reação inflamatória, caracterizada pela rápida infusão de PMN. Considerando que as células polimorfonucleares são transportadas pelo sangue ao local da inflamação, era previsto que o fluxo sanguíneo do GIA fosse maior após a IA. Não foram encontrados trabalhos utilizando esse tipo de técnica na avaliação da resposta inflamatória uterina após IA em bovinos.

A diferença de resultados obtidos pelo modo espectral e pelo modo color Doppler pode indicar que o modo espectral é mais sensível para detectar alterações na vascularização do útero de vacas do que o modo color Doppler.

A avaliação ultrassonográfica em modo espectral foi descrita por diversos autores (BOLLWEIN, MAYER, STOLLA, 2003; BOLLWEIN, SOWADE, STOLLA, 2003; SILVA et al., 2005; PANARACE et al., 2006; HONNENS et al., 2008a; HONNENS et al., 2008b). O aparelho de ultrassom, utilizado neste experimento, quando em modo espectral, fornece vários dados que para serem reais é preciso que haja correta angulação entre a probe e o vaso sanguíneo avaliado (GINTHER et al., 2007). Durante o exame, nem sempre há colaboração ideal dos animais, de modo que grande parte da dificuldade na realização dos exames diz respeito a fatores relacionados ao comportamento do animal. A mesma dificuldade foi notada por Carvalho e Addad (2009a). A anatomia, temperamento agitado, padrão respiratório inadequado, motilidade exacerbada das alças intestinais e excesso de conteúdo ruminal dificultam a angulação ideal da probe. Contudo, Silva et al. (2005) afirmaram que o índice de

resistência (RI) pode ser utilizado para a avaliação do trato reprodutivo sem que seja necessária a exata angulação da probe em relação ao vaso.

Experimento 2

Com base nos achados do experimento 1, no qual a vascularização uterina dos animais avaliados não foi diferente quando comparados por ultrassonografia nos períodos 48 e 168 horas após a IA, tanto na avaliação em modo espectral quanto em modo color Doppler, foi determinado que as avaliações do experimento 2 seriam realizadas 30 horas antes da IA, 4 e 24 horas após a IA. Essa determinação foi reforçada pelos achados de Kaufmann et al. (2009) e Bollwein, Sowade e Stolla (2003) que sugerem que há aumento da vascularização após a IA devido a reação inflamatória e pelas afirmações de Herzog e Bollwein (2007) que relatam as alterações da vascularização uterina de acordo com a fase do ciclo estral, sendo que Kaufmann et al. (2009) notaram resposta inflamatória 4 horas após a IA e Bollwein, Sowade e Stolla (2003) observaram aumento do fluxo sanguíneo e aumento das células inflamatórias no útero de éguas uma hora após a deposição do sêmen, ainda notaram que 24 horas após a IA o fluxo sanguíneo era controlado.

Mesmo não sendo notadas alterações quanto à hemodinâmica uterina em animais submetidos ou não à IA no experimento 1, poderia se esperar que a deposição de sêmen de pior qualidade, ou seja, com maior porcentagem de células lesadas, poderia intensificar a resposta inflamatória ao sêmen e ser possível detectar esta alteração por ultrassonografia Doppler colorido. Assim, foi sugerido que a deposição de sêmen com menor percentual de células PIAIC aumentaria a vascularização uterina devido à maior resposta inflamatória, com aumento de PMN (TROEDSSON, 1999). Entretanto, não foi observada diferença no fluxo sanguíneo do útero dos animais inseminados com sêmen de diferentes qualidades tanto na avaliação objetiva (modo espectral) quanto na subjetiva (modo color Doppler). Esses resultados foram encontrados quando foram comparados os dados obtidos das artérias uterinas direita e esquerda e quando foram consideradas as artérias ipsi e contralateral ao ovário que continha o folículo dominante. Os achados não coincidem com os dados demonstrados por Bollwein, Sowade e Stolla (2003) que, ao avaliar a artéria uterina de éguas, utilizando o modo espectral, demonstraram que há aumento do fluxo sanguíneo nessa artéria após a deposição de sêmen fresco *in natura* quando comparado ao fluxo sanguíneo de fêmeas que tiveram apenas

diluidor de sêmen à base de leite desnatado depositado no útero. Os mesmos autores sugerem que esse aumento se deve à inflamação uterina que ocorre após a inseminação artificial ou devido a componentes vasodilatadores presentes no plasma seminal. Outro dado importante que deve ser considerado nesta comparação é que o volume de sêmen depositado durante a IA em equinos é maior do que aquele depositado na IA em bovinos, sendo esta resposta menos intensificada na espécie bovina.

Com relação aos períodos de avaliação, o valor de RI da artéria direita foi menor 4 horas após a IA, do que aquele observado 30 horas antes da IA. Este valor aumentou 24 horas após a IA, mas ainda se manteve mais baixo do que aquele 30 horas antes da IA. O mesmo não ocorreu com o RI da artéria esquerda, que apresentou redução nestes valores 4 horas após a IA quando comparado ao período 30 horas antes da IA; contudo 24 horas após a IA o valor de RI se manteve semelhante ao período de 4 horas. Apesar das artérias terem se comportado de maneiras diferentes, não houve diferença entre os valores de RI da AD e AE nos diferentes períodos. Para tentar esclarecer essa diferença de padrões, os dados foram comparados levando em consideração a artéria uterina ipsi e contralateral ao ovário que continha o folículo dominante.

Avaliando os dados dessa forma nota-se que o comportamento de RI da artéria ipsilateral é diferente da contralateral, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística entre elas (ipsi e contralateral). Esse comportamento diferente pode ser explicado pela fisiologia de modo que 4 horas após a IA ocorre um pico de vascularização no corno uterino ipsilateral ao ovário que continha o folículo dominante, necessário para que haja a ovulação, e que, após a ovulação a vascularização volta a diminuir. Tal fato não se repetiria no corno contralateral ao ovário que continha o folículo dominante por não haver necessidade de um pico de vascularização, já que deste lado não ocorre a ovulação.

Outra possível explicação seria pela reação inflamatória causada por maior migração de espermatozoides para o corno uterino ipsilateral ao ovário que continha o folículo dominante por fatores quimiotáticos. Bollwein, Sowade e Stolla (2003) afirmam que em éguas o espermatozoide causou alterações no fluxo sanguíneo do oviduto ipsilateral ao ovário que continha o folículo dominante e que essas alterações foram causadas pelo processo inflamatório que é desencadeado pela presença do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea.

Na avaliação subjetiva, os cornos direito e esquerdo seguiram os mesmo padrões de modo que não foram encontradas diferenças entre ambos. Não diferindo quando se considerou cornos ipsi e contralateral. Este dado reforça a hipótese de que avaliação pelo modo espectral

é mais sensível que a subjetiva, pelo modo color Doppler. Entretanto, apenas na avaliação subjetiva foi observada diferença entre os cornos ipsi e contralateral 30 horas antes da IA e 24 horas após a IA, de modo que nos dois períodos a vascularização foi mais alta no corno uterino contralateral ao ovário que continha o folículo dominante.

De acordo com a literatura consultada, não foram encontrados subsídios nas alterações do fluxo sanguíneo causadas pelos hormônios reprodutivos, bem como pelo processo inflamatório que ocorrem após a deposição do sêmen que possam justificar esses dados.

Com base nos resultados deste experimento e na literatura consultada é possível sugerir que a reação inflamatória uterina pós cobertura seja mais sutil em vacas do que em outras espécies como equinos (KATILA, 1995; NIKOLAKOPOULOS; WATSON, 2000; BOLLWEIN, SOWADE, STOLLA, 2003) e suínos (BISCHOF et al., 1994; ROZEBOOM et al., 1999) e que a quantificação desta inflamação pode ser melhor avaliada por outras técnicas que não a ultrassonografia Doppler colorido.

A taxa de prenhez dos grupos inseminados com sêmen de diferentes qualidades se enquadra nos valores esperados para protocolos de IATF (SALES et al., 2011), entretanto vale observar a diferença existente entre o sêmen B (64,7%) e o sêmen R (36,2%). Todas as partidas de sêmen utilizadas no experimento 2 são consideradas aptas para a comercialização e uso na IA de acordo com o Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), contudo os resultados deste estudo demonstram que o sucesso da fertilização depende da integridade e função de todas as estruturas que compõem a célula espermática e concordam com a afirmação de Hallap et al. (2004) de que a combinação de vários parâmetros para avaliar a qualidade do sêmen bovino pode explicar de maneira mais fidedigna as possíveis diferenças de fertilidade observadas entre touros em relação a qualquer avaliação espermática tomada isoladamente já que, segundo Braundmeier e Miller (2001) o potencial de fertilidade do sêmen depende da correta função de diversos componentes da célula espermática.

Segundo Arruda et al. (2005) a combinação de diversas sondas fluorescentes possibilita a avaliação simultânea de diferentes estruturas espermáticas. A avaliação simultânea da integridade de membrana plasmática e acrossomal e função mitocondrial desenvolvida por Celeghini et al. (2007) é uma técnica que possibilita a avaliação de diversas estruturas em pouco tempo e que pode contribuir na predição da capacidade fertilizante de uma amostra de sêmen, pois fornece maior número de dados para a determinação da porcentagem de células espermáticas na amostra com capacidade para fertilizar o ovócito.

Os dados deste experimento concordam com os achados de Januskauskas et al. (2001), que afirmam que a avaliação da qualidade do sêmen por sondas fluorescentes pode prever a capacidade fertilizante do sêmen. O grupo observou que células com a membrana plasmática lesada são negativamente correlacionadas com a taxa de fertilidade ($r=-0,39$). Anzar et al. (2002) também observaram correlação negativa ($r=-0,87$) entre fertilidade e espermatozoides com membrana lesada. Concordam também com Liu e Baker (1992) que afirmam que a integridade do acrossomo influencia as taxas de fertilização *in vitro*.

De maneira semelhante, estudos realizados por Kasai et al. (2002), demonstraram que quando espermatozoides humanos são divididos de acordo com o potencial de mitocôndria em alto, médio e baixo potencial, baseando-se no uso de JC-1, os índices de fertilização *in vitro* são maiores para o grupo com alto potencial mitocondrial.

Segundo Verstegen et al. (2002), altas porcentagens de espermatozoides com defeito de acrossomo estão associadas a falhas na fertilização. Entretanto, estudos realizados por Tanghe et al. (2002) demonstraram moderada correlação da integridade do acrossomo e a formação de pró núcleos após a fertilização *in vitro* ($0,30 < r < 0,50$).

Apesar dos resultados deste experimento indicarem que o uso da técnica de associação de sondas fluorescentes pode ser útil na estimativa da capacidade fertilizante do sêmen, mais estudos ainda são necessários para determinar qual deve ser o número mínimo de espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial (PIAIC) por dose inseminante para se obter sucesso na fertilização. Isso poderia contribuir na exclusão de doses problemáticas ou até, em alguns casos, para reduzir o número de espermatozoides necessários por palheta para a obtenção da prenhez.

Conclusões

8 CONCLUSÕES

Experimento 1:

1. A deposição do sêmen no trato reprodutivo das fêmeas bovinas não causa alteração na hemodinâmica uterina detectável por ultrassonografia nos modos espectral e color Doppler, ou seja, não altera RI das artérias uterinas, nem a vascularização dos cornos uterinos.
2. Os valores de RI das artérias uterinas são mais baixos entre 30 horas antes da IA e 24 horas após a IA em relação aos períodos 48 e 168 horas após a IA, sendo que nenhuma alteração detectável por ultrassonografia em modo color Doppler ocorre na vascularização dos cornos uterinos.

Experimento 2:

1. A deposição de sêmen com menores percentuais de espermatozoides PIAIC no trato reprodutivo de fêmeas bovinas não altera o índice de resistência das artérias uterinas, nem o fluxo sanguíneo detectável por ultrassonografia nos modos espectral e color Doppler, respectivamente.
2. Quatro horas após a IA há uma redução no RI das artérias uterinas e aumento da vascularização dos cornos uterinos em relação a 30 horas antes da IA, sendo que 24 horas após a IA o RI aumenta e a vascularização diminui em relação a 4 horas após a IA, mas ainda não alcançam os valores encontrados antes da IA, independente da qualidade do sêmen.
3. A inseminação artificial com menor percentual de espermatozoides PIAIC causa redução na taxa de fertilidade em bovinos, mesmo que a partida se encontre dentro das condições mínimas desejadas para comercialização e uso na IA.

Referências

REFERÊNCIAS

- 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.
- ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; RAPHAEL, C. F.; CELEGHINI, E. C. C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 8-16, 2007.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; SOUZA, L. W. O.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; GARCIA, A. R. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 33, p. 145-150, 2005.
- 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.
- ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M. M.; KROETSCH, T. G.; PAULS, K. P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 354-360, 2002.
- 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.
- BISCHOF, R J.; LEE, C. S.; BRANDON, M. R.; MEEUSEN, E. Inflammatory response in the pig uterus induced by seminal plasma. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 26, p. 131-146, 1994.
- BOLLWEIN H.; SOWADE C.; STOLLA R. The effect of semen extender, seminal plasma and raw semen on uterine and ovarian blood flow in mares. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 607-16, 2003.
- 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.

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.

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

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

CARVALHO, C. F.; ADDAD, C.A. Interpretação da imagem doppler. In: CRVALHO, C. F. **Ultrassonografia doppler em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2009b, p. 15-19.

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

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

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**, p. 1285-1292, 2010.

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, acrossomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.

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

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.

CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. M. Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination programa. **Theriogenology**, n. 48, p. 721-731, 1997.

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.

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.

FERREIRA J. C.; GASTAL, E. L.; GINTHER, O. J. Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. **Reproduction**, v. 135, p. 541-550, 2008.

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.

FORD, S. P.; CHENAULT, J. R. Blood flow to the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral uterine horn of cows during the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 62, p. 555-562, 1981.

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 and Fertility**, n. 56, p. 53-62, 1979.

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

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.

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.

HALLAP, T.; HAARD, M.; JAAKMA, U.; LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, v. 62, p. 702-713, 2004.

HANSEN, P. J. Imunologia da Reprodução. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7 ed. Barueri, SP : Manole, 2004, p. 345-357.

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

HONDA, A.; SIRUNTAWINETI, J.; BABA, T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. **Human Reproduction Update**, v. 8, p. 405-412, 2002.

HONNENS, A.; NIEMANN, H.; PAUL, V.; MEYER, H. H. D.; BOLLWEIN, H. Doppler sonography of the uterine arteries during a superovulatory regime in cattle. Uterine blood flow in superovulated cattle. **Theriogenology**, v. 70, p. 859-867, 2008a.

HONNENS, A.; VOSS, C.; HERZOG, K.; NIEMANN, H.; RATH, D.; BOLLWEIN, H. Uterine blood flow during the first 3 weeks of pregnancy in dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, p. 1048-1056, 2008b.

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.

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.

KASAI, T.; OGAWA, K.; MIZUNO, K.; NAGAI, S.; UCHIDA, Y.; OHTA, S.. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. **Asian Journal of Andrology**, v. 4, p. 97–103, 2002.

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 cephalixin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 63, p. 818–830, 2005b.

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.

KATILA, T. Onset and durations of uterine inflammation of uterine response of mares with fresh semen. **Biology of Reproduction Monography**, v. 1, p. 515-517, 1995.

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.

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

LIU, D. Y.; BAKER, H. W., Tests of human sperm function and fertilization in vitro. **Fertility and Sterility** v. 58, p. 465-483, 1992.

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 do XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Goiânia, GO. 2005.

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

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; HAYASHI, K. G.; KAMADA, D.; KAWASHIMA, C.; KANEKO, E.; ACOSTA, T. J.; MATSUI, M. A potential use of color 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.

MOTOZUMI, M.; MIYAMOTO, A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. **The Veterinary Journal**, v. 181, p. 232-240, 2008.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução nos animais domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

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.

NEVES, J. P.; OLIVEIRA, J. F. C.; MACIEL, M. N. Diagnóstico de gestação em bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001, p. 7-8.

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.

OHASHI, O. M. Inseminação artificial em bubalinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 1.ed. São Paulo: Varela, 2002. . p. 97-110.

PANARACE, M.; GARNIL, C., MARFIL, M.; JAUREGUI, G.; LAGIOIA, J.; LUTHER, E.; MEDINA, M. Transrectal Doppler sonography for evaluation of uterine blood flow through

pregnancy in 13 cows. **Theriogenology**, v.66, p.2113-2119, 2006.

PAPA, F. O.; GABALDI, S. H.; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelção 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.

RAMALHO-SANTOS, J.; SCHATTEN, G.; MORENO, R. D. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1043-1051, 2002.

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

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

ROZEBOOM, K. J.; TROEDSSON, M. H. T.; CRABO, B. G. Characterization of uterine leukocyte in gilts after artificial insemination. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 8, p. 2201-2206, 1999.

SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; GIROTO, R. W.; SOUZA, A. H., BARUSELLI, P. S. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 1-7, 2011.

SANTOS, G. C. J. **Viabilidade de sêmen equino congelado em meios diluidores de diferentes composições**. 2003. 58p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária em reprodução animal) - Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Belo Horizonte-MG, 2003.

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.

SILVA L. A.; GINTHER O. J. An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 337-343, 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, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.

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, p. 231-234, 1986.

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.

TANGHE,S.; VAN SOOM, A.; STERCKX, V.; MAES, D.; KRUIF, A. Assessment of Different Sperm Quality Parameters to Predict in vitro Fertility of Bulls. **Reproductions of Domestic Animals**, v. 37, p.127-132, 2002.

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

TROEDSSON, M. H. T.; STEIGER, B. N.; IBRAIHM, N. M.; FOSTER, D. N. CRABO, B. G. Mechanism of sperm-induced endometrits in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 307, 1995.

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

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