ANDRÉ FERNANDO FREIRE

**Desenvolvimento de um método de microlavagem para estudo do
microambiente uterino em bovinos: efeitos na função luteínica, crescimento
folicular e manutenção da prenhez inicial**

São Paulo
2006

ANDRÉ FERNANDO FREIRE

**Desenvolvimento de um método de microlavagem para estudo do
microambiente uterino em bovinos: efeitos na função luteínica, crescimento
folicular e manutenção da prenhez inicial**

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
Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Mário Binelli

São Paulo
2006

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1652
FMVZ

Freire, André Fernando

Desenvolvimento de um método de microlavagem para estudo do microambiente uterino em bovinos: efeitos na função luteínica, crescimento folicular e manutenção da prenhez inicial / André Fernando Freire. -- São Paulo: A. F. Freire, 2006.
123 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2006.

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Binelli.

1. Microambiente uterino. 2. Cateter. 3. Útero. 4. Progesterona.
5. Bovino. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento do método de microdiálise *in vivo* para estudo do microambiente uterino: efeitos na duração do ciclo estral e na manutenção da prenhez inicial em bovinos", Protocolo nº439/2004, utilizando 30 bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mário Binelli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Development of microdialysis method *in vivo* to study the uterine microenvironment: effects on the duration of the estrous cycle and maintenance of pregnancy in bovines", protocol number 439/2004, utilizing 30 bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Mário Binelli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 29 de julho de 2004

Profª Drª Júlia Maria Marcondes
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FREIRE, André Fernando

Título: Desenvolvimento de um método de microlavagem para estudo do microambiente uterino em bovinos: efeitos na função luteínica, crescimento folicular e manutenção da prenhez inicial

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 Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

A Deus por me guiar em seu caminho e me carregar em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais José Aparecido Freire e Lourdes da Silva Freire pelo amor, apoio e a oportunidade de me tornar um Medico Veterinário e principalmente um homem.

A minha namorada Carolina pelo seu amor, compreensão e companheirismo.

Ao Senhor Reginaldo Bertholino pelo qual tenho um carinho especial, por toda amizade e oportunidades oferecidas em todos esses anos de convivência.

Ao amigo e pós-graduando Marcelo Cardoso de Lima pelo companheirismo, amizade, ensinamentos e ajuda proporcionada ao longo dessa trajetória.

Ao meu irmão Silas Eduardo Freire por toda amizade, amor e dedicação nesses vinte e dois anos de vida juntos.

Ao meu amigo irmão Filipe Fedozzi por toda ajuda e amizade o qual eu considero muito.

Aos meus avós Joel Germano Freire e Hermantina Galerani Freire por todos os ensinamentos e educação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mário Binelli pela orientação, amizade, dedicação, ensinamentos e exemplo de incansável profissionalismo, bem como ser humano.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, especialmente ao Departamento de Reprodução Animal.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro na qual permite o desenvolvimento e a realização deste projeto e também o meu envolvimento de maneira integral com o trabalho na área de pesquisa.

A Profa. Dra. Erica Zimmerknopf pela co-orientação, amizade e oportunidade que me proporcionou.

À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres FMVZ-USP pelo apoio científico.

Ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda pela disponibilização de materiais utilizados, assim como a grande ajuda na descongelação, seleção e inovulação dos embriões.

Ao Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira pelas longas conversas orientadoras e materiais cedidos para realização dos experimentos.

A Prof. Anneliese de Souza Traldi pela orientação e companheirismo.

Aos Professores Pietro Sampaio Baruselli, Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção e José Antonio Visintin pelos ensinamentos e ajuda prestada.

As secretárias da Pós-graduação Harumi, Dayse, Claudia e Joana por toda atenção oferecida.

À equipe de pesquisa do LFEM: Vanessa Marques, Luciana Parra, Flavia Barros, David Fantini, Rafael S. Bisinotto, Bruna Ibiapina, Eduardo Pontes, Adriano Siqueira, Mariana Giessetti, Claudia Niemeyer por toda ajuda oferecida.

A amiga Cláudia Maria Bertan Membrive por toda ajuda e ensinamentos prestados.

Ao amigo José Rodrigo pela disponibilização dos dias de trabalho inclusive de finais de semana para a inóculo dos embriões na fase experimental.

Aos amigos André Furugem, Juliana Nascimento, Eneiva Carla Carvalho, Cláudia Fernandes Raphael, Karen Peres, Fernando, Alexandre e Fernando.

Aos estagiários Janandra e Lorena que passaram alguns momentos disponibilizando seu precioso tempo nos ajudando.

As minhas amigas Polyana e Raquel por toda ajuda cedida nos momentos mais importantes

A Isabel, secretária do VRA-USP/Pirassununga pela atenção e ajuda.

Aos funcionários da prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga e da FMVZ, Marcio, José Maria, André, Creusa além do pessoal do Abatedouro Escola (em especial Élcio, Mauricio, Dito Beloni, Dito e Mario) por toda colaboração e amizade construída neste período experimental.

Ao Valdir, funcionário do Gado de Leite pela ajuda em momentos difíceis.

Ao Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos e seu corpo docente pelo apoio e prestação de serviço, assim como os materiais e instalações cedidas.

À Empresa HpBio-próteses em especial Dr. Hélio Magalhães e sua filha Márcia pelo desenvolvimento de inúmeros cateteres.

Ao Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico pela doação de hormônios e fármacos, necessários para a realização dos experimentos.

Ao Dr. Álvaro Leme da Fazenda Bela Vista Guaxupé pelos ensinamentos de novas técnicas cirúrgicas.

Ao Prof. Dr. Eduardo H. Birgel Junior pela boa vontade em ajudar no projeto, com sua experiência cirúrgica.

Enfim, a todos que têm colaborado de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho, dedico meus sinceros agradecimentos.

Aos animais pelo conhecimento e desenvolvimento científico que me proporcionou.

RESUMO

FREIRE, A. F. **Desenvolvimento de um método de microlavagem para estudo do microambiente uterino em bovinos:** efeitos na função luteínica, crescimento folicular e manutenção da prenhez inicial. [Development of a method of micro-washings to study the uterine microenvironment in cattle: effects on the luteal function, follicular growth and maintenance of early pregnancy]. 2006. 123 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Em bovinos, a mortalidade embrionária associada a falhas no processo de reconhecimento materno da prenhez atinge 30 a 40%. O sucesso da prenhez, depende de uma apropriada interação bioquímica entre o endométrio materno e o concepto. O objetivo dessa tese foi desenvolver uma técnica cirúrgica para monitorar o microambiente uterino de vacas cíclicas e prenhez nos dias 14 a 20 após o estro. Como objetivos específicos foram verificados se a implantação e a presença dos cateteres uterinos afetariam (1) a manutenção da prenhez, (2) a função luteal e (3) o desenvolvimento folicular. Em vacas holandesas, cíclicas e não lactantes, foram implantadas cateteres de silicone em cada corno uterino no segundo dia após o estro (fase preparatória). No dia 15 pós-estro os animais receberam uma injeção de D-clorprostenol e a ovulação foi confirmada por ultrasonografia transretal (US; dia experimental 1). No dia experimental 7, as vacas (n=6) receberam ou não (n=3) transferência de embriões via transcervical no corno uterino ipisilateral ao ovário contendo o corpo lúteo (CL). Nos dias experimentais 14, 16, 18 e 20, estruturas ovarianas foram avaliadas por US, e cada corno uterino foi lavado através dos cateteres implantados no lúmen uterino (três sessões de 6 ml cada). Amostras de sangue foram coletadas nos dias 1 a 20 da fase experimental e concentração de

progesterona (P4) foi mensurada por radioimunoensaio. As vacas foram abatidas no dia experimental 20 e a prenhez diagnosticada por visualização macroscópica do concepto após a dissecação do útero. A taxa de presença do concepto no dia 20 experimental foi 0%. No dia experimental 7, um CL e um folículo grande (9 a 17 mm) estavam presentes nos ovários das vacas. A taxa de aumento da concentração de P4 entre os dias 1 a 5 foi de 0 ng/mL/dia em 7/9 vacas. Luteólise ocorreu antes do dia 15 em 3/9 vacas, entre os dias 16 e 20 foi 3/9, e após o dia 20 em 2/9 vacas. Não houve aumento de P4 na fase luteal em uma vaca. Foi verificada ovulação antes do dia 20 em 3/9 vacas. A taxa de aumento do último folículo dominante foi de 1,3mm/dia em 2/9 vacas e menor nos animais restantes. Cistos foliculares, CL sub-luteinizado e endometrite foram diagnosticados em 2/9, 2/9 e 1/9 vacas, respectivamente. Foi possível concluir que as alterações nas funções ovarianas e uterinas foram causadas pela presença e implantação dos cateteres e essas alterações foram incompatíveis com a manutenção da prenhez. A abordagem cirúrgica testada não foi adequada para estudar o microambiente uterino de vacas prenhez.

Palavras-chave: Microambiente uterino. Cateter. Útero. Progesterona. Bovino.

ABSTRACT

FREIRE, A. F. **Development of a method of micro-washings to study the uterine microenvironment in cattle:** effects on the luteal function, follicular growth and maintenance of early pregnancy. [Desenvolvimento de um método de microlavagem para estudo do microambiente uterino em bovinos: efeitos na função luteínica, crescimento folicular e manutenção da prenhez inicial]. 2006. 123 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

In cattle, embryonic mortality associated with failure in the process of maternal recognition of pregnancy reaches 30 to 40%. Successful pregnancies depend on appropriate biochemical interactions between the maternal endometrium and conceptus. Overall objective was to develop a surgical technique to probe the uterine microenvironment of cyclic and pregnant cows days 14 to 20 post- estrus. Specific objectives were to verify whether presence and operation of uterine catheters would affect (1) maintenance of pregnancy, (2) luteal function and (3) follicular growth. Non-lactating, cyclic, Holstein cows were fitted with a silicone catheter in each uterine horn on day 2 after estrus. On day 15 they received an injection of D-cloprostenol and ovulations were confirmed by transrectal ultrasonography (US; experimental day 1). On experimental day 7, cows received (n=6) or not (n=3) embryos by trans-cervical transfer to the uterine horn ipsilateral to ovary containing the corpus luteum (CL). On experimental days 14, 16, 18 and 20, ovarian structures were observed by US and each uterine horn was washed through the catheter (three sessions of 6 ml each). Blood samples were collected from experimental days 1 to 20 and progesterone (P₄) concentrations were measured by radioimmunoassay. Cows were slaughtered on experimental day 20 and pregnancies were diagnosed by macroscopic visualization

of a conceptus after dissection of uterus. Conception rate at day 20 was 0%. On experimental day 7, both a CL and a large follicle (9 to 17mm) were present in ovaries of all cows. Rate of increase of P_4 concentrations from days 1 to 5 was 0ng/ml/day in 7/9 cows. Luteolysis occurred before day 15 in 3/9 cows, between days 16 and 20 in 3/9 cows and after day 20 on 2/9 cows. No luteal phase rise in P_4 was noticed for one cow. Ovulation before day 20 was verified in 3/9 cows. Rate of growth of the last dominant follicle was 1.3mm/day in 2/9 cows and less in the remaining. Follicular cysts, poorly luteinized CL and endometries were diagnosed in 2/9, 2/9 and 1/9 cows respectively. In summary, alterations in ovarian and uterine functions were caused by presence and operation of uterine catheters and such alterations were incompatible with maintenance of pregnancy. In conclusion, the surgical approach tested was not adequate for studying the uterine microenvironment of pregnant cows.

Keywords: Uterine microenviroment. Catheter. Uterus. Progesterone. Cattle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática dos procedimentos experimentais (ver texto para detalhes). No dia 7 da fase experimental, os animais receberam transferência de embriões (n=6) ou não (n=3).....	49
Figura 2 - Comportamento de cio de animais que participaram do experimento.....	50
Figura 3 - Cateter do tipo balonete utilizado no experimento. Notar (seta) orifícios do cateter	51
Figura 4 - Fotografia do procedimento cirúrgico de implantação do cateter balonete intrauterino. Evidenciar (seta) a extremidade do cateter balonete sendo introduzida no lúmen uterino; (*) corno uterino	51
Figura 5 - Fotografia do procedimento cirúrgico de implantação do cateter balonete intrauterino. Notar (seta) a presilha de fixação na serosa do corno uterino; (*) corno uterino.	53
Figura 6 - Fotografia da porção exteriorizada dos cateteres embebida em solução iodada, acondicionada dentro de um saco plástico e protegida pela bolsa de couro.....	54
Figura 7 - Posicionamento dos embriões em relação ao útero e aos cateteres implantados cirurgicamente.	58
Figura 8 – Imagem ultrassonográfica de um cisto folicular. Observar (seta) a espessura da parede do cisto. Em (---) área anecóica com aproximadamente 3,26cm de diâmetro	63
Figura 9 – Imagem ultrassonográfica de um folículo luteinizado. Observar (seta) a presença de trabéculas no interior do folículo.....	64
Figura 10 – Imagem ultrassonográfica de um corpo lúteo sub-luteinizado. Observar em (----) estruturas com centro anecóico e em (seta) uma borda fina ecogênica circundando a estrutura que se formou após o desaparecimento do maior folículo observado em exame ultrasonografico anterior	66

Figura 11 - Fotografia do útero após o abate. Evidenciar em (EP) exsudato purulento dentro do corno uterino esquerdo (Cesq); ovário esquerdo (Oe); corno uterino direito (Cdir), ovário direito (od).....	67
Figura 12 - Intervalo entre a cirurgia e ovulação que deu início a fase experimental (dias) para cada animal e média ($\pm$ EPM).....	72
Figura 13 - Número de aplicações de PGF2 α ao longo da fase preparatória para cada animal e média ($\pm$ EPM)	72
Figura 14 -. Intervalo entre a última aplicação de PGF2 α na fase preparatória e ovulação na fase experimental (dias) para cada animal e média ($\pm$ EPM).	73
Figura 15 - Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/ml), observação de muco vulvar, ocorrência de luteólise, ovulação e procedimento de transferência de embrião (TE) ao longo da fase experimental para os animais 1, 2 e 3. Para detalhes ver texto	77
Figura 16 - Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/ml), observação de muco vulvar, ocorrência de luteólise, ovulação e procedimento de transferência de embrião (TE) ao longo da fase experimental para os animais 4, 5 e 6. Para detalhes ver texto	78
Figura 17 - Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/ml), observação de muco vulvar, ocorrência de luteólise, ovulação e procedimento de transferência de embrião (TE) ao longo da fase experimental para os animais 7, 8 e 9. Para detalhes ver texto	79
Figura 18 - Taxa de aumento das concentrações plasmáticas de progesterona do dia 1 da fase experimental ao dia 5 da fase experimental e do dia 1 da fase experimental ao dia 7 da fase experimental (ng/ml/dia) para cada animal.....	80
Figura 19 - Média ($\pm$ EPM) dos diâmetros da cavidade do corpo lúteo nos dias seis ou sete e 14 da fase experimental.	81
Figura 20 - Concentração plasmática de progesterona no dia seis ou dia sete da fase experimental (ng/ml) para cada vaca cíclica ou transferida e média ($\pm$ EPM).	83
Figura 21 - Dia da maior concentração plasmática de progesterona na fase experimental (ng/ml) para cada animal e média ($\pm$ EPM).	84

Figura 22 - Maior concentração plasmática de progesterona na fase experimental (ng/ml) para cada animal e média ($\pm$ EPM)	85
Figura 23 - Somatória das concentrações plasmáticas de progesterona na fase experimental (ng/ml) para cada animal e média ($\pm$ EPM).	86
Figura 24 - Frequência de ocorrência de corpo lúteo sub-luteinizado o período entre a cirurgia e a ovulação inicial da fase experimental e durante a fase experimental (número de vacas apresentando corpo lúteo sub-luteinizado/número total de vacas; % e razão).....	88
Figura 25 - Diâmetro do maior folículo no dia seis ou sete da fase experimental (cm) para cada animal e média ($\pm$ EPM).	90
Figura 26 - Diâmetro do folículo Dominante (cm) e ocorrência de ovulação durante os dias 14 e 20 da fase experimental para os animais 1, 2 e 3. Ver texto para detalhes	91
Figura 27 - Diâmetro do folículo Dominante (cm) e ocorrência de ovulação durante os dias 14 e 20 da fase experimental para os animais 4, 5 e 6. Ver texto para detalhes.	92
Figura 28 - Diâmetro do folículo Dominante (cm) e ocorrência de ovulação durante os dias 14 e 20 da fase experimental para os animais 7, 8 e 9. Ver texto para detalhes	93
Figura 29 - Frequência de ocorrência do dia da ovulação de acordo com o dia da fase experimental (número de vacas ovuladas nos dias determinados/número total de vacas; % e razão).	95
Figura 30 - Intervalo entre a ovulação inicial da fase experimental e a ovulação na fase experimental (dias) para os animais que ovularam nesse período e média ($\pm$ EPM)	96
Figura 31 - Frequência de ocorrência de luteólise de acordo com o dia da fase experimental (número de vacas cíclicas ou transferidas apresentando luteólise/número total de vacas cíclicas ou transferidas; % e razão)	97
Figura 32 - Frequência do dia do ciclo estral ao abate (número de vacas abatidas em determinados dias do ciclo estral/número total de vacas; % e razão).....	99

Figura 33 - Intervalo entre a luteólise e ovulação na fase experimental (dias) para os animais que ovularam nesse período e média ($\pm$ EPM).....	100
Figura 34 - Diâmetro folicular final das vacas ovuladas na fase experimental (cm) e média ($\pm$ EPM)	101
Figura 35 - Variáveis relacionadas à frequência de ocorrências de cistos foliculares	103
Figura 36 - Variáveis relacionadas à frequência de ocorrência de folículos luteinizados.	104
Figura 37 - Frequência de ocorrência de endometrite no período entre a cirurgia e a ovulação inicial da fase experimental e durante a fase experimental (número total de vacas apresentando endometrite/número total de vacas; % e razão)	106

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Sumário das variáveis medidas e escores de função luteínica, crescimento folicular e patologias observadas no experimento	107
---	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 CICLO ESTRAL.....	24
2.2 RECONHECIMENTO DA PRENHEZ.....	32
2.3 MORTALIDADE EMBRIONÁRIA	35
3 HIPÓTESE DO TRABALHO	44
4 MATERIAL E MÉTODO	46
4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO	46
4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	48
4.4.1 Fase preparatória	49
4.4.1.1 Procedimentos pré-cirúrgicos	49
4.4.1.2 Procedimentos cirúrgicos.....	50
4.4.1.3 Procedimento pós-cirúrgico	55
4.4.2 Fase experimental.....	56
4.4.2.1 Transferência de embriões	56
4.4.2.2 Microlavagem uterina.....	58
4.4.2.3 Ultrassonografia	59
4.4.2.4 Coleta de sangue e dosagem da progesterona plasmática	60
4.4.2.5 Diagnóstico de gestação.....	61
4.5 VARIÁVEIS ANALISADAS	61
4.5.1 Variáveis contínuas	61
4.5.2 Variáveis discretas.....	62
4.5.2.1 Variáveis associadas à ocorrência de patologias reprodutivas.....	62

4.5.2.4 Variáveis associadas à luteólise	69
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1 INDUÇÃO DO ESTRO.....	71
5.2 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	74
5.4 DINÂMICA FOLICULAR.....	89
5.5 SUMÁRIOS DOS RESULTADOS	106
6 CONCLUSÃO E IMPLICAÇÕES	110
REFERÊNCIAS	112

1 INTRODUÇÃO

Os bovinos domésticos *Bos taurus* e *Bos indicus* pertencem à família Bovidae e foram domesticada com as finalidades de tração, produção de carne e leite. Com o aumento crescente da população humana e conseqüentemente da demanda de produtos de origem animal, objetiva-se a máxima eficiência reprodutiva nos rebanhos bovinos a fim de otimizar também o processo produtivo.

No Brasil, o alto padrão de sanidade e qualidade dos produtos de origem animal tem elevado as exportações do complexo de carne. O país possui hoje o maior rebanho bovino comercial do mundo, constituído por aproximadamente 205 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2005). Neste sentido, a biologia dos processos reprodutivos tem sido estudada e o maior entendimento desses processos tem levado ao aprimoramento de diversas biotecnologias, como a inseminação artificial, transferência de embriões, fecundação *in vitro*, produção de animais transgênicos e clones. O uso dessas biotecnologias tem sido importante na agropecuária nacional por permitir maior controle da reprodução, levando ao ganho genético e melhora dos índices reprodutivos. No entanto, ainda hoje se fazem necessários estudos para o aperfeiçoamento destas tecnologias, uma vez que se observam falhas no processo reprodutivo. Por exemplo, ocorre mortalidade embrionária precoce em aproximadamente 30% das gestações (DISKIN; SREENAN, 1980). Tal mortalidade está associada à falhas no reconhecimento materno da gestação.

O reconhecimento materno da gestação ocorre no período definido como “período crítico” entre os dias 15 e 19 pós-estro. Durante o período crítico, deve ocorrer efetivo bloqueio da luteólise. Este bloqueio é conseqüência da capacidade

do conceito (embrião e membranas associados) enviar sinais antiluteolíticos apropriados e da capacidade do endométrio em responder a tais sinais, bloqueando a produção de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$).

Tal comunicação entre a unidade do conceito e a unidade maternal estabelece um diálogo bioquímico que freqüentemente não é bem sucedido, resultando na ocorrência de luteólise, o que leva à morte embrionária. Para Cristhianson; Stillbirths e Mummies (1992) as causas não infecciosas respondem por mais de 70% das perdas embrionárias, ressaltando assim a importância dos distúrbios associados ao reconhecimento materno.

Estudos para o entendimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos no reconhecimento materno fetal objetivaram a colheita e caracterização de moléculas presentes no fluido uterino de animais prenhes (HANSEN et al., 1999; SHORT et al., 1991). Contudo estes estudos somente permitiram a realização de análises em dias isolados durante a gestação. Assim passou a ser importante uma técnica que permitisse a coleta de moléculas e monitoramento das mudanças de composição do microambiente intrauterino de forma continua durante o período crítico em animais cíclicos e prenhes. Por exemplo, a colheita de material intrauterino poderia ser realizada através de cateteres posicionados cirurgicamente no lúmen uterino de animais experimentais.

Uma vez que tal técnica é invasiva e requer manipulação intensa do trato reprodutivo feminino, foi **objetivo geral** da presente dissertação avaliar os efeitos da implantação de cateteres intrauterinos nas características do ciclo estral e na manutenção da prenhez até o 20º dia de gestação em fêmeas bovinas. Os objetivos específicos foram verificar o crescimento e ovulação de folículos, avaliar a função luteínica assim como a função uterina daquelas fêmeas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão foi escrita abordando inicialmente aspectos referentes ao ciclo estral (dinâmica folicular e função luteínica), assim como alguns pontos fundamentais do reconhecimento materno fetal em ruminantes. A seguir foram apresentados dados com ênfase em mortalidade embrionária precoce e finalizou-se com a discussão de estudos referentes ao microambiente uterino.

2.1 CICLO ESTRAL

Os bovinos são animais poliéstricos não sazonais, nos quais o estro ocorre, em média, em intervalos de 20 dias para novilhas e 21 dias para vacas (MCDONALD, 1989; NOAKES; PARKINSON e ENGLAND, 2001; NOAKES, 1997;) com uma variação normal de 18-22 dias e 18-24 dias respectivamente (NOAKES; PARKINSON e ENGLAND, 2001). O ciclo estral pode ser dividido nas fases de proestro, estro, metaestro e diestro. As fases de proestro e estro são também chamadas de fase folicular, estrogênica ou proliferativa e as fases de metaestro e diestro de fase luteínica, progesterônica ou secretora. O proestro dura cerca de dois dias, e o estro de 14 a 18 horas em vacas taurinas (MCDONALD, 1989) e ao redor de 11 horas em zebuínas (BARROS et al., 1992). O metaestro tem duração de aproximadamente três dias (MCDONALD, 1989).

Com o surgimento da ultrasonografia, demonstrou-se definitivamente a existência de ondas de crescimento folicular no decorrer da vida reprodutiva e das fases do ciclo estral em bovinos (BO et al., 1995; FORTUNE, 1998). Durante o ciclo

estral uma onda de folículos emerge entre os dias 1 e 3 após o estro. São geralmente em torno de 10 a 50 folículos neste grupo com o tamanho de 2 a 3mm. Nos dias subsequentes parte desses folículos cresce para 4 a 6mm, sendo que 2 a 5 folículos maiores do grupo continuarão a crescer enquanto os outros regridem. Neste grupo de folículos pelo menos um continua a crescer e torna-se dominante.

O desenvolvimento do folículo dominante é dividido em três fases: crescimento, estática e de regressão (SILCOX; POWELL e KISER, 1993). Na primeira onda de crescimento folicular a fase de crescimento vai desde a emergência até em torno do oitavo dia após o cio; a fase estática ocorre entre o oitavo e décimo dia e a fase de regressão ocorre após o décimo dia. Em torno do décimo dia do ciclo estral começa a segunda onda de crescimento folicular e o processo se reinicia.

O folículo dominante dessa segunda onda de crescimento folicular regride (se houver três ondas) ou se torna folículo ovulatório se houver apenas duas ondas. O que determina se irão ocorrer duas ou três ondas de crescimento folicular parece ser a taxa de crescimento folicular e a duração da fase luteínica em ciclos estrais normais. Se a regressão do corpo lúteo (CL) ocorre enquanto o folículo dominante da segunda onda for funcional (fase de crescimento ou estática), ele será ovulatório (ciclo estral com duas ondas). Porém, se o folículo já tiver iniciado a fase de regressão no momento da luteólise, haverá o crescimento da terceira onda folicular e ovulação do folículo dominante (KASTELIC; KNOPF e GINTHER, 1990).

O mecanismo que regula a dinâmica de crescimento folicular está baseado em respostas diferenciais ao hormônio luteinizante (LH) e ao hormônio folículo estimulante (FSH; GINTHER et al., 1996). Os aumentos periódicos de concentração de FSH circulantes são responsáveis pelas emergências das ondas foliculares,

portanto, vacas com duas ondas tem dois aumentos e as vacas com três ondas tem três aumentos de FSH (BO et al., 1995).

O aumento de FSH permite o crescimento folicular suficiente para que alguns dos folículos adquiram a capacidade de responder ao LH em cada onda, ao mesmo tempo em que os perfis de crescimento do folículo dominante e dos subordinados começam a diferenciar-se, o FSH declina rapidamente a partir do segundo dia da emergência da onda (GUINThER et al., 1996).

Nos folículos ovarianos em crescimento e nos folículos aptos à ovulação o estradiol é o principal hormônio esteróide produzido e secretado. A síntese do estradiol resulta de um trabalho coordenado entre as células da teca e da granulosa. O modelo de esteroidogênese mais aceitável foi proposto por Fortune e Quirk (1988). Nesse modelo a ligação do LH a receptores existentes nas células da teca estimula a atividade da enzima P450 17 α -hidroxilase, que atua na conversão da pregnenolona em androstenediona, sendo as células da granulosa incapazes de realizar tal conversão. A androstenediona é metabolizada em estradiol pela enzima P450 aromatase, enzima presente exclusivamente nas células da granulosa. Assim, as células da teca produzem a androstenediona que é aromatizada pelas células da granulosa, transformando-se em estradiol.

A presença de um folículo pré-ovulatório no ovário determina altas concentrações plasmáticas de estradiol, condição fundamental para a ocorrência de um pico pré-ovulatório de LH e da ovulação. A ovulação caracteriza-se pela ruptura da membrana folicular e a expulsão do oócito. Após a ocorrência de tal evento fisiológico, a parede do folículo ovulado é colapsada e a cavidade invadida por linfa e sangue provenientes dos capilares presentes em grande quantidade no folículo ovulatório. Esse conjunto de componentes inicialmente promove a formação de uma

estrutura denominada de corpo hemorrágico. O corpo hemorrágico reorganiza-se para formar o CL sob influência de vários fatores angiogênicos e mitogênicos como o fator de crescimento dos fibroblastos (GOSPODAROWICZ; CHENG e LUI 1985) fator de crescimento I semelhante à insulina (SUH; HUNT e SPENCER, 1992) fator de crescimento semelhante a heparina (GRAZUL-BILSKA; REDMER e KILLILEA, 1992) e fator de crescimento endotelial vascular (REDMER; REYNOLDS, 1996), entre outros. As organelas, substratos e enzimas contidas nas células luteínicas irão determinar sua capacidade em sintetizar progesterona (P_4). Na maioria das espécies o crescimento do CL é extremamente rápido. Em vacas, por exemplo, o peso do CL 3 dias após a ovulação é de aproximadamente 640mg e com 14 dias é de 5,1g (FIELDS e FIELDS, 1996). No desenvolvimento do CL, a rápida proliferação celular resulta de sucessivas mitoses que ocorrem com a velocidade semelhante à de um tecido tumoral (JABLONKA-SHARIFT; GRASUL-BILSKA e REMENDER, 1993).

A principal função do corpo lúteo é a secreção de P_4 que é um dos fatores que regula a duração do ciclo estral. Durante a fase folicular, as concentrações de P_4 não superam 1 ng/ml (NEELY et al., 1979). Após a ovulação a P_4 se eleva de uma maneira continua, atingindo um pico por volta do dia 10º do ciclo estral, permanecendo elevada até o 15º e 16º dias do ciclo. Então, por volta do 17º dia do ciclo, caso não ocorra à gestação, as concentrações de P_4 declinam rapidamente.

Um estado de quiescência é induzido no miométrio pela P_4 , o que resulta no decréscimo na captação de cálcio extracelular requerido para a contração das células miométriais (BATRA e LAMMING, 1994) bem como previne a síntese de receptores α Adrenérgicos estimuladas pelo estradiol, que quando ativados causam contrações no miométrio (BOTTARRI; VOAKER; KAIVEZ; 1983).

Na ausência da prenhez, o CL passa por regressão morfológica e funcional (MILVAE et al., 2000). Este processo, denominado luteólise, é caracterizado pela cessação da produção de P_4 e perda dos componentes celulares, incluindo redução do suprimento vascular, proliferação do tecido conjuntivo, aumento da desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteais (MIYAMOTO, 1996; PATE, 1994).

Estudos têm confirmado a $PGF2\alpha$ produzida no tecido endometrial como a principal luteolisina em vacas, ovelhas, porcas, éguas, coelhas, e ratas (HORTON; POYSER, 1976; THATCHER et al., 1985;). Em vacas o processo de luteólise inicia-se entre os dias 16 e 19 do ciclo estral com a secreção de pulsos de $PGF2\alpha$ pelo endométrio. Ocorrem de cinco a oito pulsos de $PGF2\alpha$ liberados pelo endométrio durante um período de 2 a 3 dias (FREDRICKSON; KINDAHL; EDQVIST, 1984; KINDAHL et al., 1976).

Segundo o modelo descrito por McCracken; Schramm e Okulicz (1984) em ovelhas a ocitocina é considerada a geradora central de pulsos $PGF2\alpha$. Nesse modelo o pulso de ocitocina liberado pela hipófise no final da fase luteínica geraria um estímulo para a liberação de $PGF2\alpha$ pelo endométrio. A $PGF2\alpha$ agiria no CL liberando ocitocina luteal, que novamente promoveria maior liberação de $PGF2\alpha$ pelo endométrio, resultando em um mecanismo de retro-alimentação positiva entre a ocitocina e a $PGF2\alpha$.

De fato, Mapletoft e Ginther (1975) realizaram histerectomia unilateral em ovelhas e observaram que o CL presente no ovário ipsolateral ao corno uterino não removido regrediu e o mesmo não ocorreu com o CL presente no ovário contralateral ao corno uterino retirado. Sugere-se a partir de estudos baseados na histerectomia parcial e anastomose vascular que em muitas espécies a $PGF2\alpha$ exerce um efeito

local entre cada corno uterino e o ovário ipsolateral. Nestes casos a $\text{PGF2}\alpha$ sintetizada pelas células endometriais é transportada ao ovário por uma via de transferência por mecanismos de contra-corrente da veia uterina para a artéria ovariana (GINTHER, 1974). Foi postulado que a $\text{PGF2}\alpha$ produzida no corno uterino entra na artéria ovariana pela veia útero-ovariana e chega ao CL ipsolateral ao corno que a produziu. Esse percurso destinado ao transporte da $\text{PGF2}\alpha$, sem a passagem pela circulação periférica, impede que $\text{PGF2}\alpha$ seja imediatamente metabolizada pelos pulmões (PIPER; VANE e WILLE, 1970).

Em fêmeas bovinas, foi reportada recentemente a existência de uma proteína transportadora de $\text{PGF2}\alpha$ (PGT) que atua mediando o transporte deste hormônio pelas vias vasculares do endométrio para o ovário. O ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para a PGT foi expresso no endométrio, miométrio e plexo útero-ovárico durante o ciclo estral. No endométrio o grau de expressão do RNAm para a PGT foi baixo dos dias 1 a 9, moderado dos dias 10 a 15 e 19 a 21, e máximo entre os dias 16 e 18 do ciclo estral.

Caso haja a fertilização do ovócito, o processo luteolítico que normalmente ocorreria a partir do dia 16 deverá ser bloqueado. Para tanto, é necessário que o conceito produza substâncias que deverão atuar sobre o endométrio inibindo a produção da $\text{PGF2}\alpha$ e conseqüentemente a luteólise (THATCHER et al., 1984).

Uma vez que o útero é o principal órgão produtor de prostaglandina $\text{f2}\alpha$ ($\text{PGF2}\alpha$) em bovinos, é possível que sua manipulação possa estimular a produção desse eicosanoide e levar a um encurtamento da fase luteínica. Assim em alguns estudos com manipulações uterinas, observou-se o ciclo estral dos animais para verificar uma possível influência da manipulação uterina e conseqüente liberação de $\text{PGF2}\alpha$.

Martin (2005) com objetivo de estudar o controle ovariano sobre a função uterina realizou biópsias endometriais em vacas nelore por via transcervical em dias diferentes do ciclo estral (dia zero, dia cinco, dia nove, dia treze, e dia dezenove) por meio de uma pinça Yomann, sempre no corno uterino contralateral ao corpo lúteo. A pinça era introduzida pela vulva até alcançar a cérvix, que era manipulada por via transretal, a fim de permitir a introdução da mesma no útero. Esta era desviada para o corno contraletaral ao corpo lúteo e colocada junto ao endométrio. O útero era então pressionado contra a mesma, por via transretal, para facilitar a obtenção de um fragmento entre 4 e 5 mm de diâmetro. Os animais tiveram o ciclo estral observado e concluiu-se que não houve interferência da biópsia uterina na duração do ciclo estral.

Meyer et al. (1995) por meio de laparotomia médio ventral em vacas, expôs os cornos uterinos e inseriu cateter intrauterinos do tipo Tygon no dia nove ou dez do ciclo estral. Os cateteres ficaram aproximadamente 45mm dentro do lúmen de cada corno uterino, fixados na serosa uterina por fio de polivinil e foram exteriorizados pela parede do flanco esquerdo, ficando estocados no exterior do animal por sacos plásticos embebidos em gases com solução iodada. Entre os dias 14 e 24 do ciclo estral foram administrados via cateter intrauterino infusões de albumina sérica bovina em um grupo, no outro grupo infusões de interferon tau recombinante bovino e em outra infusão de interferon tau recombinante ovino. Amostras de sangue do dia 14 ao 35 do ciclo estral, foram colhidas e as concentrações plasmáticas de P_4 foram analisadas. Os tratamentos com ambos os interferons foram efetivos na extensão da duração do CL. Apenas um animal apresentou luteólise no dia 18 do ciclo estral, dois animais desenvolveram piometra. A conclusão do trabalho foi que ambos os interferons foram efetivos para estenderem a vida útil do CL, (em comparação ao

grupo que recebeu injeções intrauterinas de Albumina Sérica Bovina). Além disso, a presença do cateter intrauterino não alterou a duração da fase luteínica nos animais do grupo controle, nem afetou os processos de manifestação de cio e ovulação.

Hurtgem e Ganjan (1979) por meio de biopsia uterina em éguas no 4º dia do diestro observaram uma redução na duração do ciclo estral, com diminuição das concentrações plasmáticas de P_4 e retorno ao estro precoce em relação ao grupo controle.

Hurtgem e Whitmore (1978) estudando biopsia uterina em éguas no 4º dia do diestro observaram uma diminuição da concentração plasmática de P_4 24 a 48 hr após a manipulação do endométrio e uma diminuição da duração do ciclo estral em relação ao grupo controle.

Neely et al. (1975) infundiram 500mL solução salina intra uterina nos dias 12, 13, 14 do diestro em éguas, através de uma sonda de lavagem intra uterina e observaram a duração da do ciclo estral, a conclusão do trabalho é que não houve diminuição da duração do ciclo estral em relação ao grupo controle, já Neely et al. (1975) por infusão intra-uterina de solução salina nos dias 4 ou 5 e 6 ou 7 do diestro em éguas, observaram uma diminuição da concentração plasmática de P_4 e luteolise precoce nessas éguas em relação ao grupo controle.

Handler et al. (2003) estudaram os padrões de ocitocina, metabolito da $PGF_{2\alpha}$ e concentrações de P_4 no plasma sanguíneo de éguas submetidas apenas a uma inserção de cateter na cérvix e a uma dilatação do balloon do cateter na cérvix nos dias 5 e 7 do diestro. A concentração plasmática de P_4 foi significativamente menor nos dias 10, 12 e 14 do diestro do grupo que sofreu dilatação da cérvix em relação ao grupo controle e grupo da inserção do cateter. Um rápido e pronunciado aumento nas concentrações de ocitocina no plasma foi observado no grupo da dilatação e

inserção do cateter em relação ao grupo controle. Não houve consideráveis mudanças nos padrões do metabólico da $\text{PGF2}\alpha$ no plasma comparando-se a dilatação da cérvix e inserção do cateter com o grupo controle. Concluiu-se que há influência da ocitocina na duração da fase luteal, já que houve uma diminuição na duração desta fase do ciclo estral no grupo que sofreu dilatação e inserção do cateter.

2.2 RECONHECIMENTO DA PRENHEZ

O reconhecimento da prenhez pelo conceito envolve uma comunicação bioquímica entre este e a mãe capaz de bloquear a produção de $\text{PGF2}\alpha$ e assim manter a síntese e liberação de P_4 pelo CL (SHOLL; ORSINI e HITCHINS, 1983).

Pesquisas realizadas ainda na década de sessenta, apontaram para a ocorrência da inibição da luteólise a partir da liberação de substâncias blastocísticas antes do momento da implantação embrionária (MOOR; ROWSON, 1996). Posteriormente, por ter sido isolada das células trofoblásticas, essa substância foi denominada de trofoblastina ou proteína trofoblástica (MARTAL; LACROIX; LOUDES, 1979). Após sua purificação realizada na espécie ovina e por apresentar grande semelhança estrutural com algumas classes de interferons, passou a ser chamada de interferon τ ($\text{INF}\tau$) (IMAKAWA et al., 1987).

O $\text{INF}\tau$ é a principal molécula sinalizadora da presença do conceito no útero materno e é secretado pelas células mononucleares do trofotoderma, no estágio precoce de desenvolvimento embrionário (THATCHER et al., 2001).

Binelli e Thatcher (1999), afirmaram que, durante o período crítico, as células epiteliais do endométrio seguem uma programação pré-estabelecida para liberar pulsos luteolíticos da $\text{PGF2}\alpha$ a menos que o conceito envie sinais anti-luteolíticos apropriados para bloquear a produção da $\text{PGF2}\alpha$. Entretanto há algumas indicações científicas de que a programação para o bloqueio da luteólise parece ser acionada antes do período crítico. De acordo com Banu et al. (2003) o embrião bovino já produz moléculas sinalizadoras da sua presença no útero desde o 10º dia do seu desenvolvimento.

Segundo Mann; Robison e Whates (1999) e Wathes et al. (1998) o mecanismo de ação do $\text{INF}\tau$ para o bloqueio da luteólise envolve a supressão na expressão dos receptores endometriais para a ocitocina e o $\text{INF}\tau$ compete pelos sítios de ligação desses mesmos receptores, culminando com a inibição da síntese de $\text{PGF2}\alpha$.

O papel essencial da P_4 secretada pelo corpo lúteo no controle do meio uterino e na nutrição do embrião foram enfatizados por Santos et al. (2004), o que permitiu relacionar elevadas concentrações de P_4 com taxas de concepção maiores (BARUSELLI et al., 2001; MARQUES et al., 2003; SANTOS et al., 2000).

Outro fator importante no reconhecimento materno fetal é que a P_4 suprime a resposta imune materna em resposta aos antígenos fetais e gera condições especiais para o desenvolvimento do conceito (SITERI; STITES, 1982). Além disso, a P_4 induz a diferenciação do estroma endometrial, estimula a secreção glandular em associação com o acúmulo de vacúolos basais no epitélio glandular e promove a liberação de proteínas pelas células endometriais que irão auxiliar o início do desenvolvimento embrionário (MASLAR; POWERS-CRADDock e ANSBACHER, 1986).

Mann e Lamming (1995) avaliando a resposta luteolítica de vacas ovariectomizadas tratadas com duas dosagens diferentes de P_4 , observaram que os animais com baixa concentração plasmática de P_4 desenvolveram sinal luteolítico mais forte, expresso pela maior concentração do principal metabólito da $PGF2\alpha$ (PGFM). Desta forma puderam concluir que vacas com menor concentração plasmática de P_4 têm maior predisposição à perda embrionária. Confirmando esses dados Mann e Lamming (1995) verificaram que vacas portadoras de embriões com desenvolvimento comprometido possuíam concentração de $INF\tau$ nos lavados uterinos inferiores àquelas de fêmeas cujos embriões eram bem desenvolvidos. Embriões sub-desenvolvidos, não alongados suficientemente, foram menos capazes de bloquear a luteólise e apresentaram menores chances de sobrevivência embrionária.

Stubbings e Walton (1986) verificaram que a concentração sérica de P_4 no dia da transferência de embrião (D7) estava positivamente correlacionada com a taxa de prenhez das receptoras. Resultados análogos haviam sido descritos por Niemann; Sacher e Elsaeser (1995) Remsen e Roussel (1982) e, os quais indicaram que a concentração ótima de P_4 no dia da inovulação do embrião deve estar entre 2,0 e 5,0 ng/ml.

Em conclusão, a despeito dos vários fatores que podem reduzir o reconhecimento materno fetal, o adequado preparo do útero pela P_4 é de suma importância para a sobrevivência embrionária. Neste contexto, ressalta-se a importância dos fatores que atuam no reconhecimento materno fetal, pois falhas nos mesmo levam a mortalidade embrionária precoce.

2.3 MORTALIDADE EMBRIONÁRIA

A perda de prenhez pode ser dividida cronologicamente em morte embrionária precoce ou tardia e morte fetal. A mortalidade precoce é considerada até o período de manutenção do corpo lúteo, entre os dias 15 e 19 pós-estro e a tardia se estende até a fase de diferenciação, aos 42 dias de prenhez (SANTOS et al., 2004).

A mortalidade embrionária associada à falha na manutenção da gestação constitui um importante fator que contribui para dilatar os intervalos entre partos (HANK, 1979). Reportaram-se em alguns estudos que, em fêmeas bovinas, a mortalidade embrionária é a maior responsável pelas baixas taxas de concepção. Thatcher et al. (1994) realizaram estudos com rebanhos leiteiros de alta produção e estimaram que 35% dos embriões fertilizados não sobreviveram até o 18º dia de prenhez.

As taxas de sobrevivência do conceito diminuem gradualmente de 93% no dia 8 pós-inseminação, para 56%, 66% e 58% nos dias 12, 16 e 42, respectivamente (DISKIN; SREENAN, 1980).

Diskin e Sreenan (1980) trabalhando com novilhas genitalmente normais, relataram que as falhas de fertilização são responsáveis por 10% dos casos de fracasso reprodutivo, ao passo que as mortes embrionárias, correspondem a 30% dos referidos casos.

Para Binelli e Thatcher (1999) a maioria das perdas reprodutivas ocorreu na fase embrionária de gestação. Dunne; Diskin e Sreenan (2000) verificaram que a maioria das perdas pré-natais em novilhas de corte ocorreu antes do 14º dia da

gestação. Kunz et al. (2002) encontraram taxas de mortalidade entre 20% e 40% até os dias 21 e 22 de prenhez em vacas de corte.

A mortalidade embrionária pode resultar de causas infecciosas e não infecciosas. Em relação às causas infecciosas os agentes infecciosos específicos que mais comumente causam problemas de mortalidade embrionária em bovinos são o *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis* (Campilobacteriose Genital Bovino), o *Trichomonas fetus* (Tricomoníase) além do vírus vulvovaginite infecciosa pustular (BHV-1) e o Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) (BINELLI et al., 2001). Além desses, há os agentes infecciosos inespecíficos encontrados principalmente nos casos de endometrites (inflamação do endométrio).

O útero normal é um ambiente estéril, ao contrário da vagina que abriga microrganismos. Às vezes, patógenos oportunistas da flora vaginal normal ou do ambiente podem invadi-lo. Tais oportunidades ocorrem, sobretudo, mas não exclusivamente, durante o parto, inseminação artificial e transferência de embriões podendo levar á endometrite crônica ou sub aguda, afetando negativamente a fertilidade (LEBLANC et al., 2002).

A mortalidade embrionária de origem não infecciosa, para Christianson (1992), reputa em 70%. O estresse térmico foi responsabilizado por mortalidade embrionária de até 42,7% (SILKE et al., 2002). A influência do estado nutricional da vaca para López-Gatius et al. (2002) e Silke et al. (2002) representaram a causa de perdas significativas de prenhez quando houve diminuição do escore de condição corporal.

O aumento de uréia proveniente de dietas com alto teor protéico pode reduzir a fertilidade, ao interferir nos efeitos indutores normais da P₄ no microambiente uterino, criando assim condições abaixo do ideal para manter o desenvolvimento do embrião (BUTLER, 2001).

Assim, conhecendo-se os reflexos econômicos da mortalidade embrionária na agropecuária mundial, é de suma importância que se realizem estudos objetivando a diminuição dessas perdas. Especificamente, uma vez que o desenvolvimento inicial do conceito ocorre no microambiente uterino, e que a manutenção da gestação depende de que tal desenvolvimento ocorra de forma correta, torna-se importante a elucidação do microambiente uterino neste período de interesse.

2.4 MICROAMBIENTE UTERINO

O ambiente uterino é dinâmico e apresenta diferenças nas fases do ciclo estral, devido à regulação da secreção endometrial pelos esteróides ovarianos (BUTLER, 2000).

Na vaca, nos três a quatro últimos dias do diestro, ocorre regressão da mucosa uterina, com redução na altura do epitélio luminal e as glândulas uterinas tornam-se curtas com epitélio baixo e sem secreção. No proestro, sob a influência de estrógeno, o endométrio é restaurado (início da fase proliferativa) (GRUNERT; GREGORY, 1989) a mucosa torna-se espessa, congesta e edematosa com a predominância de células secretoras de muco. Entretanto, a proliferação glandular limita-se a um crescimento linear das glândulas, sem ramificação ou enovelamento. Durante o estro, o edema e a hiperemia endometriais são marcantes (PRIEDKALNS; LEISER, 1998). A mucosa uterina revela hipertrofia e hiperplasia de grau considerável, dando a esta fase a característica de proliferação endometrial (GRUNERT; GREGORY, 1989).

O bom desenvolvimento do embrião no início da prenhez depende do ambiente uterino. No início da prenhez a sinalização local dos blastocistos modifica ainda mais o ambiente uterino e induz a secreção de proteínas específicas pelo epitélio uterino (MCRAE, 1984).

Estudos mais aprofundados em relação às interações materno-fetais no início da gestação, são de suma importância, uma vez que moléculas de origem endometrial ou do concepto são liberadas no microambiente uterino e interagem com ambos os tecidos.

O pH e a concentração iônica da secreção uterina durante a fase luteal podem ser influenciados, por exemplo, pela ingestão de dietas contendo elevados teores de proteína, provocando redução da fertilidade de vacas leiteiras no pós-parto (BUTLER, 2001). Os efeitos diretos do pH uterino na sobrevivência embrionária nas espécies domésticas ainda não são totalmente conhecidos.

Elrod; Van Amburg e Butler (1993) verificaram que o pH uterino é inversamente relacionado aos teores de N-uréia plasmática (NUP) e que ocorre redução específica do pH durante a fase luteal, sugerindo que o comprometimento da fertilidade resulte de alterações dos efeitos da P_4 , no microambiente uterino, gerando condições subótimas para o desenvolvimento embrionário.

Segundo Paisley; Mickelsen e Anderson (1986) o pH uterino é baixo durante a fase progesterônica, o epitélio uterino é menos permeável, impedindo estimulação do sistema leucocitário.

O útero gestante, por sua alta concentração de P_4 associada à inibição leucocitária por substâncias imunodepressivas é mais susceptível a contrair infecções em relação ao útero não gestante que tem uma grande resistência às infecções inespecíficas (KENNEDY; MILLER, 1993).

Os estrógenos, também esteróides, são hormônios responsáveis pela fase proliferativa do útero. Estes hormônios têm sido associado a elevação da resposta de defesa do útero e demais órgãos adjacentes por promover aumento da circulação na musculatura uterina e espessura das fibras musculares, causando aumento na motilidade uterina, capacidade de resposta a ocitocina e favorecendo a migração leucocitária (VIVEIROS, 1997).

A $\text{PGF2}\alpha$ está associada a regulação do aporte sanguíneo para o útero e placenta, podendo ter um efeito estimulatório sobre a fagocitose promovida pelos leucócitos uterinos, além disso estimula contrações miométriais (PAISLEY; MICKELSEN e ANDERSON, 1986).

Binelli e Thatcher (1999), sugeriram que o local e as proximidades de onde se encontra o conceito podem interferir com o tipo de proteína presente, tornando-se premente a análise sistemática deste microambiente uterino especialmente durante o “período crítico”, para caracterizar as moléculas envolvidas e a dinâmica de liberação das mesmas.

Algumas técnicas já foram empregadas com o intuito de monitorar o microambiente uterino. A técnica de microdiálise foi inicialmente desenvolvida por Ungerstedt (1971) e amplamente utilizada para estudos no sistema nervoso central (HUCKE et al., 2001; HUCKE et al., 1998; KENDRICK et al., 1988). A microdiálise foi utilizada para estudos das secreções de estruturas ovarianas de vacas (SHAW, 1995) e uterinas de mulheres (LICHT et al., 2001).

Bazer et al. (1975) por meio da técnica de laparotomia médio ventral para exposição do trato reprodutivo de ovelhas, realizou uma ligadura na junção corpo-corno uterino ipsolateral ao corpo lúteo no quinto dia após as ovelhas receberem monta, com objetivo de obter secreções uterinas de ovelhas prenhes. A ligadura foi

feita por fita umbilical para oclusão do corno uterino. Alguns cuidados foram realizados, a fim de não obstruir vasos sanguíneos maiores que passam pela região. O comportamento do ciclo estral dos animais foi observado toda manhã até o 140º dias de gestação, quando as ovelhas foram ovariectomizadas e a parede do útero não gravídico foi puncionada com uma agulha 40x16mm para a recuperação de fluido uterino. O corno uterino gravídico juntamente com o conjunto membranas placentárias, fluidos fetais e o feto foram recuperados e em seguida analisados. De dez ovelhas que participaram do estudo, sete estavam prenhes no 140º dia da gestação.

Alavi-Shoushtari; Asri-Rezai e Abshenas¹ (2006) em seus estudos fizeram uma investigação da variação das proteínas contidas no útero bovino em diferentes estágios do ciclo estral. Foram abatidas 115 vacas. Tratos genitais foram coletados simultaneamente com sangue da veia jugular. Ligaduras foram realizadas imediatamente antes da cervix e na região útero-oviduto após o abate. Para a determinação do ciclo estral foram examinadas estruturas presentes no ovário e tonicidade do útero. A coleta dos fluidos uterinos (2ml por vaca) foi realizada por meio de uma cureta. Os fluidos foram analisados posteriormente. Úteros com sinais de inflamação, congestão e hemorragias foram descartados.

Kayser et al. (2006) estudaram as mudanças no perfil protéico uterino em marrãs abatidas no dia 10 e 13 do ciclo estral e da prenhez. No abate foi feita uma ligadura na cérvix para não extravasar o conteúdo uterino e posteriormente lavagem uterina com 20mL de Minimal Essential Medium em cada corno uterino para posterior análise de proteínas pela técnica de eletroforese bidimensional.

Knickerbocker et al. (1986) analisaram a extensão da viabilidade do corpo lúteo em vacas holandesas por meio de infusão uterina de proteínas secretadas pelo

¹ALAVI-SHOUSHTARI, S. M.; ASRI-REZAI, S.; ABSHENAS, J. A study of the uterine protein variations during the estrus cycle in the cow: A comparison with the serum proteins. **Animal Reproduction Science**, In Press, Corrected Proof, Available online 18 January, 2006.

concepto nos dias 16 e 18 da prenhez. Para tal experimento foram realizadas cirurgias no dia 10 do ciclo estral, utilizando a técnica de laparotomia médio ventral, o útero e o ovário foram exteriorizados e a localização do CL foi verificada. Um cateter de polietileno estéril foi inserido via incisão no istmo do oviduto e fixado a 30 -50cm dentro da porção anterior do lúmen uterino ipsolateral ao CL. O cateter foi exteriorizado via uma pequena punção no flanco do animal e acondicionado em um tubo plástico embebido com solução degermante. As infusões intrauterinas iniciaram três dias após a cirurgia e foram repetidas até o dia 21 do ciclo estral. Em apenas um animal de um total de nove foi detectada regressão precoce do corpo lúteo, os demais animais tiveram um prolongamento da função luteínica e ao abate observou-se que os cateteres se mantiveram intactos.

Uma técnica cirúrgica de canulação de oviduto foi descrita por Killian et al. (2004), para obtenção local de fluidos presentes no oviduto de vacas. O procedimento consistiu de uma avaliação do trato reprodutor feminino através de palpação retal para assegurar que o oviduto estava na posição *in situ* e de fácil manipulação após a incisão cirúrgica. Foi realizada a técnica de laparotomia com uma incisão na região da tuberosidade do coxal paralelo a musculatura do membro pélvico para facilitar a exteriorização do órgão. A junção útero-oviduto e a porção final do infundíbulo foram ligadas por uma fita adesiva de silicone. Um cateter de polietileno foi inserido no lúmen do oviduto para coleta de fluídos, as amostras foram coletadas durante a fase luteínica e durante a fase não luteínica para uma posterior comparação.

Short et al. (1991), por análise de fluído uterino e Hansen et al. (1999) por análise de tecido celular uterino e do concepto após o abate, visaram a caracterização de moléculas envolvidas no reconhecimento materno fetal bovino.

Técnicas que permitem a monitoração do microambiente uterino durante a fase inicial da gestação, de maneira a interferir o mínimo possível neste ambiente, permitirão a caracterização dos eventos relacionados às atividades das unidades materno fetal para um melhor entendimento desse diálogo bioquímico.

HIPÓTESE DO TRABALHO

3 HIPÓTESE DO TRABALHO

A hipótese científica é que não ocorrem alterações no crescimento e ovulação de folículos, nas funções luteínica e uterina ou no desenvolvimento de gestações de vacas que receberam cateter intrauterino.

4. MATERIAL E MÉTODO

O material e método compreendeu o local onde foram realizados os experimentos; animais utilizados, fármacos e reagentes; e procedimentos experimentais (fase preparatória e fase experimental).

4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM) do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na cidade de Pirassununga – SP.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizadas vacas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*), de idade variável, não prenhes e não lactantes. Os animais foram mantidos em piquetes de capim Braquiária (*Brachiaria decumbens* cv *Stapf*) com água e sal mineral *ad libitum* e suplementados com cana de açúcar e concentrado segundo exigências estabelecidas pelo NRC (2001).

Os animais foram submetidos a um exame geral quanto à sanidade reprodutiva

e avaliados ultrasonograficamente (aparelho ALOKA modelo SSD -500 equipado com transdutor linear de 7,5 MHz) para detecção de possíveis anormalidades anatômicas ou patologias que pudessem acometer os órgãos e estruturas reprodutivas. Nove animais considerados saudáveis reprodutivamente foram utilizados nos experimentos.

4.3 REAGENTES E FÁRMACOS

Os reagentes e fármacos utilizados durante o experimento estão citados abaixo:

- Cloridato de lidocaína 2%®. Frasco com 100mL, Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacêutico, São Paulo-SP.
- Septipen Plus® (Benzilpenicilina benzantina 3000.000 UI, Benzilpenicilina potássica-1500.000 UI, Benzilpenicilina procaína 1500.000 UI, Sulfato de estreptomicina - 2,5g, Diclofenaco Sódico-225mg). Frasco com 20mL, Vallee, Montes Claros-MG.
- Topcef® (Ceftiofur Sódico 4g), Frasco com 100mL, Eurofarma Laboratório Ltda, Campo Belo – SP.
- Equipalazone® (200mg de Fenilbutazona), Frasco com 100mL, Marcolab, Duque de Caxias-RJ.
- PGF2 α (Cloprostenol Sódico® 265mc/mL), Frasco com 2mL. Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacêutico, São Paulo - SP.

- Ringer simples JP®, Frasco com 500mL, JP Indústria Farmacêutica S.A, Ribeirão Preto-SP.
- Biocid® (2,6% de iodo), Frasco com 1000mL, Laboratório Pfizer Ltda, Guarulhos São Paulo –SP.

4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram submetidos a uma série de procedimentos com o objetivo de coletar o fluido uterino durante os dias 14 a 20 pós-estro, por meio do uso de cateteres cirurgicamente implantados no útero de vacas. Estes procedimentos estão ilustrados esquematicamente na figura 1 e foram descritos detalhadamente a seguir. O experimento dividiu-se em duas fases: fase preparatória e fase experimental.

Na fase preparatória foram realizados procedimentos pré-cirúrgicos, cirúrgicos e pós-cirúrgicos.

Na fase experimental foram realizados os seguintes procedimentos: transferência de embriões, microlavagem uterina, ultrassonografia, coleta de sangue e dosagem de P₄ plasmática, diagnóstico de gestação.

Figura 1 - Representação esquemática dos procedimentos experimentais (ver texto para detalhes). No dia 7 da fase experimental, os animais receberam transferência de embriões (n=6) ou não (n=3)

4.4.1 Fase preparatória

4.4.1.1 Procedimentos pré-cirúrgicos

O estro das vacas foi induzido pela administração de 2ml de PGF2α IM. Após a aplicação as vacas foram marcadas na base da cauda com uma tinta especial (Paintstick®; LA-Co Industries, EUA) para auxiliar na observação de cios. Estipulou-se para essa marcação escores de 0 a 5, relacionados à intensidade e frequência com a qual a vaca havia recebido montas. O escore zero representou ausência de tinta na cauda e estava relacionado com comportamento de cio. O escore cinco representou a cauda repleta de tinta, o que mostra que a vaca não foi montada e portanto não demonstrou comportamento de cio.

A manifestação de comportamento de cio foi observada duas vezes ao dia (manhã e à tarde) por uma hora figura 2. O dia da manifestação de cio foi considerado como dia zero da fase preparatória. Neste mesmo dia foram administrados dois frascos de Septipen Plus® IM, com intuito de estabelecer durante o procedimento cirúrgico uma concentração plasmática adequada de antibióticos, minimizando os riscos de infecções durante a cirurgia.

Figura 2 - Comportamento de cio de animais que participaram do experimento

4.4.1.2 Procedimentos Cirúrgicos

O procedimento cirúrgico para a implantação de cateteres intrauterinos teve como objetivo desenvolver uma técnica viável de obtenção de fluidos uterinos em vacas cíclicas e vacas prenhes.

No dia 2 da fase preparatória, foi implantado um cateter do tipo balonete (HpBio® - Hp Bio próteses Ltda) em cada um dos cornos uterinos (Figura 3).

Figura 3 - Cateter do tipo balonete utilizado no experimento. Notar (seta) orifícios do cateter

Os cateteres foram exteriorizados da cavidade através da pele, no flanco direito da vaca. Desta forma, a extremidade contendo o balonete foi posicionada na luz uterina (Figura 4) enquanto a outra extremidade ao ser exteriorizada, foi fixada no flanco da vaca.

Figura 4 - Fotografia do procedimento cirúrgico de implantação do cateter balonete intrauterino. Evidenciar (seta) a extremidade do cateter balonete sendo introduzida no lúmen uterino; (*) corno uterino

As cirurgias foram realizadas na região da tuberosidade do coxal. Primeiramente foi realizada tricotomia ampla do local, seguida de anti-sepsia com água e sabão de coco. A seguir foi realizada anestesia local infiltrativa, utilizando-se dois pontos cruentos na linha de incisão através dos quais foi introduzida e retirada sucessivamente uma agulha acoplada a uma pistola de medicamentos a fim de atingirem-se planos profundos, infundindo-se 50mL de Cloridrato de lidocaína 2%®. A seguir procedeu-se assepsia do local de incisão com solução iodada seguida de álcool iodado. A incisão foi realizada em posição transversal, no sentido dorso-ventral, 5cm abaixo da tuberosidade do coxal, com aproximadamente 15cm de comprimento, incisando pele e divulsionando a musculatura adjacente (músculo oblíquo abdominal externo, músculo oblíquo abdominal interno e músculo transverso do abdome) até atingir-se o peritônio. Este, ao ser visualizado, foi incisado permitindo assim a introdução da mão para a localização dos cornos uterinos. Uma vez localizados os cornos uterinos, o corno uterino esquerdo foi exteriorizado para introdução do cateter tipo balonete no seu terço final com o auxílio de um atravessador metálico (HPbio®).

Com a ponta do atravessador perfurou-se o corno uterino em sua face anti-mesometrial próximo à junção útero-oviduto, projetando o atravessador para a luz do útero. Com o atravessador na luz uterina, realizou-se outra perfuração a uma distância de 4cm da perfuração inicial em direção ao terço médio. A extremidade do atravessador foi conectada à extremidade do cateter de maneira que quando o atravessador foi exteriorizado, tracionou-se o cateter até que a extremidade contendo o balonete atravessou o primeiro orifício de modo a posicioná-lo no interior do corno uterino. Os cateteres de silicone (grau médico) tinham as seguintes medidas: comprimento: 150cm; diâmetro externo: 2,5mm; diâmetro interno: 1,2mm e

sua extremidade balonete media: 35mm de comprimento; 8,2mm de diâmetro externo; 7,2mm de diâmetro interno e possuía 88 furos de 0,7mm cada. Os cateteres foram fixados à serosa do útero por meio de uma presilha de fixação (Figura 5).

Figura 5 - Fotografia do procedimento cirúrgico de implantação do cateter balonete intrauterino. Notar (seta) a presilha de fixação na serosa do corno uterino; (*) corno uterino.

O mesmo procedimento foi realizado no corno uterino direito e em seguida ambos os cornos uterinos foram lavados com uma solução de Ringer simples a temperatura ambiente, recolocando-se o corno uterino na cavidade abdominal na devida posição *in situ*.

Fixados os cateteres uterinos e após anestesia local, realizou-se perfuração crânio-lateral ao local de incisão (região do flanco) para a exteriorização dos cateteres dos cornos direito e esquerdo, devidamente identificados.

Finalmente, os tecidos foram suturados em 4 planos: (1) sutura do peritônio (fio categute 2-0; BRASUTURE®; São Paulo-SP), (2) sutura do músculo transverso e oblíquo interno; (3) sutura do músculo oblíquo externo; (4) sutura da pele (fio de nylon agulhado 0,70 mm; PARAMED® (São Sebastião da Grama, SP).

Logo após a sutura do local de incisão, foi fixada uma bolsa de couro com abertura com velcro na região do flanco, no local por onde foram exteriorizados os cateteres, com o objetivo de protegê-los, assim como a fístula formada. Para tanto, foram utilizados 7 pontos de fixação (fio de nylon agulhado 0,70mm; PARAMED®); 3 pontos em cada lateral e 1 ponto na parte superior, uma vez que a bolsa de couro ficou com a abertura para cima (Figura 6).

Figura 6 - Fotografia da porção exteriorizada dos cateteres embebida em solução iodada, acondicionada dentro de um saco plástico e protegida pela bolsa de couro.

Os cateteres foram higienizados com gaze embebida em solução iodada. Às extremidades dos cateteres foram acopladas a agulhas hipodérmicas 40x12mm com a ponta desbastada e à base da agulha adaptou-se uma ponta de seringa de 1ml, que funcionou como um tampa, para evitar o contato do líquido do interior do cateter com o meio ambiente. Finalmente, os cateteres foram enrolados, recobertos por gaze embebida em solução iodada, acondicionados dentro de um saco plástico e em seguida o conjunto foi colocado dentro da bolsa de couro.

4.4.1.3 Procedimento Pós-cirúrgico

Uma vez ao dia administraram-se 15mL de Equipalazone® por 5 dias pós-cirurgia. A cada 48 horas administrou-se Septipen Plus®, sendo este procedimento repetido por três aplicações. O objetivo de tais tratamentos foi de amainar o processo inflamatório pós-cirúrgico e evitar infecções decorrentes de possíveis contaminações ocorridas no procedimento cirúrgico.

Imediatamente após a cirurgia procedeu-se microlavagem de cada um dos cornos uterinos via cateter, infundindo-se 10mL de solução Ringer simples® com o auxílio de uma seringa acoplada ao cateter, recuperando-se tanto quanto possível. Esse procedimento foi repetido até que o lavado obtido estivesse com aspecto límpido.

Ao final da microlavagem infundiram-se 10mL de solução Ringer simples suplementada com (20% de v/v; denominada solução Ringer-Topcef) em cada corno uterino. Este procedimento foi repetido diariamente até o 5º dia pós-cirurgia. No 6º dia realizou-se lavagem para remoção do infundido no dia anterior e infundiram-se 2mL da solução anterior para preencher o cateter com solução antibiótica. Posteriormente, a cada três dias, infundiram-se 0,2mL de Ringer-Topcef em cada um dos cateteres, com o objetivo apenas de mantê-los desobstruídos. Este procedimento foi repetido até a primeira ovulação pós-cirúrgica.

No 15º dia da fase preparatória, todos os animais receberam 2mL de PGF2 α para a indução de estro. Exames ultra-sonográficos foram realizados diariamente a partir do 14º dia da fase preparatória para observação das estruturas ovarianas, até que a ovulação fosse detectada. Especificamente, os diâmetros dos maiores

folículos foram registrados. Estabeleceu-se como ovulação o desaparecimento de um folículo que apresentou crescimento nos exames anteriores. O dia da ovulação foi denominado dia 1 da fase experimental e o dia anterior foi denominado dia 0 da fase experimental e considerado como o dia do cio. Os animais nos quais foram diagnosticadas patologias reprodutivas no ovário e útero nesse período foram submetidos aos tratamentos necessários conforme a patologia. Especificamente, cistos foliculares foram tratados com Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG), implante de P₄ mais Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), e alguns casos com aspiração do cisto. Folículos luteinizados foram tratados com PGF2 α e o CL sub-luteinizado com PGF2 α . Resolvidas as patologias os animais receberam aplicação de 2mL de PGF2 α para induzir o estro e promover a ovulação para induzir o estro e promover a ovulação para o início da fase experimental.

4.4.2 Fase experimental

4.4.2.1 Transferência de Embriões

Uma vez detectada a ovulação, os animais foram avaliados ultrasonograficamente no dia 6 da fase experimental, com objetivo de observar a presença do CL e avaliar sua característica palpável e estrutural. Também foi avaliada a presença ou não de líquido na luz uterina.

No dia 7 da fase experimental, os animais foram divididos e receberam (n=6) ou não (n=3) embriões. Para a técnica de transferência de embriões, foram utilizados embriões congelados em etilenoglicol conforme a técnica descrita por Visintin;

Arruda e Madureira (1999). Esses embriões foram gentilmente cedidos pelo laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Os embriões foram descongelados no laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo por 20 segundos a temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) e, em seguida, por 20 segundos em banho-maria a 37°C . Logo após cada embrião foi reavaliado quanto ao estágio do desenvolvimento e qualidade morfológica conforme os critérios propostos WRATHALL (1995). Posteriormente, os embriões foram submetidos a quatro passagens em meio de manutenção (*holding*), visando a higienização e re-hidratação. Foram utilizados 18 embriões (12 de grau I/II e 6 de grau III), sendo que, para cada transferência, pelo menos dois embriões grau I/II foram envasados em uma mesma palheta de 0,25mL. Os animais foram anestesiados via epidural com Cloridrato de lidocaína a 2%®, a região do períneo foi higienizada com sabão neutro e Biocid®, sendo os embriões inovulados transcervicalmente, com o auxílio de um inovulador (modelo Hannover), revestido por uma luva plástica descartável, rompida no fundo do canal vaginal, para proteger contra possível contaminação no trajeto do vestíbulo e da vagina (Squires et al., 2000). Os embriões foram inovulados na porção cranial do corno uterino ipsolateral ao ovário com corpo lúteo como na figura 7.

Figura 7 - Posicionamento dos embriões em relação ao útero e aos cateteres implantados cirurgicamente.

4.4.2.2 Microlavagem uterina

Nos dias 14, 16, 18 e 20 da fase experimental foram realizadas microlavagens uterinas com solução Ringer simples (em ambos os cornos uterinos). Para proceder a manipulação dos cateteres utilizou-se luva de procedimento. Antes de cada infusão, a saída dos cateteres foi higienizada com solução de álcool iodado.

Inicialmente, o conteúdo de ambos os cateteres foi desprezado (2mL iniciais) e em seguida infundiram-se 6mL de solução ringer simples (num fluxo aproximado de 1mL/minuto. Terminada a infusão, o conteúdo foi recuperado por aspiração, utilizando uma seringa de 20mL estéril. O líquido recuperado foi armazenado em tubo cônico de polipropileno estéril, de 15mL, e em seguida acondicionado em gelo

até o término do procedimento. Essa operação foi realizada mais duas vezes até completar um volume total de 18mL infundidos. De rotina, a microlavagem iniciou-se pelo cateter alojado no corno uterino contra-lateral ao ovário contendo o CL. Terminado o procedimento de microlavagem foram infundidos 2mL de Ringer-Topcef para preencher os cateteres que em seguida foram envolvidos em gazes embebidas em solução de álcool iodado, acondicionados em saco plástico e colocados na bolsa de couro.

As amostras de microlavados de cada corno uterino foram centrifugadas a temperatura de 4°C, a 3000 X g durante 15 minutos. Em seguida, removeram-se os sobrenadantes e preparou-se um pool de microlavados de cada corno uterino, que foi armazenado em tubos tipo eppendorf e estocados a -20 °C. Variáveis associadas à colheita e composição dos microlavados não foram analisadas na presente dissertação.

4.4.2.3 Ultrassonografia

Exames ultra-sonográficos foram realizados no dia 6 ou 7 e nos dias correspondentes às microlavagens uterinas (14, 16, 18 e 20 da fase experimental), com intuito de avaliar o crescimento folicular. As imagens de cada ovário a cada exame de cada animal foram congeladas na tela, para avaliação da presença e aspecto do CL e mensuração dos diâmetros das cavidades dos corpos lúteos e dos folículos maiores que 4 mm (ROCHA, 2000). Em seguida esses dados foram registrados em um mapa ovariano.

4.4.2.4 Coleta de sangue e dosagem de progesterona plasmática

Foram coletadas amostras de sangue desde o dia 0 até o dia 20 da fase experimental. As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia caudal mediana. O sangue foi coletado com agulha 40x12 mm em tubos de vidro 16x100 contendo 350 µl de uma solução de citrato de sódio a 30% em salina, homogeneizado e acondicionado em gelo. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 4°C. A centrifugação foi realizada a 3000 X g por 30 minutos para a separação do plasma que, em seguida, foi armazenado em tubos plásticos e estocado em freezer (-20 °C) para posterior quantificação das concentrações de P₄.

As amostras foram quantificadas segundo Badingal et al. (1992) no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM) situado nas dependências do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal da Universidade de São Paulo, Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, na cidade de Pirassununga – SP.

As amostras foram analisadas em 3 ensaios. Os coeficientes de variação intra-ensaio para a referência com baixa concentração (1,25ng/ml) foram de 5,48%, 8,53% e 0,84%, para as de média concentração (6,46ng/ml) foram de 0,19%, 7,39% e 5,85% e para as de alta concentração (9,68ng/ml) foram de 2,15%, 5,63% e 0,68%. Os coeficientes de variação inter-ensaio para as referencias de baixa, média e alta concentração foram de 1,35%, 4,63% e 2,31% respectivamente. A sensibilidade dos ensaios foi 0,42, 0,8 e 0,8ng/ml respectivamente.

4.4.2.5 Diagnóstico de gestação

Nas vacas em que foram transferidos os embriões o diagnóstico de gestação foi realizado no dia 20 da fase experimental após o abate dos animais. Os dois cornos uterinos foram abertos, com auxílio de uma tesoura para visualização macroscópica do conceito.

4.5 VARIÁVEIS ANALISADAS

A partir dos dados obtidos pelas avaliações ultra-sonografias e dosagens hormonais constituiriam-se dois grupos distintos de variáveis para análise: variáveis contínuas, compreendidas por avaliações diárias, constituindo um conjunto de medidas repetidas, durante o experimento, variáveis discretas, formadas por avaliações pontuais durante o ciclo estral, representada por uma mensuração por animal.

4.5.1 Variáveis contínuas

- Concentração plasmática de P_4 (ng/ml) diária durante a fase experimental;

- Diâmetro do maior folículo dominante (cm) nos dias 14, 16, 18 e 20 da fase experimental.
- Diâmetro da cavidade do corpo lúteo (cm) nos dias 14, 16 18 e 20 da fase experimental.

4.5.2 Variáveis discretas

4.5.2.1 Variáveis associadas à ocorrência de patologias reprodutivas

Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no período decorrente entre a cirurgia e ovulação inicial da fase experimental dividido pelo número total de vacas. Definiram-se como cistos foliculares estruturas com pelo menos 2,0cm de diâmetro no ovário, constituído por uma fina parede, envolvendo a camada externa de células foliculares conforme exemplificado na figura 8.

Figura 8 – Imagem ultrassonográfica de um cisto folicular. Observar (seta) a espessura da parede do cisto. Em (---) área anecóica com aproximadamente 3,26cm de diâmetro

- Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no ovário direito no período decorrente entre a cirurgia e ovulação inicial da fase experimental dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no ovário esquerdo no período decorrente entre a cirurgia e ovulação inicial da fase experimental dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no dia 15 da fase preparatória dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no ovário direito no dia 15 da fase preparatória dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no ovário esquerdo no dia 15 da fase preparatória dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram cistos foliculares na fase experimental dividido pelo número total de vacas.

- Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no ovário direito na fase experimental dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no ovário esquerdo na fase experimental dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no período decorrente entre a cirurgia e a ovulação inicial da fase experimental dividido pelo número total de vacas. Definiram-se como folículos luteinizados estruturas isoladas em um único ovário, constituídas por parede mais espessa em relação ao cisto folicular, com a presença de trabéculas no centro da estrutura conforme exemplificado na figura 9.

Figura 9 – Imagem ultrassonográfica de um folículo luteinizado. Observar (seta) a presença de trabéculas no interior do folículo.

- Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no ovário direito no período entre a cirurgia e ovulação da fase experimental dividido pelo número total de vacas.

- Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no ovário esquerdo no período entre a cirurgia e ovulação inicial da fase experimental dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no dia 15 da fase preparatória dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no ovário esquerdo no dia 15 da fase preparatória dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no ovário direito no dia 15 da fase na fase preparatória dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados na fase experimental dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no ovário direito na fase experimental dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no ovário esquerdo na fase experimental dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram corpo lúteo sub-luteinizado no período entre a cirurgia e a ovulação da fase experimental dividido pelo número total de vacas. Definiram-se como corpos lúteos sub-luteinizados estruturas com centro anecóico grande e apenas uma borda bem fina ecogênica circundando a estrutura, que se formaram após o desaparecimento do maior folículo observado em exame ultrasonográfico anterior conforme exemplificado na figura 10.

Figura 10 – Imagem ultrassonográfica de um corpo lúteo sub-luteinizado. Observar em (---) estruturas com centro anecóico e em (seta) uma borda fina ecogênica circundando a estrutura que se formou após o desaparecimento do maior folículo observado em exame ultrasonográfico anterior

- Número de vacas que apresentaram corpo lúteo sub-luteinizado na fase experimental dividido pelo número total de vacas.
- Número de vacas que apresentaram endometrite no período decorrente entre a cirurgia e a ovulação inicial da fase experimental dividido pelo número total de vacas. Definiu-se como endometrite a presença de conteúdo uterino purulento observado por imagem hiperecogênica da ultrasonografia ou observação desse conteúdo após o abate.
- Número de vacas que apresentaram endometrite na fase experimental dividido pelo número total de vacas.

Figura 11 - Fotografia do útero após o abate. Evidenciar em (EP) exsudato purulento dentro do corno uterino esquerdo (Cesq); ovário esquerdo (Oe); corno uterino direito (Cdir), ovário direito (od).

4.5.2.2 Variáveis associadas ao crescimento folicular

- Número de dias entre a cirurgia e a ovulação inicial da fase experimental. Definiu-se como ovulação o desaparecimento do folículo de maior diâmetro observado no dia anterior pelo exame ultrasonográfico.
- Diâmetro do folículo no sexto ou sétimo dia da fase experimental.
- Diâmetro final dos folículos que ovularam durante a fase experimental.
- Número de vacas que ovularam durante a fase experimental.
- Dia da observação de muco pela vulva durante a fase experimental.

4.5.2.3 Variáveis associadas ao corpo lúteo

- Número de vacas que apresentaram corpo lúteo no sexto ou sétimo dia da fase experimental.
- Concentração de progesterona (ng/ml) no sexto ou sétimo dia da fase experimental.
- Número de vacas que apresentaram corpo lúteo cavitário no sexto ou sétimo dia da fase experimental.
- Diâmetro da cavidade do corpo lúteo no sexto ou sétimo dia da fase experimental.
- Diâmetro da cavidade do corpo lúteo no décimo quarto dia da fase experimental.
- Dia da maior concentração de progesterona (ng/ml) na fase experimental.
- Maior concentração de progesterona (ng/ml) durante a fase experimental.
- Taxa de aumento da concentração plasmática de progesterona (ng/ml/dia) do 1º ao 5º dia da fase experimental, determinada pela concentração plasmática de progesterona do dia 5 da fase experimental, subtraída da concentração do dia 1, dividido por 5.
- Taxa de aumento da concentração plasmática progesterona (ng/ml/dia) do primeiro ao sétimo dia da fase experimental, determinada pela concentração plasmática de progesterona do dia 7 da fase experimental, subtraída da concentração do dia 1, dividido por 7.
- Somatória da concentração plasmática de progesterona (ng/ml) do dia 1 ao dia 20 da fase experimental.

4.5.2.4 Variáveis associadas á luteólise

- Dia da Luteólise na fase experimental, definido como o dia em que a concentração plasmática de progesterona decresceu até menos que 1 ng/ml e permaneceu baixa.
- Intervalo de tempo entre a aplicação de PGF2 α na fase preparatória ate a ovulação inicial da fase experimental.
- Número de aplicações de PGF2 α até a primeira ovulação da fase experimental.
- Número de dias entre a luteólise na fase experimental e a ovulação no decorrer da fase experimental.
- Intervalo entre a ovulação inicial da fase experimental e a ovulação que ocorreu no decorrer da fase experimental.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os exames ultrasonográficos e dosagens hormonais realizados possibilitaram o acompanhamento da dinâmica de crescimento folicular e função luteínica no período preparatório e na fase experimental conforme a metodologia descrita por Rocha (2000). A obtenção de medidas precisas de estruturas ovarianas e suas relações com a endocrinologia possibilitaram a demonstração do desenvolvimento de folículos e ovulação durante as fases preparatória e experimental.

5.1 INDUÇÃO DO ESTRO

O intervalo entre a cirurgia e ovulação da fase experimental está representada na figura 12. Observou-se uma variação de 16 a 72 dias e uma média de 36 dias. Essa alta variação deve-se à influência da técnica de implantação de cateteres sobre alguns animais que desenvolveram patologias no ovário ou útero na fase preparatória e somente entraram na fase experimental após o tratamento dessas patologias. Frequências de ocorrência de patologias serão discutidas adiante.

O número de aplicações de PGF2 α para cada animal está exposto na figura 13. As aplicações variaram de 1 a 4 com média de 2,2 aplicações por animal. A variação no número de aplicações de PGF2 α é condizente ao desenvolvimento de patologias nos ovários ou útero. Após os tratamentos específicos os animais receberam injeção de PGF2 α e só entraram para a fase experimental após apresentarem ovulação. Os

animais que receberam apenas uma aplicação (3, 6, 9) foram aqueles que não desenvolveram patologias na fase preparatória.

Figura 12 - Intervalo entre a cirurgia e ovulação que deu início a fase experimental (dias) para cada animal e média ($\pm$ EPM)

Figura 13 - Número de aplicações de PGF2 α ao longo da fase preparatória para cada animal e média ($\pm$ EPM)

O intervalo entre a última aplicação de $\text{PGF2}\alpha$ e a ovulação que deu início a fase experimental estão representados para cada vaca na figura 14. Constatou-se que tal intervalo variou de 2 a 5 dias, sendo a média 4 dias. Para Spell et al. (2001) ocorre variação nos intervalos entre a administração de agentes luteolíticos e a ovulação, devido ao dia da fase de diestro em que o animal se encontra e ao tamanho do folículo presente no ovário no momento da administração. Corpos lúteos em fases medianas e tardias do ciclo respondem melhor à sincronização que animais em fase luteal inicial (TANABE; HANN, 1984 E ETHERINGTON; KILMER e BURKE, 1986).

Figura 14 -. Intervalo entre a última aplicação de $\text{PGF2}\alpha$ na fase preparatória e ovulação na fase experimental (dias) para cada animal e média ($\pm\text{EPM}$).

Embora neste estudo tenha ocorrido administração de PGF2 α em diferentes dias do diestro, não foi observada variação alta no intervalo entre a administração e ovulação. Sugere-se então não ter ocorrido influência da técnica de implantação de cateteres sobre os mecanismos de regressão luteínica, crescimento folicular e ovulação após a indução da ovulação nesse período, já que todos os animais ovularam após a última aplicação de PGF2 α .

5.2 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Dos seis animais que receberam transferência de embriões, nenhuma apresentou conceito ao abate. Esperava-se que dois a três animais fossem diagnosticadas prênes ao final do experimento, o que representaria uma taxa de concepção de 30 a 50%. Essas taxas estão de acordo com as verificadas por (NIEMANN et al., 1985). Com os presentes dados não foi confirmada a hipótese que haveria desenvolvimento de gestações em animais submetidos às técnicas de implantação de cateter e microlavagem descritas previamente. Possíveis causas para tal fato são discutidas abaixo.

5.3 DINÂMICA LUTEÍNICA

O desenvolvimento do corpo lúteo por medidas ultrasonográficas e mudanças nas concentrações plasmáticas de P_4 foram avaliadas. Sabe-se que a P_4 é importante no controle dos eventos fisiológicos e endócrinos que preparam a fêmea para levar a termo a gestação (GRAHAM E CLARKE, 1997).

As concentrações plasmáticas de P_4 em função do dia da fase experimental estão representadas de forma individual para cada animal nas figuras 15, 16, 17. Constataram-se quatro perfis diferentes de mudanças nas concentrações plasmáticas de P_4 ao longo da fase experimental. Os animais 3, 4 e 6 apresentaram luteólise normal. Houve elevação das concentrações de P_4 após a ovulação e a luteólise ocorreu ao final da fase experimental. Tal padrão está de acordo com o esperado para ciclos estrais normais. Os animais 7, 8 e 9 apresentaram luteólise precoce. Houve elevação das concentrações de P_4 após a ovulação, mas a luteólise ocorreu precocemente. Nos animais 1 e 5 não detectou-se luteólise. Houve elevação das concentrações de P_4 no decorrer do ciclo, porém a luteólise não ocorreu até o dia 20 da fase experimental. Finalmente, o animal 2 foi considerado sub-progesteronêmico. Observou-se que a concentração de P_4 não elevou-se após a ovulação, ficando abaixo de 1ng/ml ao longo de toda a fase experimental (com exceção do dia 7).

A variação observada no perfil de liberação de P_4 provavelmente influenciou negativamente a manutenção de prenhez do presente estudo. Nos animais com luteólise normal não houve reconhecimento materno fetal, uma vez que ocorreu a luteólise. Nos animais com luteólise precoce, embora apenas uma delas tenha

recebido transferência de embrião, o resultado negativo de prenhez está associado a problemas com ciclos curtos. Nos animais sem luteólise o crescimento do conceito foi comprometido e esse estava ausente, mesmo em concentrações altas P_4 . Sugere-se que a microlavagem uterina possa ter removido moléculas que participam do reconhecimento materno fetal como, por exemplo, o interferon- τ . No animal com sub-progesteronemia não houve P_4 suficiente para a manutenção da gestação.

Figura 15 - Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/ml), observação de muco vulvar, ocorrência de luteólise, ovulação e procedimento de transferência de embrião (TE) ao longo da fase experimental para os animais 1, 2 e 3. Para detalhes ver texto

Figura 16 - Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/ml), observação de muco vulvar, ocorrência de luteólise, ovulação e procedimento de transferência de embrião (TE) ao longo da fase experimental para os animais 4, 5 e 6. Para detalhes ver texto

Figura 17 - Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/ml), observação de muco vulvar, ocorrência de luteólise, ovulação e procedimento de transferência de embrião (TE) ao longo da fase experimental para os animais 7, 8 e 9. Para detalhes ver texto

Concentrações plasmáticas de P_4 estiveram abaixo do limite detecção do ensaio até o dia 5 da fase experimental para 6 das 9 vacas e até o dia 7 da fase experimental em 4 das 9 vacas. Tal fato ocorreu apesar da verificação da ovulação por ultrasonografia e confirmação da presença de um corpo lúteo no dia 6 ou 7 da fase experimental em todos os animais. Além disso, a taxa de aumento de P_4 do dia 1 ao dia 5 e do dia 1 ao dia 7 da fase experimental foram baixas, conforme disposto na figura 18.

Figura 18 - Taxa de aumento das concentrações plasmáticas de progesterona do dia 1 da fase experimental ao dia 5 da fase experimental e do dia 1 da fase experimental ao dia 7 da fase experimental (ng/ml/dia) para cada animal.

Quatro dos nove animais apresentaram corpo lúteo cavitário. Sendo que o diâmetro das cavidades diminuiu entre os dias 6 ou 7 e 14 da fase experimental conforme representado na figura 19. Dos quatro animais que apresentaram corpo lúteo cavitário dois tiveram luteólise precoce (animais 8 e 9), um animal não demonstrou elevação das concentrações plasmáticas de P_4 (animal 2) e em apenas um animal observou-se padrão de P_4 encontrado na literatura para vacas holandesas (animal 4).

Figura 19 - Média ($\pm$ EPM) dos diâmetros da cavidade do corpo lúteo nos dias seis ou sete e 14 da fase experimental.

Wathes et al. (2003) mensurou as concentrações de P_4 no leite no dia 5 após ovulação e verificou sua associação as taxas de prenhez. Aqueles autores notaram que concentrações de P_4 abaixo de 1ng/ml refletiram em taxas de prenhez abaixo de 10%, concentrações acima de 3ng/ml refletiram em 50 e 55% na taxa de prenhez. Corroborando com esses achados Mann; Mann e lamming (1996) concluíram que a demora na elevação das concentrações de P_4 circulante, somada a baixas concentrações de P_4 durante a fase luteínica estavam relacionados com a presença de embriões mal desenvolvidos e com baixa capacidade de produção de interferon-tau no dia 16 após cobertura. A disfunção luteal inicial pode acarretar em uma assincronia hormonal entre o ambiente uterino e os fatores necessários para o desenvolvimento do conceito, como sugerido por (THATCHER et al., 1994).

Os valores das concentrações de P_4 no dia 6 ou 7 da fase experimental estão representados graficamente na figura 20. A média dos animais que receberam transferência de embrião foi de 0,72 ng/ml. Já a média dos animais cíclicos foi de 1,71 ng/ml. Niemann; Sacher e Elsaeser (1995) indicaram a concentração ótima de P_4 no dia 6 e 7 do ciclo estral entre 2,0 e 5,0 ng/ml, valores superiores aos encontrados no presente estudo.

Figura 20 - Concentração plasmática de progesterona no dia seis ou dia sete da fase experimental (ng/ml) para cada vaca cíclica ou transferida e média ($\pm$ EPM).

Em resumo, as baixas concentrações de P_4 nos dias 6 ou 7 da fase experimental, associadas à baixa taxa de aumento das concentrações de progesterona inicial podem explicar os resultados negativos de prenhez deste estudo.

O dia da maior concentração plasmática de P_4 está graficamente representado para cada animal na figura 21. Os valores máximos variaram do dia 5 ao dia 20 da fase experimental. A média foi de 13,7 dias. Tal média é próxima aos valores reportados por Adeyemo e Heath (1980), Rosa et al. (1988) e Vaca et al. (1983), os quais observaram valores máximos no dia 15 do ciclo estral de fêmeas da raça Holandesa. Sugere-se que embora a produção inicial de P_4 tenha sido baixa, ocorre uma recuperação na elevação das concentrações plasmáticas de P_4 .

Figura 21 - Dia da maior concentração plasmática de progesterona na fase experimental (ng/ml) para cada animal e média ($\pm$ EPM).

A maior concentração plasmática de P_4 na fase experimental está expressa graficamente na figura 22. Notou-se uma variação de 1,6 ng/ml a 8,79 ng/ml. A média foi de 4,7 ng/ml, inferior à relatada por Sartori et al. (2004) que observaram $5,8 \pm 0,6$ e $7,3 \pm 0,4$ ng/ml respectivamente para novilhas e vacas da raça Holandêsa com apenas um CL. A concentração máxima de P_4 também foi superior em vacas da raça nelore, chegando a $6,37 \pm 0,61$ ng/ml, conforme detectado por Bergamaschi (2005).

Figura 22 - Maior concentração plasmática de progesterona na fase experimental (ng/ml) para cada animal e média ($\pm$ EPM)

A somatória das concentrações de P_4 na fase experimental está disposta na figura 23. Observou-se uma média de 34,36 ng/ml por animal e uma variação de 16,88 ng/ml a 80,2 ng/ml. Tal média foi inferior à reportada por Bergamaschi (2005) para vacas da raça nelore que atingiu $58,30 \pm 8,52$ ng/ml. Assim, tanto a maior concentração quanto a somatória das concentrações de P_4 ao longo da fase experimental foram baixas.

Figura 23 - Somatória das concentrações plasmáticas de progesterona na fase experimental (ng/ml) para cada animal e média ($\pm$ EPM).

Mann e Lamming (1995) classificaram animais em dois grupos segundo a concentração plasmática de P_4 na fase lútea do ciclo estral. No primeiro grupo, com baixa concentração plasmática de P_4 observou-se maior concentração plasmática de PGFM (metabólito da $PGF2\alpha$). No segundo grupo, com alta concentração plasmática de P_4 , a concentração de PGFM esteve relativamente reduzida. Esses relatos suportam a teoria de que concentrações elevadas de P_4 favoreceriam o estabelecimento do embrião por reduzir as concentrações de $PGF2\alpha$, resultando na sobrevivência do CL. Baruselli et al. (2001) e Marques et al. (2002) observaram que a concentração plasmática de P_4 parece estar diretamente correlacionada à taxa de concepção.

Baseando-se nos relatos sobre a relação entre baixas taxas de aumento das concentrações de P_4 iniciais e baixas taxas de prenhez, sugere-se que os resultados

negativos de prenhez do presente estudo possam estar relacionados às baixas concentrações plasmática de P_4 observadas. Contudo, houve relatos de animais entre os dias 7 a 14 do ciclo com concentrações de P_4 inferiores a 1,0 ng/mL e que mantiveram gestação (ALVAREZ et al., 1991; HORTA; COSTA e ROBALO SILVA, 1986). Spell et al. (2001) também encontraram animais gestantes com concentrações de P_4 de 0,6 ng/mL.

Para LAMMING; DARWASH e BACK, 1989) e Wielbold (1988) uma significativa proporção de infertilidade em bovinos está atribuída ao funcionamento inadequado do CL. O inadequado funcionamento do CL, também chamado deficiência de fase lútea ou disfunção lútea é caracterizado por ciclo estral de duração normal e baixa concentração periférica de P_4 (DIZEREGA; HODGEN, 1981; LAMMING et al., 1981). Uma deficiência na secreção desse esteróide por parte do CL poderia contribuir para perdas embrionárias (STAPLES E HANSEL, 1961; THATCHER et al., 1994). Henricks; Lamond e Hill (1971) demonstraram que vacas inseminadas que não mantiveram a gestação tiveram menores concentrações plasmáticas de P_4 entre os dias 10 e 16 do ciclo estral do que vacas gestantes durante o mesmo período.

Quatro dos nove animais apresentaram corpo lúteo sub-luteínizado, sendo dois na fase preparatória e dois na fase experimental conforme a figura 24. Dos dois animais que tiveram corpo lúteo sub-luteinizado na fase experimental, um deles também desenvolveu o corpo lúteo sub-luteinizado na fase preparatória (animal 2). Na fase experimental os dois animais que desenvolveram corpo lúteo anormal demonstraram perfis diferentes de P_4 , um animal não teve elevação das concentrações plasmáticas de P_4 ao longo da fase, ficando abaixo de 1ng/ml (animal 2) e o outro animal teve ciclo curto com luteólise no dia 11 da fase experimental (animal 8).

Figura 24 - Frequência de ocorrência de corpo lúteo sub-luteinizado o período entre a cirurgia e a ovulação inicial da fase experimental e durante a fase experimental (número de vacas apresentando corpo lúteo sub-luteinizado/número total de vacas; % e razão)

Sugere-se que uma baixa capacidade de produção de P_4 esteja associada a essas estruturas.

Okuda et al. (1988) em seus estudos sobre o corpo lúteo cavitário dos bovinos, encontraram cavidades centrais em 42,1% dos corpos lúteos em desenvolvimento; 33,7% dos totalmente desenvolvidos; 11,1% dos que estavam em regressão e 5,1% dos animais prenhes. Aqueles autores ainda relataram que a presença da cavidade não pode ser descrita como uma condição patológica. Concordando com tais informações, Kastelic; Knopf e Ginther (1990) também concluíram que a presença de cavidades luteais maiores que 10 mm não afetaram a taxa de prenhez e que a

cavidade central será preenchida gradualmente por tecido luteal e tecido conectivo. Apesar do preenchimento da cavidade dos corpos lúteos ao longo do experimento serem condizentes com a literatura, na presente dissertação notou-se uma relação entre corpos lúteos cavitários com baixas concentrações plasmáticas de P_4 e ocorrência de luteólise precoce.

Ainda, outras causas podem ter levado a não manutenção da prenhez no presente experimento. De acordo com Greve (1992) e Greve; Avery e Callesen (1993) as taxas de prenhez variam de 70-80% para embriões transferidos a fresco e 40-50% para embriões criopreservados. Vale ressaltar que nesta presente dissertação foram utilizados embriões congelados e com graus variáveis de qualidade, o que também poderia ter refletido nos resultados. Alguns autores demonstram melhores índices de prenhez ao transferirem embriões de grau I. Lindner e Wright (1983), Shea (1981) embora Looney; Lindsey e Gonseth et al. (1994) e Markette; Seidel e Elsdén (1985), discordaram desses resultados ao relatarem índices semelhantes de prenhez para embriões de graus I e II.

5.4 DINÂMICA FOLICULAR

O diâmetro dos folículos dominantes da 1ª onda de crescimento folicular no dia 6 ou 7 da fase experimental foram mensurados para avaliação do diâmetro folicular. Valores para cada vaca e a média $1,32 \pm 0,41$ cm estão representados graficamente na figura 25.

Figura 25 - Diâmetro do maior folículo no dia seis ou sete da fase experimental (cm) para cada animal e média ($\pm$ EPM).

Ginther et al. (1996) verificaram no dia cinco do ciclo estral de vacas um folículo dominante (≥ 8 mm). Sartori et al. (2004) observaram o tamanho máximo do folículo dominante durante a primeira onda, o qual variou de $15,2 \pm 0,3$ a $15,9 \pm 0,6$ mm para novilhas e vacas holandesas respectivamente. Sugere-se não ter ocorrido influência da implantação de cateter no lúmen intrauterino sobre o diâmetro de folículos da primeira onda folicular.

O crescimento do folículo dominante nos dias 14, 16, 18 e 20 da fase experimental está representado para cada animal nas figuras 26, 27 e 28. Analisaram-se os padrões de crescimento folicular para animais que apresentaram luteólise antes do dia 16 ou não apresentaram elevação nas concentrações de P_4 (animais 7, 8, 9 e 2 respectivamente) e para os animais que apresentaram concentrações elevadas de P_4 até ao menos o dia 16 da fase experimental (animais 1, 3, 4, 5 e 6 respectivamente).

Figura 26 - Diâmetro do folículo Dominante (cm) e ocorrência de ovulação durante os dias 14 e 20 da fase experimental para os animais 1, 2 e 3. Ver texto para detalhes

Figura 27 - Diâmetro do folículo Dominante (cm) e ocorrência de ovulação durante os dias 14 e 20 da fase experimental para os animais 4, 5 e 6. Ver texto para detalhes.

Figura 28 - Diâmetro do folículo Dominante (cm) e ocorrência de ovulação durante os dias 14 e 20 da fase experimental para os animais 7, 8 e 9. Ver texto para detalhes

Nos animais 7, 8, 9 e 2 houve uma variação na taxa de crescimento de 0,015 a 0,02cm ao dia. Mesmo assim, desses quatro animais três ovularam (7, 8 e 9). Tais taxas de crescimento para os folículos ovulatórios foram bastante inferiores às reportadas por Towson et al. (2002) que atingiram 0,12cm/dia observados. Os animais 2, 8 e 9 tinham diâmetro foliculares maiores que 9 mm e estavam portanto aptos a ovularem. Contudo, o animal 7 apresentou um folículo dominante abaixo de 0,9cm e ovulou, sendo difícil explicar a ovulação. Esperava-se uma taxa de crescimento mais rápida desses folículos uma vez que a P₄ em baixas concentrações proporciona pulsos de alta frequência e baixa amplitude de LH o que favorece o crescimento do folículo e aumento da secreção de estrógenos tornando-o apto à ovulação (ROCHE; CROWE e BOLAND, 1992).

Em relação aos animais 1, 3, 4, 5 e 6 no período mensurado a variação na taxa de crescimento foi de 0,005 a 0,13cm/dia. Em três animais (1, 3, 5) houve um crescimento contínuo dos folículos. Dois desses poderiam potencialmente se tornar folículos ovulatórios já que apresentaram taxa de crescimento de 1,3 mm/dia (animais 3 e 5). O animal 1 apresentou um crescimento lento do folículo e diâmetros sempre inferiores a 0,9cm. Sugere-se que possa ter ocorrido uma supressão na pulsatilidade de LH durante esse período experimental, reduzindo o crescimento folicular. Ambrose et al. (1998) trataram vacas com um implante de Deslorelina e observaram um padrão de crescimento lento dos folículos dominantes em relação ao grupo controle. O implante de Deslorelina proporcionou uma liberação alta e contínua de GNRH, o que promoveu downregulation e, conseqüentemente, a supressão na secreção de LH, Limitando o crescimento dos folículos para diâmetros maiores que 9 mm. No presente experimento, o padrão de crescimento folicular observado para os

animais 4 e 6 não foi de uma onda folicular ovulatória, pois os diâmetros diminuíram da última medida em relação à precedente. É provável que o folículo ovulatório seria detectado após o dia 20 da fase experimental.

O dia da ovulação dos animais que ovularam no decorrer da fase experimental está apresentado na figura 29.

Figura 29 - Frequência de ocorrência do dia da ovulação de acordo com o dia da fase experimental (número de vacas ovuladas nos dias determinados/número total de vacas; % e razão).

O intervalo entre a ovulação inicial da fase experimental e ovulação no decorrer da fase experimental está disposto na figura 30.

Figura 30 - Intervalo entre a ovulação inicial da fase experimental e a ovulação na fase experimental (dias) para os animais que ovularam nesse período e média ($\pm$ EPM)

O intervalo entre ovulações variou de 15 a 18 dias. Tais Resultados foram inferiores aos descritos por Sartori et al. (2004) para novilhas e vacas holandesas, que observaram um intervalo interovulatório de $22 \pm 0,4$ dia para novilhas e $22,9 \pm 0,7$ dias para vacas holandesas. É possível que os ciclos curtos possam ter ocorrido em função da técnica de implantação de cateteres no presente estudo.

O dia da luteólise na fase experimental está representado na figura 31.

Figura 31 - Frequência de ocorrência de luteólise de acordo com o dia da fase experimental (número de vacas cíclicas ou transferidas apresentando luteólise/número total de vacas cíclicas ou transferidas; % e razão)

Três animais tiveram ciclos curtos, tendo a luteólise ocorrido abaixo do dia 15 da fase experimental, sendo que um animal teve luteólise no dia 8 da fase experimental (animal 7) e os outros dois animais tiveram luteólise no dia 11 da fase experimental (animais 8 e 9). Os demais animais apresentaram luteólise entre 16 e 20 (animais 3, 4 e 6) ou teriam apresentado em dias acima do dia 20 da fase experimental (animais 1, 2 e 5). Dos três animais que desenvolveram ciclo curto, apenas um recebeu transferência de embrião. De acordo com Fields e Fields (1996) vacas leiteiras parecem apresentar o processo de regressão luteal a partir 17º dia do

ciclo estral, processo esse mais tardio que vacas de corte (14º dia), podendo ser explicado por um maior e mais ativo CL formado pelas raças taurinas. Outros autores afirmaram que a luteólise ocorre por volta do dia 16 do ciclo estral, caso não haja embrião viável no útero nesse período (BÓ et al., 2000; GONZÁLES, 2002).

Para Copelin et al. (1987) os ciclo curtos não são devidos a um CL predestinado a ter uma menor duração nem a um estímulo gonadotrófico inadequado (GARVERICK et al., 1998), também não tem relação ao reduzido número de receptores para LH no CL (SMITH et al., 1996), nem reduzida função do CL, ou aumentada responsividade do CL à PGF2 α (COPELIN et al., 1987). Sugere-se que o corpo lúteo de curta duração seja devido à luteólise prematura (DUBY et al., 1985), envolvendo produção precoce de PGF2 α pelo útero (COPELIN et al., 1987). Em relação às demais ovulações, as baixas concentrações de P₄ que precedem a primeira ovulação pós-parto resultam em um número menor de receptores para P₄ e maior de receptores para ocitocina nas células endometriais, favorecendo o estabelecimento precoce do feedback positivo entre a ocitocina e PGF2 α que leva à luteólise (ZOLERS et al., 1993). Sugere-se então, que a associação da presença do cateter no endométrio uterino, às baixas concentrações de P₄ observadas na fase experimental, tornaram-se fatores desencadeador dos ciclos curtos observados no presente estudo. Além disso, apesar de não ter sido mensurada a P₄ na fase preparatória, supõe-se que alguns dos animais possam ter entrado para fase experimental com um perfil de P₄ baixo proveniente do ciclo anterior da fase preparatória o que poderia contribuir para a ocorrência dos ciclos curtos.

Os ciclos curtos poderiam explicar a figura 32, que representa o dia do ciclo estral ao abate. Seis dos nove animais estavam no dia 20 do ciclo estral da fase

experimental e os três animais que tiveram ciclos curtos estavam entre os dias 0 e 5 de um ciclo estral subsequente.

Figura 32 - Frequência do dia do ciclo estral ao abate (número de vacas abatidas em determinados dias do ciclo estral/número total de vacas; % e razão)

A variação individual no intervalo entre a luteólise e a ovulação durante a fase experimental está representada na figura 33. Houve uma variação de 4 a 10 dias. Segundo Sartori et al. (2004) o intervalo de dias entre a luteólise e ovulação foi de $5,0 \pm 0,2$ dias para novilhas de três ondas, $4,3 \pm 0,1$ para novilhas de duas ondas e $5,1 \pm 0,2$ dias para vacas de duas ondas foliculares. O intervalo de um animal (animal 7) com 10 dias elevou a média para $6,3 \pm 3,21$ dias encontrada na presente dissertação. Porém o intervalo para os outros dois animais (animais 8 e 9) está de

acordo com a citação do autor acima e também de acordo com Tanabe e Hann (1984) dos quais observaram intervalos luteólise-ovulação com valores médios de $120,00 \pm 8,59$ horas em animais da raças taurinas. A variação individual no intervalo entre a luteólise e ovulação está relacionada ao diâmetro do folículo dominante ou futuro dominante no momento da luteólise natural ou induzida. Assim, menores diâmetros resultarão maior período de crescimento folicular e, conseqüentemente, maior intervalo luteólise e ovulação (KASTELIC; KNOPF e GINTHER, 1990). Com exceção ao animal 7 que apresentou 10 dias de intervalo, a implantação de cateteres parece não ter influenciado esse intervalo.

Figura 33 - Intervalo entre a luteólise e ovulação na fase experimental (dias) para os animais que ovularam nesse período e média ($\pm$ EPM).

O diâmetro final dos folículos pré ovulatórios das vacas que ovularam durante a fase experimental estão representados na figura 34. Os resultados variaram de 0,89 a 1,35cm. Tais resultados foram inferiores aos encontrados por Sartori et al. (2004) que observaram um tamanho médio final dos folículos ovulatórios em torno de $1,49 \pm 0,2$ cm para novilhas e $1,68 \pm 0,5$ cm para vacas holandesas. Embora não tenham ocorrido alterações no diâmetro dos folículos dominantes da primeira onda (Figura 25), notou-se redução nos diâmetros finais dos folículos pré-ovulatórios.

Figura 34 - Diâmetro folicular final das vacas ovuladas na fase experimental (cm) e média ($\pm$ EPM)

A frequência de ocorrência das variáveis relacionadas aos cistos foliculares está disposta na figura 35. Embora não tenha sido feita análise estatística, sugere-se não ter havido influência do lado no qual foi realizada a cirurgia (direito) com a ocorrência de cisto foliculares, pois ocorreu desenvolvimento destes em ambos os

ovários. Em relação ao período de ocorrência de cisto folicular, sugere-se uma diminuição da ocorrência de cisto conforme aumentou o período de tempo em relação à cirurgia. De fato, observou-se a ocorrência de cisto folicular no dia 15 da fase preparatória em quatro dos nove animais (animais 1, 4, 5 e 7) no período entre a cirurgia e ovulação da fase experimental em cinco dos nove animais (animais 1, 2, 4, 5 e 7) diminuindo para dois (animais 2 e 7) dos nove animais durante a fase experimental.

Os animais (2 e 7) que desenvolveram cistos foliculares na fase experimental também desenvolveram cistos na fase preparatória. Os mesmos dois animais ainda desenvolveram perfis alterados de P_4 , sendo que o animal (2) não demonstrou elevação de P_4 ao longo da fase experimental e o animal (7) teve luteólise precoce. Para Dobson e Smith (1998) o estresse induz a inibição do feedback positivo do estradiol ao hipotálamo e hipófise inibindo o pico de LH. De acordo com Noble et al. (2000) e Silvia et al. (2002) vacas tratadas com hormônio adrenocorticotrófico ou baixa dose de P_4 mimetizam os efeitos do estresse sobre o pico de LH. Com base nesses dados da literatura e a alta incidência de cistos foliculares no presente estudo, associados as baixas taxas de concentração plasmática de P_4 dos animais que desenvolveram cistos, presume-se que o cateter implantado no lúmen uterino e todo o procedimento de manipulação dos animais durante o experimento, possam ter promovido uma situação constante de estresse e em consequência uma inibição do pico de LH levando os folículos a encistarem.

1. Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no dia 15 da fase preparatória dividido pelo número total de vacas (% e razão).
2. Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no ovário direito no dia 15 da fase preparatória dividido pelo número total de vacas (% e razão).
3. Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no ovário esquerdo no dia 15 da fase preparatória dividido pelo número total de vacas (% e razão).
4. Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no período decorrente entre a cirurgia e ovulação inicial da fase experimental dividido pelo número total de vacas (% e razão).
5. Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no ovário direito no período decorrente entre a cirurgia e ovulação inicial da fase experimental dividido pelo número total de vacas (% e razão).
6. Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no ovário esquerdo no período decorrente entre a cirurgia e ovulação inicial da fase experimental dividido pelo número total de vacas (% e razão).
7. Número de vacas que apresentaram cistos foliculares na fase experimental dividido pelo número total de vacas (% e razão).
8. Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no ovário direito na fase experimental dividido pelo número total de vacas (% e razão).
9. Número de vacas que apresentaram cistos foliculares no ovário esquerdo na fase experimental dividido pelo número total de vacas (% e razão).

Figura 35 - Variáveis relacionadas à frequência de ocorrências de cistos foliculares

Na figura 36 está representada a variável relacionada aos folículos luteinizados.

1. Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no dia 15 da fase preparatória dividido pelo número total de vacas (% e razão).
2. Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no ovário esquerdo no dia 15 da fase preparatória dividido pelo número total de vacas (% e razão).
3. Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no ovário direito no dia 15 da fase preparatória dividido pelo número total de vacas (% e razão).
4. Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no período decorrente entre a cirurgia e a ovulação inicial da fase experimental dividido pelo número total de vacas (% e razão).
5. Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no ovário direito no período entre a cirurgia e ovulação da fase experimental dividido pelo número total de vacas (% e razão).
6. Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no ovário esquerdo no período entre a cirurgia e ovulação inicial da fase experimental dividido pelo número total de vacas (% e razão).
7. Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados na fase experimental dividido pelo número total de vacas (% e razão).
8. Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no ovário direito na fase experimental dividido pelo número total de vacas (% e razão).
9. Número de vacas que apresentaram folículos luteinizados no ovário esquerdo na fase experimental dividido pelo número total de vacas (% e razão).

Figura 36 - Variáveis relacionadas à frequência de ocorrência de folículos luteinizados.

Ocorreu desenvolvimento de cistos luteinizados em ambos os ovários. O animal (2) que desenvolveu cisto folicular, coincidentemente também desenvolveu cisto luteínizado. Segundo Roche; Crowe e Boland (1992) um inadequado desenvolvimento do folículo ovulatório pode proporcionar o desenvolvimento dessa afecção, que não proporciona a ovulação. O cisto luteinizado, como os foliculares, é decorrente de alterações na liberação do pico de LH. Um dos fatores que promovem essa alteração na liberação do pico de LH é o estresse (DOBSON; SMITH, 1998). A grande incidência de cistos observada na presente dissertação sugere que a implantação de cateteres no lúmen intrauterino proporcionou alterações nos padrões de liberação de LH, uma vez que as afecções citadas acima são decorrentes de alterações desse hormônio.

Uma outra possível causa que poderia ter influenciado nos resultados negativos de prenhez é a endometrite. A figura 37 representa a incidência de endometrite. Dois animais desenvolveram endometrites macroscópica. Sendo o animal 2 na fase preparatória e o animal 8 na fase experimental. O animal 8 desenvolveu teve um perfil baixo de liberação de P₄.

A infecção do oviduto e útero podem ser causados por agentes não específicos, que são bactérias oportunistas (*Escherichia coli*, *Proteus spp*, *Enterobacter*, *Streptococcus alfa-hemolítico*, *Staphylococcus não-hemolítico*, *Pasteurella haemolytica*, *Bacillus spp*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Clostridium spp*), que provocam cervicites e endometrites, com consequente infertilidade e mortalidade embrionária. Esses agentes ocasionam alterações no ambiente uterino, como menor secreção de nutrientes para o embrião antes de sua implantação, aumento da temperatura uterina, produção de toxinas bacterianas e efeito citolítico direto sobre o embrião (CHRISTIANSON, 1992) e conseqüentemente morte embrionária. Embora

tenha ocorrido uma exposição do útero a agentes externos pertencentes ao meio ambiente durante a cirurgia e todo o período experimental, a incidência de endometrite foi baixa, isto sugere uma boa metodologia de assepsia e higienização desempenhada no estudo, bem como boa proteção antimicrobiana exercida pelos fármacos utilizados.

Figura 37 - Frequência de ocorrência de endometrite no período entre a cirurgia e a ovulação inicial da fase experimental e durante a fase experimental (número total de vacas apresentando endometrite/número total de vacas; % e razão)

5.5 SUMÁRIOS DOS RESULTADOS

Os resultados experimentais foram sumarizados na tabela 1

Tabela 1 - Sumário das variáveis medidas e escores de função luteínica, crescimento folicular e patologias observadas no experimento

	Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Grupo (C/T)	T	T	T	T	C	T	C	C	T
	Variáveis									
Fase Preparatória										
	Interv. cirurgia ovul. inicial fase experimental (dias)	72	65	18	35	47	17	32	28	16
	Cistos folic. (sim/não)	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
	Folíc. luteiniz. (sim/não)	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	CL sub-luteinizado (sim/não)	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
	Endometrite (sim/não)	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Fase Experimental										
	Taxa aumento P ₄ D-7 (ng/ml/dia)	0	0,11	0,29	0	0	0,67	0,35	0,03	0
	Somatória P ₄ (ng/ml)	43,05	16,88	42,72	29,69	23,06	80,2	27,63	23,97	22,18
	Maior P ₄ (ng/ml)	8,34	1,6	7,05	4,57	3,53	8,79	3,47	2,61	2,36
	Dia luteólise	>20	?	17	18	>20	20	8	11	11
	Interv. interov. (dias)	>20	?	>20	>20	>20	>20	18	16	15
	Maior folículo D 6-7 (cm)	0,9	1,5	1,07	1,29	1,62	1,89	0,99	0,9	1,32
	Maior folículo dominante entre D14-20 (cm)	0,8	1,32	1,28	0,9	1,05	1,28	0,89	1,35	1,1
	Cistos folic. (sim/não)	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
	Folíc luteiniz. (sim/não)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	CL sub-luteinizado (sim/não)	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
	Endometrite (sim/não)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Escore de função luteínica (0,1,2) ¹		1	0	2	1	0	2	0	0	0
Escore de crescimento folicular (0,1,2) ²		0	2	2	0	2	2	1	2	2
Escore de patologias (0,1,2) ³		0	0	2	1	0	2	0	2	2
Escore total (0,1,2) ⁴		1	2	6	2	2	6	1	4	4

¹Função luteínica: 0 = insuficiência luteal precoce e baixa progesteronemia ou ciclo curto; 1 = insuficiência luteal precoce ou baixa progesteronemia; 2 = ausência de insuficiência luteal precoce ou baixa progesteronemia.

²Crescimento folicular: 0 = folículos nunca maiores que 0,9cm; 1 = folículo < 0,9cm em pelo menos uma medida; 2 = folículos sempre maiores que 0,9cm.

³Patologias: 0 = mas que uma patologia ou patologia recorrente; 1 = uma patologia; 2=nenhuma patologia.

⁴Somatória dos escores de função luteínica, crescimento folicular e patologias.

Analisando-se os escores para crescimento folicular, função luteínica e patologias atribuídas a cada animal, notou-se que estas podem ser divididas em três grupos:

Grupo dos animais com crescimento folicular e funções luteínicas normais e com ausência de patologias ovarianas e ou uterinas (animais 3 e 6).

Grupo dos animais com luteólise precoce (animais 7, 8 e 9), sendo que os animais 8 e 9 tiveram ausência de patologias ovarianas e uterinas. Porém, o animal 7 apresentou cisto folicular, luteínico e endometrite, o que poderia ter sido a causa de ciclo curto.

Grupo dos demais animais (1, 2, 4 e 5), os quais os animais 2 e 5 foram os que obtiveram as concentrações mais baixas de P_4 ao longo da fase experimental, porém sem observação de luteólise, e as mesmas vacas tiveram patologias ovarianas. Contudo o desenvolvimento folicular de ambas foi dentro dos padrões normais. Os animais 1 e 4 tiveram concentrações de P_4 ao longo da fase experimental um pouco mais elevada que as anteriores, ambas tiveram cistos foliculares e o desenvolvimento folicular limitado.

Portanto, baseando-se na soma de escores de função luteínica, crescimento folicular e patologias, notou-se que os procedimentos de cirurgia e de microlavagem uterina afetaram negativamente a função luteínica (7 de 9 animais), tiveram poucos efeitos no desenvolvimento folicular (3 de 9 animais com escore de 0 ou 1), além de provocarem alta incidência de patologias (5 de 9 animais).

CONCLUSÃO E IMPLICAÇÕES

6 CONCLUSÃO E IMPLICAÇÕES

Os procedimentos da técnica de implantação de cateteres intrauterinos e de microlavagem uterina levaram ao insucesso total na manutenção de gestações, provavelmente devido a diversos efeitos deletérios, como insuficiência luteal, comprometendo a produção de P₄, luteólise precoce e em consequência ciclo curtos, ocorrência de patologias no ovário e útero e comprometimento de crescimento folicular. Portanto a hipótese científica de que não ocorrem alterações no crescimento e ovulação de folículos, nas funções luteínica e uterina ou no desenvolvimento de gestações de vacas que receberam implantação de cateteres intrauterinos foi rejeitada.

Diante de tais achados, sugere-se que estudos do microambiente uterino visando a elucidação do diálogo bioquímico materno-fetal sejam feitos utilizando-se técnicas nas quais analisa-se o fluido uterino em dias isolados da gestação para cada vaca. Por exemplo poderiam-se obter lavados intrauterinos utilizando-se sonda de *Foley (in vivo)* ou lavados do lúmen uterino realizado após o abate.

REFERÊNCIAS

- ADEYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 14, n. 6, p. 411 - 420, 1980.
- ALAVI-SHOUSHTARI, S. M.; ASRI-REZAI, S.; ABSHENAS, J. A study of the uterine protein variations during the estrus cycle in the cow: A comparison with the serum proteins. **Animal Reproduction Science**, In Press, Corrected Proof, Available online 18 January, 2006.
- ALVAREZ, R. H.; MEIRELLES, C. F.; AMBROSANO, G. M. B. The use of lower doses of prostaglandin analogue, cloprostenol, for oestrus synchronization in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 25, p. 93 - 96, 1991.
- AMBROSE, J. D.; PIRES, M. F. A.; MOREIRA, F. DIAZ. T.; BINELLI, M.; THATCHER, W. W. Influence of deslorelin (GnRH-agonist) implant on plasma progesterone first wave dominant follicle and pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 50, p. 1157-1170, 1998.
- ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira- FNP**. São Paulo: 2005. Consultoria & Comércio, p. 340.
- BADINGA, L.; DRIANCOURT, M. A.; SAVIO, J. D.; WOLFENSON, D.; DROST, M.; DELASOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Endocrine and ovarian responses associated with the first- wave dominant follicle in cattle. **Biology Reproduction**, n. 47, p. 871-883, 1992.
- BANU, S. K.; AROSH, J. A.; CHAPDELAINE, P.; FORTIER, M. A. Molecular cloning and spatio-temporal expression of the prostaglandin transporter: A basis for the action of prostaglandins in the bovine reproductive system. **PNSA**, v. 30, n. 20, p. 11747-11752, 2003.
- BARROS, C. M.; BETTS, J. G.; THATCHER, W. W.; HANSEN, P. J. Possible mechanisms for reduction of circulating concentrations of progesterone by interferon- in cows: effects on hyperthermia, luteal cells, metabolism of progesterone and secretion of LH. **Journal of Endocrinology**, v. 133, p. 175 -182, 1992.
- BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; MADUREIRA, E. H.; COSTA NETO, W. P.; GRANDINETTI, R. R.; BO, G. A. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with cidr-b devices and ech. **Theriogenology**, v. 55, p. 157 , 2001. (abstract)

BATRA, A. P.; LAMMING, G. E. Oestradiol concentration and the development of uterine oxytocin receptor and smooth muscle of the lower urinary tract. **European Journal Pharmacology**, v. 100, p. 469 - 475, 1994.

BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M.; ZAVY, M. T; CATON, D.; BARRON, D. H. Method for obtaining ovine uterine secretions from unilaterally pregnant ewes. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 6, p. 1522 - 1527, 1975.

BERGAMASCHI, M. A. C. M. **Estratégias hormonais para otimizar a função luteínica de vacas da raça nelore após a sincronização do estro**. 111 p. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2005.

BINELLI, M.; SUBRAMANIAM, P.; DIAZ, T.; JOHNSON, G.A.; HANSEN, T.R.; BADINGA, L.; THATCHER, W.W. Bovine interferon-tau stimulates the janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. **Biology Reproduction**, v. 64, p. 654 -665, 2001.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W. Conceptus stimulated signal transduction pathway in the endometrium to maintain pregnancy. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 1, p. 59 - 85, 1999.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergency in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 31 - 40, 1995.

BÓ, G. A.; BERGFELT, D. R.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. Local versus systemic effects of exogenous estradiol- 17 β on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. **Animal Reproduction Science**, v. 50, p. 141- 57, 2000.

BOTTARRI, S. P.; VOAKER, A.; KAIVEZ, E. Differential regulation of alpha-adrenergic receptor subclasses by gonadal steroids in human myometrium. **Journal Clinical. Endocrinology Metabolito**, v. 57, p. 937 - 941, 1983.

BUTLER, W. R. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine phisiology, **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 138, 2000. suplement 1.

BUTLER, W. R. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 9, p. 2533-2539, 2001.

COPELIN, J.; SMITH, M. F.; GARVERICK, H. A.; YOUNGQUIST, R. S. Effect of the uterus on subnormal luteal function in anoestrus beef cows. **Journal Animal Science**, v. 64, p.1506 -1511, 1987.

CRISTHIANSON, W. T.; STILLBIRTHS, MUMMIES. Abortions and early embryonic death. **The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice**, v. 8, p. 623 - 639, 1992.

DISKIN M. G.; SREENAN J. M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Journal of reproduction and fertility**, v. 59, p. 463-468, 1980.

DIZEREGA, G. S.; HODGEN, G. D. Luteal-phase dysfunction infertility. **Fertility Sterily**, v. 35, p. 489 - 499, 1981.

DOBSON, H.; SMITH, R. F. Stress and subfertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 33, p. 107- 111, 1998.

DUBY, R. T.; BROWNING, T.; CAREY, D.; BLACK, D. L. Progesterone syntesis and histology of postpartum bovine corporea lutea. **Theriogenology**, v. 23, p. 619 - 630, 1985.

DUNNE, D. L.; DISKIN, G. M.; SREENAN, M. J. Embryo and fetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. **Animal Science**, v. 58, p. 39 - 44, 2000.

ELROD, C. C.; VAN AMBURG, M.; BUTLER, W. R. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 3, p. 702 - 706, 1993.

ETHERINGTON, W. G.; KILMER, B. A.; BURKE, J. E. Pregnancy rates related to stage of estrous cycle at prostaglandin treatment in an embryo transfer recipient herd. **Theriogenology**, v. 25, n. 6, p. 845 - 853, 1986.

FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, p. 1295 - 1325, 1996.

FORTUNE, J. E.; QUIRK, S. M. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 1 - 8, 1988.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 225 - 232, 1998.

FREDRICKSON, G.; KINDAHL, H.; EDQVIST, L. E. 11-Ketotetranor PGF metebolites, a suitable indicator for measuring prostaglandin release during the normal oestrus cycle and early pregnancy in the goat. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p. 537-545, 1984.

GARVERICK, H. A.; PARFET, J. R.; LEE, C. N.; COPELIN, J. P.; YOUNGQUIST, R. S.; SMITH, M. F. Relationship of pre and post-ovulatory gonadotropin concentrations to subnormal luteal function in postpartum beef cattle. **Journal Animal Science**, v. 66, p. 104 -111, 1998.

GINTHER, O. J. Internal regulation of phisiological prosses through venoarterial pathways, a review. **Journal Animal Science**, v. 39, p. 550 - 64, 1974.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GONZALEZ, B. Y. Nuclear extract preparation from cultured cells. **DNA and Cell Biology**, p. 1-2, 2002.

GOSPODAROWICZ, D.; CHENG, J.; LUI, G. M. Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. **Endocrinology**, v. 117, n. 6, p. 2383 - 2391, 1985.

GRAHAM, J. D.; CLARKE, C. L. Physiological actions of progesterone in target tissues. **Endocrinology Review**, v. 18, p. 502 - 518, 1997.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; KILLILEA, S. D. Production of mitogenic factor(s) by ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Endocrinology**, v. 130, n. 6, p. 3625- 3632, 1992.

GREVE, T. In vitro embryotechnologies in cattle with particular reference to their use in cattle breeding schemes. **Reproduction Domestic Animals**, v. 27, p. 22 - 28, 1992.

GREVE, T.; AVERY, B.; CALLESEN, H. Viability of in vivo and in vitro produced bovine embryos. **Reproduction Domestic Animals**, v. 28, p. 164 -169, 1993.

GRUNERT, E.; GREGORY, R. M. **Diagnóstico e terapêutica da infertilidade na vaca**. 2. ed. Porto Alegre: Sulina, 1989, p. 163.

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

HANK, H. W. Infertility in dairy cattle. In: BELTSVILLE SYMPOSIA IN AGRICULTURAL RESEARCH, 3., 1979, Beltsville.[**Proceedings...**] New Jersey: Allanheld, Osmun and Co. Montclair, 1979. p. 19 - 29.

HANSEN, T. R.; AUSTIN, K. J.; PERRY, D.; PRU, J. K.; TEIXEIRA, M. G.; JOHNSON, G. A. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 329 - 339, 1999.

HENRICKS, D. M.; LAMOND, D. R.; HILL, J. R. Plasma progesterone concentrations before mating and in early pregnancy in the beef heifers. **Journal Animal Science**, v. 33, p. 450 - 454, 1971.

HORTA, A. E. M.; COSTA, C. M. S. G.; ROBALO SILVA, J. Possibility of reducing the luteolytic dose of cloprostenol in cyclic dairy cows. **Theriogenology**, v. 25, n. 2, p. 291 - 301, 1986.

HUCKE, E. E. T. S.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; FLORIO, J. C.; FELICIO, L. F. Reproductive experience reduces striatal dopaminergic responses in freely moving female rats. **Neuroreport**, v. 9, n. 16, p. 3589 - 3593, 1998.

HUCKE, E. E. T. S.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; SIDER, L. H.; FELICIO, L. F. Reproductive experience modulates dopamine-related behavioral responses. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 68, n. 3, p. 575 - 582, 2001.

HURTGEN, J. P.; WHITMORE, H. L. Effects of endometrial biopsy, uterine culture, and cervical dilatation on the equine estrous cycle. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 1, p. 173 - 197, 1978.

HURTGEN, J. P.; GANJAN, V. K. The effect of intrauterine and cervical manipulation on the equine oestrous cycle and hormone profiles. **Journal Reproduction Fertility**, v. 27 p. 191 - 7, 1979.

IMAKAWA, K.; ANTHONY, R. V.; KAZEMI, M.; MAROTTI, K. R.; POLITES, H. G.; ROBERTS, R. M. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. **Nature**, v. 330, p. 377 - 379, 1987.

JABLONKA-SHARIFT, A.; GRASUL-BILSKA, A. T.; REMENDER, D. A. Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Endocrinology**, v. 133, p. 1871-1879, 1993.

KASTELIC, J. P.; KNOPF, L.; GINTHER, O. J. Effect of day of prostaglandin F_{2α} treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, p. 169 -180, 1990.

KAYSER, J. P. R.; KIM, J. G.; CERNY, R. L.; VALLET, L. J. Global characterization of porcine intrauterine proteins during early pregnancy. **Reproduction**, v. 131, p. 379 - 388, 2006.

KENNEDY, P. C.; MILLER, R. B. The female genital system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4.ed., San Diego: Academic, v. 3, 1993, p. 349 – 470.

KILLIAN, G. J. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 82 - 83, p. 141 –153, 2004.

KINDAHL, H.; EDQUIST, L. E.; BANE, A.; GRANSTROM, E. Blood levels of progesterone and 15-keto-13,14-dihydro-prostaglandin F2 α during the normal oestrous cycle and early pregnancy in heifers. **Acta Endocrinology**, v. 82, n. 1, p. 134 -149, 1976.

KNICKERBOCKER, J. J.; THATCHER, W. W.; BAZER, F. W.; BARRON, D. H.; ROBERTS, R. M. Inhibition of uterine prostaglandin-F2 alpha production by bovine conceptus secretory proteins. **Prostaglandins**, v. 31, p. 777 - 793, 1986.

KUNZ, T. L.; GAMBARINI, M. L.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; GALINDO, A. D. S. Mortalidade embrionária em bovinos: inter-relações embrião patógeno. **Revista CFMV**, v. 8, n. 26, p. 27 - 36, 2002.

LAMMING, G. E.; DARWASH, A. O.; BACK, H. L. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. **Journal Reproduction Fertility**, v. 37, p. 245-252, 1989.

LAMMING, G. E.; WATHES, D. C.; PETERS, A. R. Endocrine patterns of post-partum cow. **Journal Reproduction Fertility**, p. 155-170, 1981. Supplement 30.

LEBLANC, S. P.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; KEEFE, G. P.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. Defining and Diagnosing Postpartum Clinical Endometritis and its Impact on Reproductive Performance in Dairy Cows. **American Dairy Science Association**, v. 85, p. 2223-2236, 2002.

LICHT, P.; LOSCH, A.; DITRICH, R.; NEUWINGER, J.; SIEBZEHN RUBL, E.; WILDT, L. Novel Insights into human endometrial paracrinology and embryo-maternal communication by intrauterine microdialysis. **Human Reproduction Update**, v. 4, p. 532-538, 2001.

LINDNER, G. M.; WRIGHT, J. R. R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, n. 4, p. 407-416, 1983.

LOONEY, C. R.; LINDSEY, B. R.; GONSETH, C. L. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, v. 41, p. 67-72, 1994.

LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J.; RUTTLANT, J.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Persistent Ovarian follicles in dairy cows: a therapeutic approach. **Theriogenology**, v. 56, p. 649-659, 2002.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 1-5, 1995.

MANN, G. E.; MANN, S. J.; LAMMING, G. E. The inter relationship between the maternal hormone environment and the embryo during the early stages of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, p. 55, 1996.

MANN, G. E.; ROBISON, R. S.; WHATES, D. C. The regulation of interferon τ . Production and uterine receptors during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 317-328, 1999.

MAPLETOFT, R. J.; GINTHER, O. J. Adequacy of main uterine vein and the ovarian artery in the local venoarterial pathway for uterine-induced luteolysis in ewes. **American Journal Veterinary Research**, v. 36, n. 7, p. 957-963, 1975.

MARKETTE, K. L.; SEIDEL, J. G. E.; ELSDEN, R. P. Estimation of embryonic losses in bovine embryo transfer recipients from P4 prolapses and returns to estrus. **Theriogenology**, v. 23, p. 45-52, 1985.

MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; SILVA, C. P.; BO, G. A.; BARUSELLI, P. S. Increased pregnancy rates in *bos taurus* x *bos indicus* embryo recipients with treatments to increase plasma progesterone concentration. **Theriogenology**, v. 59, p. 369, 2003.

MARTAL, J.; LACROIX, M. C.; LOUDES, C. Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. **Journal Reproduction Fertility**, v. 56, p. 63-73, 1979.

MARTIN, I. **Avaliação ultrasonográfica, perfil hormonal e imunohistoquímica de receptores de estrogênio e progesterona durante o ciclo estral em vacas nelore (*bos taurus indicus*)**. 140 p. Tese (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

MASLAR, I. A.; POWERS-CRADDOCK, P.; ANSBACHER, R. Decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium, effects of continuous and intermittent progesterone treatment. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 4, p. 741-750, 1986.

McCRACKEN, J. A.; SCHRAMM, W.; OKULICZ, W. C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF2 α from ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p. 31-55, 1984.

McDONALD, L. E. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**, 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989.

MEYER, M. D.; HANSEN, P. J.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; BADINGA, L.; ROBERTS, R. M.; LI, J.; OTT, T. L.; BAZER, F. W. Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin F2 α of cows in response to recombinant interferon- τ . **Journal Dairy Science**, v. 78, p. 1921-1931, 1995.

MILVAE, R. A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F2 α in corpus luteum function. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p. 1-5, 2000.

MIYAMOTO, A. Intraluteal mechanisms involved in prostaglandin F2-induced luteolysis in Ewes. **Journal Reproduction and Development**, v. 42, p. 61-63, 1996. Supplement.

Moor, R. M.; Rowson, L. E. A. The corpus luteum of the sheep: functional relationship between the embryo and the corpus luteum. **Journal of Endocrinology**, v. 34, p. 233-239, 1996.

Neely, D. P.; Hughes, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. The influence of intrauterine saline infusion on luteal function and cyclical activity in the mare. **Journal Reproduction Fertility**, n. 23, p. 235-239, 1975. Supplement.

NEELY, D. P.; STABENFELDT, G. H.; KINDAHL, H.; HUGHES, J. P.; KENDRICK, J. W. Effect of intrauterine saline infusion during the late luteal phase on the estrous cycle and luteal function of the mare. **American Journal Veterinary**, v. 40, n. 5, p. 665-668, 1979.

NIEMANN, H.; SACHER, B.; ELSAESER, F. Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of nonsurgical transfer of frozen/thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 23, p. 631-639, 1995.

NOAKES, D. E.; PARKINSON, T. J.; ENGLAND, C. G. W. **Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics**. 8 ed. London, Saunders, v. 1, p. 2-53, 2001.

NOAKES, D.E. **Fertility and Obstetrics in Cattle**. 2 ed. London University Press, p. 145, 1997.

NOBLE, K. M. J.; TEBBLE, E.; HARVEY, D.; DOBSON, H. Ultrasonography and hormone profiles of persistent ovarian follicles (cysts) induced with low doses of progesterone in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 361-366, 2000.

OKUDA, K.; KITO, S.; SUMI, N.; SATO, K. A study of the central cavity in the bovine corpus luteum. **Veterinary Record**, v. 123, p. 180-183, 1988.

PAISLEY, L. G., MICKELSEN W. D., ANDERSON, P. B. Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: A review. **Theriogenology**, v. 25, p. 353-381, 1986

PATE, J. L. Cellular components involved in luteolysis. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1884-1890, 1994.

PIPER, P. J.; VANE, J. R.; WILLE, J. H. Inactivation of prostaglandin by the lungs. **Nature**, v. 225, p. 600-604, 1970.

PRIEDKALNS, J.; LEISER, R. Female Reproductive System. In: DELLMANN, H.D.; EURELL, J. **Textbook of Veterinary Histology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 247-286, 1998.

REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. **Review Reproduction**, v. 1, n. 3, p. 182- 192, 1996.

REMSEN, L. G.; ROUSSEL, J. D. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. **Theriogenology**, v. 18, p. 365-72, 1982.

ROCHA, J. L. **Sincronização hormonal da onda folicular e do estro em novilhas de corte mestiças monitoradas por radiotelemetria**. 135 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ROCHE, J. F.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P. Postpartum anestrous in dairy and beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 371-378, 1992.

ROSA, G. O.; LOBREIRO, J. C. T.; DODE, M. A. N. Desempenho reprodutivo de fêmeas Zebuínas. **Zootecnia**, v. 26, p. 219-236, 1988.

SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; BALLOU, M. A.; HIGGINBOTHAM, G. E.; KIRK, J. H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 31-45, 2004.

SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W.; POLL, L.; OVERTON, M. W.; REYNOLDS, J. P. Human chorionic gonadotropin influences numbers of corpora lutea, plasma progesterone and conception rates of dairy cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14.; 2000, Stockholm. **Proceedings** Stockholm: STS, 2000. v. 1, p. 144.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Comparison of Ovarian Function and Circulating Steroids in Estrous Cycles of Holstein Heifers and Lactating Cows. **Journal Dairy Science**, v. 87, p. 905-920, 2004.

SHAW, D. W.; BRITT, J. H. Concentrations of Tumor Necrosis Factor α and Progesterone Within the Bovine Corpus Luteum Sampled by Continuous-Flow Microdialysis during Luteolysis in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 847-854, 1995.

SHAW, D. W.; GOOD, T. E. Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. **Theriogenology**, v. 63, p. 513-518, 2000.

SHEA, B. F. Evaluating the bovine embryo. **Theriogenology**, v. 15, p. 31- 42, 1981.

SHOLL, S. A.; ORSINI, M. W.; HITCHINS, D. J. Estrogen synthesis and metabolism in the hamster blastocyst, uterus and liver near the time of implantation. **Journal Steroid Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 1153-61, 1983.

SHORT, E.C.; GEISERT, R. D.; HELMER, S. D.; ZAVY, M.T.; FULTOW, R. W. Expression of antiviral activity and induction of 2',5'-oligoadenylate synthetase by conceptus secretory proteins enriched in bovine trophoblast protein-1. **Biology of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 261-268, 1991.

SILCOX, R. W.; POWELL, K. L.; KISER, T. E. Ability of dominant follicles to respond to exogenous GnRH administration is dependent on their stage of development. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 219, 1993. Supplement 1.

SILKE, V.; DISKIN, M. G.; KENNY; BOLAND, M. P.; DILLON, P. M. E. E. J. F.; SREENAN, J. M. Extent, pattern and factors associated with late embryonic losses in dairy cows. **Animal reproduction Science**, v. 71, p. 1-12, 2002.

SILVA, P.; AITKEN, P. R.; RHIND, M. S.; RACEY, A. P.; WALLACE, M. J. Impact of maternal nutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and ovarian development in growth-restricted as normally grow late gestation sheep fetuses. **Reproduction**, v. 123, p. 769-777, 2002.

SITERI, P. K.; STITES, D. P. Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy. **Biology Reproduction**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 1982.

SMITH, G. D.; SAWER, H. R.; MIRANDO, M. A.; GRISWOLD, M. D.; SADHU, A.; REEVES, J. J. State luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels and endometrial cells composition in bovine normal and short lived corpora lutea. **Biology Reproduction**, v. 55, p. 902-909, 1996.

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

SQUIRES, E. L.; LINDSEY, A. C.; BUCHANAN, B. R. A method to obtain pregnancies in mares using minimal sperm numbers. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTICE, USA. **Proceedings...** USA, 2000. p. 335, 2000.

STAPLES, R. E.; HANSEL, W. W. Luteal function and embryo survival in the bovine. **Journal Dairy Science**, v. 44, p. 2040, 1961. (Abstract).

STUBBINGS, R. B.; WALTONN, J. S. Relationship between plasma progesterone concentrations and pregnancy rates in cattle receiving either fresh or previously frozen embryos. **Theriogenology**, v. 26, p. 145-155, 1986.

SUH, D. Y.; HUNT, T. K.; SPENCER, E. M. Insulin- like growth factor-I reverses the impairment of wound healing induced by corticosteroids in rats, **Endocrinology**, v. 131, n. 5, p. 2399-2403, 1992.

TANABE, T. Y.; HANN, R. C. Synchronized estrus and subsequent conception in dairy heifers treated with prostaglandinF2 α . Influence of stage of cycle at treatment. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 805-811, 1984.

THATCHER W. W.; BARTOL, F. F.; KNICKERBOCKER, J. J.; CURL, J. S.; WOLFENSON, D.; BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M. Maternal recognition of pregnancy in cattle. **Journal Dairy Science**, v. 67; p. 2797-811, 1984.

THATCHER, W. W, MACMILLAN, K. L, HANSEN, P. J. Embryonic Losses, Cause and prevention. **Factors affecting calf crop**, cap. 9, p. 135–153, 1994.

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1435-1450, 2001.

THATCHER, W. W.; KNICKERBOCKER, J. J.; BARTOL, F. F.; BAZER, F. W.; ROBERTS, R.M.; DROST, M. Maternal recognition of pregnancy in relation to the survival transferred embryos: endocrine aspects. **Theriogenology**, v. 23, p. 129, 1985.

TOWNSON, H. D.; CONNOR, L. C.; PRU, K. J. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and distribution of immune cell populations in the bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biology Reproduction**, v. 66, p. 361-366, 2002.

UNGERSTEDT, U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. **Acta Physiology Scandinava**, v. 367, p. 1-48, 1971. Supplement.

VACA, L.A.; GALINA, C.; FERNÁNDEZ-BACA, S. Progesterone levels and relationship with the diagnosis of a corpus luteum by rectal palpation during the estrous cycle in zebu cows. **Theriogenology**, v. 20, n. 1, p. 67-76, 1983.

VISINTIN, J. A.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA1 E . H. Superovulação de novilhas da raça Nelore com diferentes doses de FSH/LH e congelamento de embriões pelo método *one-step* com etilenoglicol . **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 36 n. 5, São Paulo, 1999.

VIVEIROS, A. T. M. **Fisiologia da reprodução de bovinos**. Lavras: UFLA, p. 62, 1997.

WATHES, D. C.; TAYLOR, V. J.; CHENG, Z.; MANN, G. E. Follicle growth, corpus luteum function and their effect on embryo development in postpartum dairy cows. **Reproduction**, v. 61, p. 219- 237, 2003.

WHATHES, D. C.; ROBINSON, R. S; MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The establishment of early pregnancy in cows. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 33, p. 279-284, 1998.

WIELBOLD, J. L. Embryonic mortality and uterine environment in first-service lactating dairy cows. **Journal Reproduction Fertility**, v. 84, p. 393-399, 1988.

WRATHALL, A. E. Embryo transfer and disease transmission in livestock: a review of recent research. **Theriogenology**, n. 1, p. 81-88, 1995.

ZOLLERS, W. G. J.; GARVERICK, H. A.; SMITH, M. F.; MOFFATT, R. J.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. S. Concentration of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrus cycle. **Journal Reproduction Fertility**. v. 97, p. 329-337, 1993.