MARCELO CARDOSO DE LIMA

**Desenvolvimento de uma técnica cirúrgica para o
monitoramento do microambiente uterino em bovinos**

São Paulo
2006

MARCELO CARDOSO DE LIMA

**Desenvolvimento de uma técnica cirúrgica para o monitoramento do
microambiente uterino em bovinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestrado em Ciência

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

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 Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1697
FMVZ

Lima, Marcelo Cardoso de
Desenvolvimento de uma técnica cirúrgica para o monitoramento do
microambiente uterino em bovinos / Marcelo Cardoso de Lima. - São
Paulo: M. C. de Lima, 2006.
153 f. : il.

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

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Mario Binelli.

1. Microambiente uterino. 2. Cateter. 3. Útero. 4. Cirurgia. 5. Bovinos.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento do método de microdiálise para estudo do microambiente uterino: técnica cirúrgica e mapeamento histopatológico após a implantação da membrana", Protocolo nº440/2004, 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 method of microdialysis to study the uterine microenvironment: surgical technique and histopathological evaluation after implantation of the membrane" protocol number 440/2004, 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, 30 de julho de 2004

Profª Drª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LIMA, Marcelo Cardoso de

Título: Desenvolvimento de uma técnica cirúrgica para o monitoramento do
microambiente uterino em bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestrado em Ciência

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICO EM ESPECIAL

Aos meus pais,

Racine Cardoso de Lima e Aimeé Machado de Lima

Com toda gratidão e amor, pelo exemplo de vida, de caráter, pelo incentivo em todas as horas que precisei, pelos conselhos e carinho nos momentos de difíceis decisões em minha vida, pela participação constante em minhas alegrias como tristezas, pelo esforço e dedicação que tornou possível a realização de meus estudos e principalmente, pelo que vocês sempre foram e são.

A minha esposa,

Marina Bonatelli

Pela pureza e simplicidade, pelo amor, carinho e ternura, pela coragem e valentia que sempre demonstra nos momentos difíceis, pela vontade de vencer e viver de maneira digna, pela força e confiança que deposita em mim, por saber ser mulher e por ser bela nobre em minha vida.

Aos meus irmãos,

Patrícia, Racine Jr, Eduardo, Rodrigo, Maria Eloísa

Pela personalidade, pela sinceridade, pelo carinho e amizade, pelo exemplo de serem batalhadores e conquistadores na vida e sobre tudo por sempre acreditar que eu venceria esta etapa.

**AMO VOCÊS,
MEU ETERNO RECONHECIMENTO
E PALAVRA DE GRATIDÃO.**

AGRADECIMENTOS

AGRADEÇO SINCERAMENTE:

À FAPESP pelo apoio financeiro no qual permitiu o desenvolvimento e a realização deste projeto assim como o meu envolvimento de maneira integral com o trabalho na área de pesquisa.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, especialmente aos Departamentos de Cirurgia e de Reprodução Animal.

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. Dra. Anneliese de Souza Traldi pela orientação e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro pela disponibilização do laboratório de Estereologia e Anatomia Química (LSCA) – VCI/FMVZ-USP para as análises histológicas. Agradeço também os seus orientados que tanto me ajudaram na elaboração de fotografias durante o período de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Idécio Luis Sinhorini pela colaboração neste trabalho.

A Profa. Dra. Veridiana Maria B. D. de Moura pela ajuda nos momentos referentes às análises histopatológicas.

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

Ao amigo Prof. Dr. José Manoel dos Santos por estar sempre disposto a ajudar.

Ao amigo Prof. Paulo Felipe Izique Goiozo, pela amizade de muitos anos e que mesmo quando distantes essa amizade não parou de crescer.

Ao amigo Filipe Fedozzi, pela amizade e ajuda nos momentos em que mais precisei, principalmente quando relacionados à discussão de trabalhos científicos e a realização de experimentos.

Aos meus amigos secretários do setor de Anatomia: Maicon, Jaqueline, Cauê, Graça e técnicos Ronaldo, Índio, Diogo.

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

À equipe de pesquisa do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (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.

À amiga Profa. Dra. Cláudia Maria Bertan Membrive por toda ajuda e ensinamentos prestados.

Aos estagiários que passaram pelo LFEM disponibilizando suas horas de estágio e seu precioso tempo nos ajudando.

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

Aos amigos André Furugem, Juliana Nascimento, Eneiva Carla Carvalho, Cláudia Fernandes Raphael, Karen Peres, Alexandre B. Almeida e Fernando A. Cogo de Souza.

Ao amigo Fernando Pardo e Raquel Fernandes pela ajuda cedida nos momentos de cirurgia e manejo dos animais.

Aos funcionários da prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga e da FMVZ, Marcio, José Maria, André, Creusa, Edna 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 Valmir, 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 pelo fornecimento 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 e clínica de grandes animais.

Aos colegas de pós-graduação pela amizade, carinho, incentivo e colaborações constantes e pelo convívio diário, compartilhando alegrias e tristezas, tornando a vida na pós-graduação mais familiar.

À Família Bonatelli, principalmente aos meus queridos, Márcio e Márcia pelo extremo carinho e ajuda nos momentos de dificuldades.

Aos animais pelo conhecimento e desenvolvimento científico que me proporcionou.

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

Aprender é descobrir aquilo que você já sabe. Fazer é demonstrar que você sabe.

Ensinar é lembrar aos outros que eles sabem tanto quanto você.

Vocês são todos aprendizes, fazedores, professores".

(Richard Bach).

AGRADEÇO DE FORMA ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Mario Binelli

Por ser verdadeiramente um Mestre, saber ver as pessoas na sua forma mais bruta e principalmente por saber lapidá-las. Pelo seu profissionalismo, pelo caráter, pela dedicação e paciência que me guiou e transmitiu seus conhecimentos, obrigado pelo que sou agora.

À Profa. Dra. Erica Zimmerknopf

Mulher corajosa e inovadora. Agradeço pela co-orientação, amizade e disponibilização do seu tempo precioso. Serei eternamente grato pelos seus ensinamentos.

Ao amigo André Fernando Freire

Pelo companheirismo, pelo grande incentivo e estimável colaboração na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

Pelos animais cedidos, disponibilização do laboratório de Histologia, bem como todo material e equipamento necessário para confecção das lamínas histológicas. Agradeço também a confiança e o encaminhamento ao verdadeiro caminho da ciência.

*“A mente que se abre a uma nova
idéia jamais voltará ao seu
tamanho original”.*

(Albert Einstein)

RESUMO

LIMA, M. C. **Desenvolvimento de uma técnica cirúrgica para o monitoramento do microambiente uterino em bovinos.** [Development of a surgical technique for monitoring the uterine microenvironment in cattle.]. 2006. 153 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - 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 conceito. Objetivou-se a validação de uma técnica cirúrgica de implantação de cateteres intrauterinos para a obtenção de fluídos em diferentes dias do ciclo estral e da prenhez inicial em bovinos, de modo a permitir a análise sistemática e contínua das secreções do microambiente uterino. O funcionamento dos cateteres foi testado e alterações morfológicas consequentes da implantação dos cateteres foram descritas. Cateteres de silicone foram inseridos cirurgicamente nos cornos uterinos e exteriorizados pelo flanco de nove vacas Holandesas. As vacas foram divididas para receberem ($n = 6$) ou não ($n = 3$) embriões no dia 7 de um ciclo estral sincronizado (dia 0 = dia do cio). Microlavagens uterinas foram realizadas nos dias 14, 16, 18 e 20 pós-estro. Todas as vacas foram abatidas no dia 20, seus tratos reprodutivos submetidos à análise macroscópica e tecidos uterinos coletados e fixados para análise histopatológica. A técnica utilizada: (1) permitiu a obtenção de fluídos uterinos, (2) resultou em 0% de taxa de prenhez, (3) causou afecções nos órgãos reprodutivos, como aderências, infecções focais e endometrites e (4) afetou o tecido uterino com inflamações agudas e crônicas além de fibroplasias e dilatações glandulares. Conclui-se que a implantação e operação dos cateteres e as alterações morfológicas foram incompatíveis com a manutenção da prenhez. A abordagem cirúrgica testada não foi adequada para estudar o microambiente uterino de vacas prenhes.

Palavras-chave: Microambiente uterino. Cateter. Útero. Cirurgia. Bovinos.

ABSTRACT

LIMA, M. C. **Development of a surgical technique for monitoring the uterine microenvironment in cattle.** [Desenvolvimento de uma técnica cirúrgica para o monitoramento do microambiente uterino em bovinos]. 2006. 153 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

In cattle, embryonic death related to failure in the maternal recognition of pregnancy is as high as 30 to 40%. The success of pregnancy depends on appropriate biochemical interactions between the maternal endometrium and conceptus. The purpose of this dissertation was to validate a surgical technique to place and operate of intrauterine catheters to obtain fluid on different days of the estrous cycle and early pregnancy in cows, such technique should allow a systematic and continuous analysis of the uterine microenvironment secretions. Function of catheters was tested and resulting morphological changes were described. Silicon indwelling catheters were surgically placed in both uterine horns and exteriorized by the flank in 9 Holstein cows. Cows were divided to either receive (n = 6) or not (n = 3) embryo transfer on the day 7 of a synchronized estrous cycle (day 0 = day of estrus). Uterine flushing was performed through the catheters on days 14, 16, 18 and 20 pos-estrus. All cows were slaughtered on day 20 and reproductive tracts were collected and prepared for histological analysis. In summary, the technique used: (1) allowed collection of uterine fluids, (2) resulted in 0% pregnancy rate, (3) caused pathologies in the reproductive organ, such as adhesions, focal infections and endometritis and (4) affected the uterine tissue with acute and chronic inflammation besides fibroplasias and glandular dilation. It was concluded that implantation and operation catheters the resulted in morphological changes which were incompatible with maintenance of pregnancy. The surgical approach tested was not suitable to study the uterine microenvironment in pregnant cows.

Key words: Uterine microenvironment. Catheter. Uterus. Surgery. Cattle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho da vista cranial do trato genital da fêmea bovina. Notar em (1) cérvix; (2) corpo do útero; (3) cornos uterinos; (4) oviduto; (5) ovário; (6) mesovário; (7) corpo lúteo; (8) ligamento intercornual; (9) reto.....	38
Figura 2 - 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)	56
Figura 3 - Procedimentos de indução do estro relacionado à fase preparatória (Fotografias A e B).....	58
Figura 4 - Procedimentos de indução do estro relacionado à fase preparatória (Fotografias C e D)	59
Figura 5 - Procedimentos cirúrgicos de implantação de cateteres intra-uterinos (Fotografias de A a F)	62
Figura 6 - Procedimentos cirúrgicos de implantação de cateteres intra-uterinos (Fotografias de G a L)	64
Figura 7 - Procedimentos cirúrgicos de implantação de cateteres intra-uterinos (Fotografias de M à R)	67
Figura 8 - Procedimentos cirúrgicos de implantação de cateteres intra-uterinos (Fotografias de S a X)	68
Figura 9 - Procedimentos de descongelação, seleção e inovulação dos embriões	73
Figura 10 - Procedimentos de microlavagens uterinas realizados no dia 14, 16, 18 e 20 pós-estro (Fotografias de A a F)	75
Figura 11 - Procedimentos de abate dos animais após as microlavagens, análise macroscópicas do trato reprodutor feminino e obtenção de tecidos para análise histopatológicas (Fotografias de A a E).....	77
Figura 12 - Desenho esquemático da metodologia adotada para contagem celular do corte referente a cada região uterina.....	79
Figura 13 - Frequência de ocorrência de variáveis relacionadas à ferida cirúrgica (número de vacas apresentando ocorrência/número total de vacas - % e razão)	88
Figura 14 - Frequência de ocorrência de variáveis relacionadas às afecções e fisiologia uterina (número de vacas apresentando ocorrência/número total de vacas - % e razão).....	91

Figura 15 - Frequência de ocorrência de variáveis relacionadas à manutenção dos cateteres intrauterinos implantados (número de vacas apresentando ocorrência/número total de vacas - % e razão).....	94
Figura 16 - Observações relacionadas à operação dos cateteres para a realização das microlavagens (Fotografias de A a D).....	95
Figura 17 - Valores médios ($\pm$ EPM) da taxa de recuperação para cada animal nos grupos de vacas cíclica e vacas transferidas	97
Figura 18 - Valores médios ($\pm$ EPM) da taxa de recuperação para cada dia de microlavagem nos grupos de vacas cíclicas e vacas transferidas	97
Figura 19 - Valores médios ($\pm$ EPM) da taxa de recuperação para cada dia de microlavagem do corno uterino direito e corno uterino esquerdo nos grupos de vacas transferidas (A) e cíclicas (B)	98
Figura 20 – Intervalo de tempo (dias) entre a cirurgia e o abate dos animais	100
Figura 21 – Frequência de ocorrência de microlavados com aspecto serosanguinolento ao longo da fase experimental (número de vacas que apresentaram microlavados com aspecto serosanguinolento/ número total de vacas - % e razão)	102
Figura 22 – Frequência de ocorrência de microlavados com aspecto turvo ao longo da fase experimental (número de vacas que apresentaram microlavados com aspecto turvo/ número total de vacas - % e razão).....	103
Figura 23 – Frequência de ocorrência de grumos nos microlavados ao longo da fase experimental (número de vacas que apresentaram microlavados com presença de grumos/número total de vacas - % e razão).....	103
Figura 24 – Fotografias dos microlavados obtidos em diferentes dias do período experimental	104
Figura 25 – Frequência de ocorrência de variáveis relacionadas aos achados de necropsia: processo inflamatório (número de vacas apresentando ocorrência/número total de vacas - % e razão).....	107
Figura 26 – Fotografias dos achados de necrópsia relacionados ao processo inflamatório parauterino	108
Figura 27 – Frequência de ocorrência de variáveis relacionadas aos achados de necropsia: aderências (número de vacas apresentando ocorrência/número total de vacas - % e a razão).....	109
Figura 28 – Fotografias dos achados de necrópsia relacionados às aderências encontradas.....	110

Figura 29 – Frequência de ocorrência de variáveis relacionadas aos achados de necropsia (número de vacas apresentando ocorrência/número total de vacas % e a razão).....	112
Figura 30 – Fotografias dos achados de necropsia relacionados exsudatos e secreções do trato reprodutivo.....	113
Figura 31 – Fotomicrografia do endométrio bovino. Notar na seta as células polimorfonucleares distribuídas ao longo do endométrio, caracterizando endometrite aguda. Coloração em H.E., 40X	116
Figura 32 – Contagem de células polimorfonucleares para cada animal (média $\pm$ EPM).....	118
Figura 33 – Contagem de células polimorfonucleares para cada corte de tecido (média $\pm$ EPM)	118
Figura 34 – Número de células polimorfonucleares (número/104 μ m ²) para cada animal nos cortes de tecidos uterinos	119
Figura 35 – Fotomicrografia de endométrio bovino. Notar na seta as células mononucleares distribuídas ao longo do endométrio, caracterizando a endometrite aguda. Coloração em H.E., 40X	120
Figura 36 – Contagem de células mononucleares para cada animal (média $\pm$ EPM).....	122
Figura 37 – Contagem de células mononucleares para cada corte de tecido (média $\pm$ EPM).....	123
Figura 38 – Número de células mononucleares (número/10 ⁴ μ m ²) em diferentes animais comparados com a identificação de acordo com os cortes de tecidos uterinos obtidos para análise histopatológica.	124
Figura 39 – Fotomicrografia do endométrio bovino. Notar na seta as glândulas endometriais normais. Coloração em Tricomo de Gomory, 40X.....	126
Figura 40 – Fotomicrografia do endométrio bovino. Notar na seta as glândulas endometriais dilatadas. Coloração em Tricomo de Masson, 40X.....	126
Figura 41 – Contagem de glândulas endometriais (normais, dilatadas e totais / 10 ⁵ μ m ²) para cada animal (média + EPM).....	127
Figura 42 - Contagem de glândulas endometriais (normais, dilatadas e totais / 10 ⁵ μ m ²) para cada corte de tecido uterino (média + EPM).....	127
Figura 43 – Proporção do número de glândulas dilatadas sobre o número total de glândulas para cada animal (%).....	128

Figura 44 – Proporção do número de glândulas dilatadas sobre o número total de glândulas para cada corte de tecido uterino (%)	128
Figura 45 – Fotomicrografia de endométrio bovino. Evidenciar na seta fibroplasia periglandular (fibrócitos ao redor das glândulas endometriais). Coloração em H.E., 40X.....	129
Figura 46 – Contagem de glândulas com fibroplasia periglandular para cada animal (média $\pm$ EPM).....	130
Figura 47 – Contagem de glândulas com fibroplasia periglandular para cada corte de tecido (média $\pm$ EPM).....	130
Figura 48 – Proporção do número de glândulas fibrosadas sobre o número total de glândulas para cada animal (%).....	131
Figura 49 – Proporção do número de glândulas fibrosadas sobre o número total de glândulas para cada corte de tecido (%).....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ocorrência de variáveis relacionadas ao procedimento cirúrgico (fase preparatória).....	134
Tabela 2 - Ocorrência das variáveis relacionadas às microlavagens uterinas (fase experimental).....	135
Tabela 3 - Ocorrência das variáveis relacionadas aos achados de necrópsia (fase experimental).....	136
Tabela 4 - Ocorrência das variáveis relacionadas aos achados histopatológicos (fase experimental).....	136
Tabela 5 – Escore atribuído as variáveis totais por animal relacionadas à fase preparatória e experimental.	137

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL E ATIVIDADE OVARIANA NO ÚTERO	27
2.2 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO	32
2.3 MORTALIDADE EMBRIONÁRIA PRECOCE	35
2.4 MORFOLOGIA DO ÚTERO BOVINO	37
2.5 CARACTERIZAÇÃO DO MICRO AMBIENTE UTERINO.....	41
2.6 MECANISMOS UTERINOS DE DEFESA: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	44
2.7 MÉTODOS DE ESTUDO PARA MONITORAÇÃO DO MICROAMBIENTE UTERINO	49
3 MATERIAL E MÉTODO.....	53
3.1 GENERALIDADES	53
3.2 FÁRMACOS E REAGENTES	54
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	55
3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	56
3.4.1 Fase preparatória	56
3.4.1.1 Indução da ovulação inicial	57
3.4.1.2 Procedimentos pré-cirúrgicos	60
3.4.1.3 Procedimentos cirúrgicos de implantação de cateteres intra-uterinos	60
3.4.1.4 Procedimentos pós-cirúrgicos	69
3.4.1.5 Indução da ovulação final.....	69
3.4.2 Fase experimental	70

3.4.2.1 Transferência de embriões	71
3.4.2.2 Microlavagens uterinas.....	74
3.4.3 Necrópsia e Histopatologia	76
3.4.4 Análises.....	81
3.4.4.1 Variáveis relacionadas ao procedimento cirúrgico	81
3.4.4.2 Variáveis relacionadas à técnica de microlavagem uterina	82
3.4.4.3 Variáveis relacionadas aos achados de necropsia.....	83
3.4.4.4 Variáveis relacionadas aos achados histopatológicos.....	84
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	87
4.2 TÉCNICA DE MICROLAVAGEM UTERINA.....	92
4.3 ACHADOS DE NECRÓPSIA	106
4.4 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS	115
5 SUMÁRIOS DOS RESULTADOS.....	134
6 CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES	141
REFERÊNCIAS.....	143

1 INTRODUÇÃO

É crescente a demanda por proteínas de origem animal pela população humana (BRADFORD, 1999). Historicamente, os bovinos têm provido proteínas de alta qualidade e a baixo custo, na forma de leite e carne. O rebanho bovino brasileiro é composto por aproximadamente 170 milhões de cabeças de gado (ANUALPEC, 2005). Contudo observa-se uma baixa taxa de desfrute (30%), que se deve principalmente aos baixos índices de eficiência produtiva e reprodutiva da pecuária nacional.

Neste sentido, o aprimoramento tecnológico visando a melhora da produtividade do rebanho nacional, principalmente no que diz respeito ao desempenho reprodutivo, é de fundamental importância para a melhora na taxa de desfrute e conseqüentemente, para o aumento da oferta de proteína animal (SZECHY, 1995).

De fato, a biologia dos processos reprodutivos tem sido estudada e o maior entendimento de tais processos tem levado à elaboração de diversas biotecnologias como a inseminação artificial, transferência de embriões e a manipulação da função ovariana. Tais tecnologias têm sido utilizadas em todo o mundo, pois permitem maior controle da reprodução levando ao ganho genético e melhora dos índices reprodutivos em tempo mais curto.

No entanto, ainda hoje se fazem necessários estudos para o aperfeiçoamento destas tecnologias, uma vez que observam-se falhas na fertilização ou perda da gestação. A etiologia da mortalidade embrionária é multifatorial, podendo ser de causa infecciosa e não infecciosa. Segundo

Christianson (1992), as causas não infecciosas provavelmente representam 70% ou mais dos casos de morte embrionária. Esta pode ocorrer devido a fatores genéticos (aberrações cromossômicas), ambientais (alta temperatura ambiental), nutricionais e maternos (desequilíbrio hormonal e idade) (VANROOSE et al., 2000). Em geral, a morte embrionária em vacas está estimada em torno de 20 a 40% (HANSEN et al., 1999; LÓPEZ-GATIUS et al., 1996), enquanto que a fetal tem sido estimada em 5% (LAMBERT et al., 1991).

A morte embrionária precoce é definida como a que ocorre no período de manutenção do corpo lúteo (dias 15 a 19 pós-inseminação), enquanto a morte embrionária tardia ocorre até os 42 dias de gestação. Thatcher e Hansen (1992) realizaram estudos em vacas leiteiras inseminadas e estimaram que 35% dos embriões não sobreviveram até o 18º dia de prenhez. As taxas de sobrevivência do concepto diminuíram gradualmente de 93% no dia 8, para 56%, 66% e 58% nos dias 12, 16 e 42 pós-inseminação, respectivamente (DISKIN; SREENAN, 1980). Esses índices foram atribuídos a diversos fatores como retardo no desenvolvimento embrionário, anormalidades cromossômicas, anormalidades no meio ambiente uterino, mas principalmente pela incapacidade de alguns conceptos em bloquearem a luteólise, no período considerado crítico, compreendido entre os dias 15 e 19 da prenhez (THATCHER et al., 1994).

Para a manutenção da prenhez o útero deve permanecer sob influência da progesterona, requerendo a manutenção da funcionalidade do corpo lúteo. Com essa finalidade, o concepto em desenvolvimento deve alterar a fisiologia uterina inibindo os mecanismos luteolíticos que ocorrem naturalmente em animais não-prenhes. Especificamente, deve ser suprimida a produção de prostaglandina (PGF2 α). A supressão da síntese de PGF2 α pelo concepto resulta de interações

parácrinas entre as células trofoblásticas do concepto e as células epiteliais do endométrio materno. O interferon-tau (INF), uma citocina produzida na células do trofoblasto, é o principal elemento efetor desta sinalização assumindo o papel determinante no processo anti-luteolítico (BAZER et al., 1994).

A presença de moléculas produzidas tanto pelo endométrio quanto pelo concepto é requerida para o bloqueio da luteólise. A caracterização e o estudo funcional dessas moléculas são essenciais para a compreensão dos mecanismos que atuam no período crítico. De fato, estudos foram conduzidos para a caracterização de tais moléculas pela análise do fluido uterino, obtido por lavagens (Short *et al.*, 1991) ou pela análise de moléculas secretadas por tecidos ou células uterinas ou do concepto *in vitro* (Hansen *et al.*, 1999). Contudo, estes métodos não permitiram o monitoramento eficaz da dinâmica de secreção de tais moléculas, já que analisaram a presença de moléculas em um único ponto no tempo (lavagens uterinas) ou se utilizam de um modelo *in vitro*, onde a produção de moléculas passa a ser influenciada pelas condições do sistema de cultura.

Objetivou-se com o presente estudo o desenvolvimento de uma técnica para obtenção de fluido uterino em diferentes dias do ciclo estral e da prenhez inicial de modo a permitir a análise sistemática e contínua das secreções do microambiente uterino principalmente durante o período crítico. Foram propostos os seguintes objetivos específicos: (1) validar uma técnica cirúrgica de implantação de cateteres intrauterinos; (2) testar o funcionamento do cateter; (3) buscar alterações morfológicas ocorridas após a implantação dos cateteres.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão bibliográfica foi escrita abordando inicialmente aspectos referentes ao ciclo estral (conceitos gerais, modificações morfológicas do trato reprodutor feminino nas diferentes fases do ciclo estral), assim como alguns pontos fundamentais do reconhecimento materno fetal em ruminantes. A seguir foram apresentados dados com ênfase em mortalidade embrionária precoce, morfologia do útero bovino bem como os seus sistemas de defesa, caracterização do microambiente uterino em vacas cíclicas e vacas prenhez e por fim dados referentes à metodologia aplicada para a monitoração do microambiente uterino.

2.1 INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL E ATIVIDADE OVARIANA NO ÚTERO

Antoniolli (2002) descreve o ciclo estral como o ritmo funcional dos órgãos reprodutivos femininos que se estabelece a partir da puberdade. O mesmo autor compreende as modificações cíclicas na fisiologia e na morfologia dos órgãos genitais como resultante de mudanças no perfil de hormônios reprodutivos. O ciclo pode ser dividido em quatro fases, limitadas por eventos reprodutivos coordenados específicos:

Proestro: Fase que antecede o estro ou o cio, marcada por um aumento gradativo na concentração de estrógenos circulante, devido ao desenvolvimento folicular;

Estro: Caracteriza-se pela aceitação do macho, é a fase de mais fácil definição. Nesta fase as concentrações de estrógenos estão elevadas;

Metaestro: Fase de difícil caracterização. O corpo lúteo formado após a ovulação, secreta quantidade crescentes de progestágenos (P4) até atingir sua produção máxima;

Diestro: Fase de maior duração, que ocorre sob predomínio da P4. Dura cerca de 13 a 15 dias, terminando quando ocorre a regressão funcional do corpo lúteo (luteólise).

Outros autores dividem o ciclo estral em apenas duas fases: Folicular (proestro e estro) e luteínica (metaestro e diestro) (SENGER, 2003).

O período entre dois estros consecutivos é denominado como um ciclo estral, que tem intervalo médio de 21 dias em vacas. Durante um ciclo estral há normalmente a emergência de duas ou três ondas de crescimento folicular. Cada onda é caracterizada pelas fases de recrutamento, seleção, dominância e atresia. O folículo dominante da ultima onda escapa a atresia e secreta quantidades crescentes de 17β -estradiol (E_2). O E_2 induz mudanças de comportamento associadas ao estro e induz o pico de hormônio luteinizante (LH) resultando na ovulação. o folículo ovulado sofre mudanças funcionais e estruturais para dar origem ao corpo lúteo (CL). O CL desenvolve-se rapidamente, secretando quantidades crescentes de P4 e atinge seu tamanho máximo no dia 10 do ciclo estral. Por volta do dia 18 o processo de luteólise causa a regressão do CL e, conseqüentemente, queda das concentrações plasmáticas de P4. Enquanto a

atresia de folículos dominantes ocorre na presença de concentrações elevadas de P_4 , típicas do meio do ciclo, a diferenciação e o crescimento final do folículo ovulatório ocorre, apenas após luteólise, sob baixas concentrações de P_4 . Se houver fertilização do ovócito, o processo luteolítico deverá ser bloqueado. A presença de um CL funcional que garanta concentrações de P_4 na circulação é requerida para a manutenção da prenhez (BINELLI, 2000).

Sabidamente a morfologia do útero se modifica em sincronia com o ciclo estral. Várias mudanças ocorrem no endométrio de ruminantes, e estas são provocadas pelos hormônios ovarianos estradiol e P_4 . Durante a exploração retal do útero percebe-se, na fase de proestro, uma maior contratilidade com aumento da turgidez de suas paredes conseqüente a congestão vascular. Noakes (2001) relatou que um dia antes e um dia após, mas principalmente durante o estro, a camada muscular é fisiologicamente contrátil. Esta característica associada à marcada vascularização é que provê turgidez ao útero durante o exame retal. Os cornos uterinos, por sua vez, apresentaram-se eretos e em espiral. Esta contratilidade está reduzida na fase de metaestro e evolui para a ausência na fase de diestro.

No útero bovino, nos três a quatro últimos dias do diestro, ocorre regressão da mucosa, 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.

Em ruminantes, durante o estro, uma grande quantidade de fluído deposita-se nos espaços teciduais do endométrio, dando origem ao edema endometrial. A mucosa uterina revela hipertrofia e hiperplasia de grau considerável, sendo denominada esta fase de proliferação endometrial (GRUNERT; GREGORY, 1989).

No metaestro, o edema diminui e hemorragias microscópicas ocorrem na zona funcional, caracterizando o processo de metrorragia. Na vaca, a metrorragia tem início antes da ovulação e atinge um máximo durante o edema endometrial, sendo mais proeminente nas regiões centrais das carúnculas e termina abruptamente no segundo dia após o estro (PRIEDKALNS; LEISER, 1998).

Noakes (2001) relatou que entre 24 e 48 horas após o estro as carúnculas uterinas mostram hemorragias petequiais, dando origem a descarga vaginal sanguinolenta do metaestro. Nesta fase observa-se, no endométrio, a proliferação glandular (GRUNERT; GREGORY, 1989).

A atividade mitótica nos epitélios luminal, glandular e no estroma inicia-se durante o estro e continua por aproximadamente seis dias. Uma invasão de agranulócitos, essencialmente linfócitos, ocorre três a cinco dias após o estro (PRIEDKALNS; LEISER, 1998). No entanto, Veer Wielen e King (1984) não observaram uma variação significativa no número de linfócitos no endométrio durante o ciclo estral.

O aumento do número de eosinófilos ocorre do estro para o meio do ciclo, assim como o número de mastócitos durante o edema endometrial, especialmente nas regiões intercarunculares (PRIEDKALNS; LEISER, 1998).

Matsuda et al. (1983), observaram um aumento significativo do número de eosinófilos no endométrio bovino, durante o estro e o metaestro em relação a outras fases do ciclo estral.

Com o início do diestro, sob a influência da P_4 , o endométrio passa de um estágio proliferativo para um secretor, com espessamento do epitélio glandular, além de ramificação, enovelamento e secreção das glândulas (GRUNERT; GREGORY, 1989). Durante os primeiros 11 dias do diestro, a secreção glandular é grande, mas se a gestação não acontecer ocorre regressão das glândulas juntamente com a luteólise nos últimos três dias do diestro (PRIEDKALNS; LEISER, 1998).

Sundaravadanan e Venkataswamy (1973) verificaram que as modificações uterinas durante as fases folicular e lútea do ciclo estral estavam relacionadas com a espessura e vascularização do endométrio e miométrio e com o crescimento das glândulas uterinas. Wordinger e Dickey (1971) também observaram que as características histológicas do endométrio de vacas abatidas três dias após o cio foram: edema, aumento de vascularização na lâmina própria e do estroma tecidual.

Gonzales et al. (1985) observaram no endométrio de vacas normais, um epitélio com citoplasma eosinofílico homogêneo ou com vacúolos, durante as fases folicular e lútea, respectivamente. As glândulas uterinas variaram de tubulares retas a tortuosas e não mostravam evidências de alterações degenerativas e necróticas. Além disso, um infiltrado composto por linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e mastócitos encontrava-se distribuído uniformemente na lâmina própria da mucosa, com a predominância de linfócitos.

No endométrio da porção média dos cornos uterinos de novilhas bovinas, Ohtani et al. (1993) relataram vários achados, tais como, mitoses glandulares durante o proestro e estro, metrorragia e edema no estroma durante o cio e no primeiro dia do ciclo, vacuolização supranuclear no epitélio glandular entre os dias três e sete, infiltração leucocitária no epitélio superficial nos dias sete e oito e

mitoses nas células do estroma no estro e meio da fase lútea. Ao contrário das outras fases do ciclo estral, não ocorreram modificações progressivas no endométrio durante a fase lútea tardia.

As glândulas apresentam-se retas, baixas, cubóides e com pouca secreção durante o cio; à medida que aumentam as concentrações circulantes de P_4 produzida pelo corpo lúteo em desenvolvimento, elas crescem, secretam e tornam-se mais sinuosas e complexas. Estas começam a regredir quando são também notados os primeiros sinais de regressão do corpo lúteo.

Independente das modificações funcionais que se produzem na mucosa uterina, é importante assinalar aquelas que ocorrem na musculatura uterina. Durante o ciclo as células musculares variam de tamanho. O desenvolvimento máximo é alcançado no cio e nos dois dias seguintes, estando sua capacidade contrátil subordinada ao equilíbrio hormonal estrógeno- P_4 (CUPPS; ASDELL, 1944 *apud* DERIVAUX, 1980).

2.2 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO

O reconhecimento da prenhez através do conceito envolve uma comunicação bioquímica entre o conceito e a mãe capaz de bloquear a ação luteolítica e de promover a não interrupção da síntese e liberação de P_4 pelo corpo lúteo (SHOLL et al., 1983).

Pesquisas realizadas ainda na década de 60, 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 et al., 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 . (INF τ) (IMAKAWA et al., 1987).

O INF τ 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). Seu mecanismo de ação para o bloqueio da luteólise envolve a supressão na expressão dos receptores endometriais para a ocitocina (MANN et al., 1999; WATHES et al., 1998) e também a competição pelos sítios de ligação desses mesmos receptores, culminando com a inibição da síntese de prostaglandina F 2α (PGF 2α) (DEMMERS 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 PGF 2α a menos que o conceito envie sinais anti-luteolíticos apropriados para bloquear a produção da PGF 2α . Entretanto, a programação para a 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.

Outro fator importante no reconhecimento materno fetal segundo Siteri e Stites (1982) é a P $_4$ que suprime uma resposta imune materna em resposta aos antígenos fetais e gera condições especiais para o desenvolvimento do conceito. 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 et al., 1986).

Avaliando a resposta luteolítica de vacas ovariectomizadas tratadas com duas dosagens diferentes de P_4 , Mann e Lamming (1995) observaram que os animais com baixa concentração plasmática de P_4 desenvolveram sinal luteolítico mais forte, expresso pela maior concentração do principal metabólito da $PGF2\alpha$. 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 $INF\tau$, no lavado uterino, inferior àquela de fêmeas cujos embriões eram bem desenvolvidos. Embriões subdesenvolvidos não alongados suficientemente são menos capazes de bloquear a luteólise e apresentam menores chances de sobrevivência embrionária.

Portanto, a despeito dos vários fatores que podem reduzir o reconhecimento materno fetal, o adequado preparo do útero pela P_4 é de grande 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 PRECOCE

A perda de prenhez é 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 limitador que contribui para dilatar os intervalos entre partos (HANK, 1979). Reportaram-se em alguns estudos que em fêmeas bovinas a mortalidade embrionária é responsável em grande parte 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 sobrevivem até o 18º dia de prenhez.

Trabalhando com novilhas genitalmente normais, Diskin e Sreenan (1980) 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 e Dunne et al. (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 de origem não infecciosa para Christianson (1992) reputa em 70% da mortalidade total. O momento da perda da zona pelúcia pelo embrião entre os dias 8 e 9 após a fertilização (WRATHALL; SUTMOLLER, 1998) é um momento de grande susceptibilidade aos agentes infecciosos, herpesvirus (BHV-1) e o vírus da diarreia bovina (BVDV) pode provocar a morte embrionária antes do 14º dia do ciclo estral (KUNZ et al., 2002).

O estresse térmico foi responsabilizado por mortalidade embrionária de até 42,7% (CARTMILL et al., 2001). A influência do estado nutricional da vaca para López-Gatius et al. (2002) e Silke et al. (2002) representaram perdas significativas de prenhez quando houve diminuição do escore de condição corporal.

Outro fator importante que leva à mortalidade embrionária é a endometrite (inflamação do endométrio) (LEBLANC et al., 2002). O útero normal é um ambiente estéril, ao contrário da vagina que abriga microorganismos. As vezes, patógenos oportunistas da flora vaginal normal ou do ambiente podem invadí-lo. Tais oportunidades ocorrem, sobretudo, mas não exclusivamente durante o parto, inseminação artificial e transferência de embriões (LEBLANC et al., 2002), podendo levar à endometrite crônica ou sub-aguda, afetando negativamente a fertilidade.

A mortalidade embrionária produz um significativo impacto na fertilidade dos rebanhos. As causas infecciosas são freqüentemente superestimadas, mas certamente são importantes em situações epidêmicas. Os agentes infecciosos podem levar à morte embrionária por causarem alterações no endométrio e oviduto, por efeitos diretos no embrião ou por efeitos sistêmicos, como hipertermia e luteólise. As causas não infecciosas são mais comuns em situações endêmicas, e devido ao caráter multifatorial, e é difícil de se estabelecer um diagnóstico

correto. Entretanto, o entendimento da interação entre o embrião e os patógenos é de grande importância para o diagnóstico das causas de morte embrionária e para a determinação da fase da gestação na qual esta ocorre, para que se possam desenvolver medidas para prevenir esses acontecimentos (KUNZ et al., 2002).

Assim, conhecendo-se os reflexos econômicos da mortalidade embrionária na agropecuária mundial é de grande importância que se realizem estudos que possam vir a elucidar o microambiente uterino neste período de interesse, objetivando assim a diminuição da mortalidade embrionária precoce.

2.4 MORFOLOGIA DO ÚTERO BOVINO

O útero é composto de dois cornos uterinos, um corpo e uma cérvix (Figura 1). É do tipo bipartido na vaca, apresenta um septo que separa os dois cornos e um proeminente corpo uterino. O útero apresenta uma série de funções. O endométrio e seus fluídos tem grande relevância no processo reprodutivo: transporte dos espermatozóides do ponto de ejaculação até a junção útero-tubárica, regulação da função do corpo lúteo, reconhecimento do embrião, implantação, gestação e parto. (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Dyce et al. (1990) e Nickel (1979) citaram que o útero bovino, a primeira impressão, parece consistir um corpo relativamente longo, sucedido de dois cornos divergentes, cada qual enrolado sobre si mesmo. Mas a maior parte do corpo é formada por uma fusão incompleta das partes caudais dos cornos que se situam lado a lado. Fechado dentro de envoltórios musculares e serosos. O arranjo

verdadeiro é revelado por um sulco dorsal, que se torna mais pronunciado em direção a bifurcação. Quando os cornos divergem, os tecidos superficiais unem o espaço entre eles, formando os ligamentos intercornuais dorsal e ventral, que limitam um saco pequeno e se abrem cranialmente. O corpo verdadeiro é muito curto, com cerca de 3 a 4 cm, já os cornos, portanto, são realmente mais extensos do que parecem externamente e possuem um comprimento de 18 a 40cm. Os cornos afunilam-se gradativamente no sentido caudo cranial, de modo que a junção com as tubas não é repentina, como na égua (POLDING E LALL 1945; SISSON, 1986).

Fonte: <http://www.lutalyse.com/Health.asp?country=US&lang=EN&species=BF&drug=LT&index=195&parentID=0>

Figura 1 - Desenho da vista cranial do trato genital da fêmea bovina. Notar em (1) cérvix; (2) corpo do útero; (3) cornos uterinos; (4) oviduto; (5) ovário; (6) mesovário; (7) corpo lúteo; (8) ligamento intercornual; (9) reto.

A parede uterina é dividida em três regiões diferentes: a mucosa ou endométrio, a muscular ou miométrio, e a serosa ou perimétrio. O endométrio é constituído por duas zonas que diferem em estrutura e função. A camada mais superficial chamada de zona funcional degenera-se parcialmente ou totalmente após a gestação ou estro. A camada mais profunda, denominada de zona basal, permanece intacta após esses eventos (PRIEDKALNS; LEISER, 1998). A zona funcional é tradicionalmente dividida em dois estratos, o compacto e o esponjoso baseado na aparência morfológica que esses estratos apresentam durante o ciclo estral.

O epitélio de superfície da zona funcional, ou luminal, é pseudo-estratificado e/ou colunar simples em ruminantes, podendo ser, em áreas isoladas, cúbico simples (BANKS, 1992; DELLMANN; BROWN, 1982; PRIEDKALNS; LEISER, 1998).

Os bordos apicais das células colunares possuem numerosas especializações digitiformes da membrana plasmática, as microvilosidades, estas variam a altura de acordo com a atividade secretora do epitélio, apresentando-se mais longas na fase lútea em relação à fase folicular (STINSON et al., 1962). O tecido sub-epitelial da região mais superficial da zona funcional (estrato compacto) consiste de tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado com muitos fibrócitos, macrófagos e mastócitos, mas neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos também podem ser encontrados. A região mais profunda (estrato esponjoso) dessa zona consiste também de tecido conjuntivo frouxo, sendo este menos celularizado.

Em todo o endométrio estão presentes glândulas uterinas tubulares simples, enoveladas e ramificadas (PRIEDKALNS; LEISER, 1998). As glândulas estão

distribuídas por todo o endométrio, exceto nas carúnculas, sendo maior seu número nos cornos uterinos em relação ao corpo.

O epitélio glandular é similar ao luminal, exceto pela presença de cílios na superfície livre de muitas células colunares (STINSON et al., 1962).

Sisson (1986) apresentou como característica do endométrio de vacas a presença de carúnculas uterinas. As carúnculas são espessamentos circunscritos da lâmina própria, ricas em fibroblastos e com extenso suprimento sangüíneo, em número de aproximadamente 100, que estão irregularmente distribuídas sobre a superfície ou dispostas em aproximadamente quatro fileiras com 15 carúnculas em cada corno uterino (DELLMANN; BROWN, 1982; PRIEDKALNS; LEISER, 1998). No útero não gravídico as carúnculas medem aproximadamente 15 mm de comprimento e um pouco menos na largura e espessura. Durante a gravidez tornam-se muito aumentados e pedunculados (ao redor de 10 a 12 cm de comprimento). A face profunda possui um hilo no qual os vasos penetram. O restante da superfície tem uma aparência esponjosa, devido às numerosas criptas que recebem as vilosidades coriônicas. Em relação ao miométrio este é formado por uma espessa camada circular interna e uma camada longitudinal externa de células musculares lisas que aumentam em número e tamanho durante a gestação (SISSON, 1986). Entre as duas camadas ou profundamente na camada interna, há uma zona vascular constituída de artérias, veias e vasos linfáticos, o estrato vascular (BANKS, 1992; DELLMANN; BROWN, 1982).

A terceira camada do útero, o perimétrio ou serosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo coberto por mesotélio peritoneal, possui numerosos vasos sanguíneos, linfáticos e fibras nervosas (BANKS, 1992; DELLMANN; BROWN, 1982; PRIEDKALNS; LEISER, 1998).

A cérvix atua como uma válvula para separar a luz uterina da vagina, sendo bem desenvolvida na vaca. As células de revestimento da cérvix são intensamente glandulares, sua atividade secretora varia com os estágios do ciclo estral e da prenhez. Um muco claro é secretado durante o estro e um selo cervical espesso é produzido durante a gestação. O epitélio do canal cervical da vaca é composto principalmente por células semelhantes às caliciformes. A lâmina própria-submucosa varia de tecido conjuntivo frouxo a tecido conjuntivo denso durante os vários estágios do ciclo estral. A camada muscular é bem desenvolvida e rica em fibras elásticas (BANKS, 1992).

2.5 CARACTERIZAÇÃO DO MICRO AMBIENTE UTERINO

O bom desenvolvimento do embrião no início da prenhez depende do ambiente uterino. No início da prenhez a sinalização local dos blastocistos modifica o ambiente uterino e induz a secreção de proteínas específicas pelo epitélio uterino (MCCRACKEN, 1984). Estudos sobre as interações materno-fetais no início da gestação são de grande importância. Moléculas de origem endometrial ou do conceito são liberadas neste microambiente e interagem paracrinamente com ambos os tecidos.

A composição do ambiente uterino é controlada por diferentes hormônios ao longo do ciclo estral. As altas concentrações plasmáticas do hormônio estrógeno na fase de estro e da P_4 na fase de diestro descritas por Hansel e McEntee (1977) modulam a quantidade e a composição das secreções uterinas durante o ciclo

estral. A produção de fluídos uterinos é máxima durante o cio ou pouco antes dele (OLDS, 1957; IRITANI et al., 1969; SCHULTZ et al., 1971; WALES et al., 1971).

Embora a maioria das proteínas do útero bovino tenha caráter ácido, muitas proteínas com caráter neutro à básico foram descritas no 17º dia no útero de vacas prenhes (BARTOL et al., 1985; GARRET et al., 1988; GROSS et al., 1988). Uma delas, apresentando 14kDa e ponto isoelétrico de 7,2 foi descoberta na análise de explantes endometriais de vacas prenhes em início de gestação (dia 5) e teve sua concentração aumentada entre os dias 5 e 14 da gestação (GARRET et al., 1988). Essa proteína continua a ser secretada por explantes endometriais obtidos no dia 17 de vacas prenhes. Além disso, sua secreção não foi detectada em vacas vazias, mas pode ser estimulada quando seus explantes endometriais foram tratados com proteínas secretadas pelo concepto bovino (GROSS et al., 1988).

Comparado com vacas cíclicas, os tecidos endometriais de vacas prenhes a partir do 25º dia pós-estro apresentaram maior atividade de enzimas lisossomais com atividade fosfatase ácida. A concentração de enzimas lisossomal (catepsina) no endométrio uterino aumenta drasticamente em vacas entre os dias 50 e 70 da gestação.

Recentemente foram realizados estudos referentes à composição de proteínas contidas no fluído uterino. Alavi-Shoushtari, Asri-Rezai e Abshenas (2006) colheram líquido luminal do útero de vacas após o abate e investigaram a composição das proteínas em diferentes estágios do ciclo estral. No geral a concentração de proteínas séricas encontradas no fluído uterino equivale a mais de 98% e apenas cerca de 2% relacionadas especificamente ao útero. As concentrações relativas das albuminas séricas variaram ao longo das fases do ciclo estral estudadas.

Kayser et al. (2006) estudaram as mudanças no perfil protéico uterino em marrãs abatidas nos dias 10 a 13 do ciclo estral e da prenhez. No abate realizou-se lavagem uterina com 20mL de meio essencial mínimo (MEM) em cada corno uterino para posterior análise da composição de proteínas pela técnica de eletroforese bidimensional e espectrofotômetria de massa. Com o emprego dessas tecnologias e a capacidade de comparar as bandas entre os géis os autores identificaram algumas proteínas já descritas, como as uteroferrinas proteínas de ligação do retinol, proteínas de ligação folato, transferrina, albumina sérica, proteases e inibidores de proteases. Além disso, os autores confirmaram que as concentrações das principais proteínas presentes no ambiente uterino ocorrem independentemente da presença do concepto.

Benendt et al. (2005) investigaram as alterações induzidas pelo embrião na expressão proteômica do endométrio bovino no período de pré-implantação (dia 18). Para este estudo foram utilizados vacas gêmeas homozigóticas e as proteínas foram extraídas do tecido endometrial de vacas prenhes e vacas vazias no dia 18 após o estro. As proteínas contidas no tecido endometrial foram analisadas pela técnica de eletroforese bi-dimensional utilizando um *software* específico, os autores identificaram quatro proteínas cuja expressão aumentou no mínimo duas vezes em vacas prenhes. As proteínas encontradas foram: inibidor da dissolução do ganisil i-fosfato Ro-beta que inibe a troca de GDP por GTP, sendo um mediador importante na implantação de embriões humanos e similar na reprodução bovina. A proteína hidroxisteróide-20-alfa-desidrogenase que esta associada ao mecanismo de PGF2 α no endométrio bovino (ref), e a isocitrato-1-desidrogenase , uma enzima do ciclo de Krebs em dependência do ciclo sexual do endométrio humano com uma maior concentração na fase secretória (pré-implantação). E por fim a proteína

ligante acil-coenzima-A, que esta envolvida com transporte de colesterol do citoplasma para o citoplasma mitocondrial, onde existe conversão de colesterol à pregnenolona pela quebra da cadeia lateral P450. A pregnenolona é o precursor de cadeias de hormônios esteróides como a P₄. De fato, foi demonstrado que células binucleadas presentes no endométrio de vacas prenhes tem a capacidade de sintetizar P₄ (WOODING, 1992). Embora a quantidade e o tipo de proteínas secretadas pelo útero grávido sejam diferentes das do útero não-grávido, ainda são limitadas as informações sobre as mudanças nas suas concentrações relativas ao longo do ciclo estral ou gestação inicial.

2.6 MECANISMOS UTERINOS DE DEFESA: CONSIDERAÇÕES GERAIS

O mecanismo de defesa do útero envolve uma interação entre componentes da resposta imunológica celular e humoral, além da atuação do mecanismo físico, tendo este sido relatado como a mais importante forma de combate às infecções (GALINDO et al., 2003).

Para Bordin (2000), uma linha de defesa no qual o útero normal, no período pós-parto, utiliza para controlar rapidamente as infecções é: o aumento do afluxo sangüíneo, a infiltração de leucócitos e o relaxamento da cérvix. Evidentemente que estas barreiras apenas serão suficientes quando a patogenicidade do agente agressor não for severa.

Segundo Hussain e Daniel (1992) a defesa inicial do útero contra infecções bacterianas é a fagocitose de bactérias pelos leucócitos uterinos, principalmente os

neutrófilos, os quais exercem um papel crucial na defesa antibacteriana, impedindo o estabelecimento de infecções no período pós-parto. Aqueles autores acrescentam ainda que, em casos de complicações no parto, tais como retenção dos envoltórios fetais e cesariana, a fagocitose uterina pelos leucócitos pode estar suprimida, sendo adiada por quatro a cinco, ou até vinte dias. Outro fator negativo importante é o uso de infusões de antibióticos ou outras substâncias, que podem funcionar como inibidores da resposta uterina às agressões microbianas (BORDIN, 2000).

O mecanismo celular é representado principalmente pela ação de células polimorfonucleares (PMNs). A presença dessas células é a característica mais importante num processo inflamatório agudo, constituindo a primeira linha de defesa do organismo. Com o aumento da permeabilidade vascular decorrido do processo inflamatório, ocorre a saída do fluído vascular que reduz a pressão osmótica dos vasos. Este fato impulsiona as células brancas de defesa para a periferia do endotélio (GALINDO et al., 2003). A partir dessa posição, as células podem migrar para os tecidos. A migração é composta cronologicamente por marginação vascular, adesão à superfície endotelial e diapedese, que representa a transposição da parede capilar e a mobilização dos neutrófilos para o local da lesão. A migração dos neutrófilos (PMNs) é direcionada pela quimiotaxia, locomoção orientada por um gradiente químico (TIZARD, 1985).

Os neutrófilos presentes no tecido atuam, na maior parte, englobando os agentes invasores pelo processo de fagocitose. A seguir, o antígeno é decomposto e liberado em grânulos presentes no citoplasma dos neutrófilos e seus subprodutos são apresentados a um tipo especial de leucócito responsável pelo reconhecimento e pela intensificação da resposta imunológica, o linfócito T4, que

produz e libera moléculas que funcionam como mediadores químicos, estimulando linfócitos B, T8 e macrófagos em repouso (SONCINI, 1988).

Kaneko et al. (1997) analisaram o percentual de células polimorfonucleares (neutrófilos) e células mononucleares (linfócitos) presentes no fluido uterino de vacas com retenção dos envoltórios fetais e com puerpério normal, verificando que houve aumento significativo na taxa de neutrófilos, 30 dias após o parto, nas vacas com retenção dos envoltórios fetais comparadas às do grupo controle, sendo que aos 60 dias pós-parto estes valores não tiveram diferença significativa.

O aumento fisiológico no número de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) no lúmen uterino, em fase precoce do puerpério, tem sido demonstrado por muitos autores, mas pouco é o conhecimento sobre a regulação da migração e suas propriedades funcionais. O útero, portanto, parece ser altamente capaz de responder a uma infecção com liberação de mediadores quimiotáticos, resultando em uma rápida migração dos neutrófilos no lúmen uterino (BARROS, 1997). Produtos bactericidas específicos, além de vários mediadores inflamatórios, também são considerados fatores quimiotáticos para os neutrófilos.

Morrow (1969) estudou vacas 48 horas após o parto normal e notou um acúmulo significativo de leucócitos no lúmen uterino devido ao aumento de microorganismos contaminantes. Para tanto, a limpeza do útero só começou depois do processo de involução uterina.

Bouters (1983), Romanikowa (1984), Frank et al. (1983), Veeplassche (1976) e Veeplassche (1984) relataram que células inflamatórias polimorfonucleares, monócitos sangüíneos e macrófagos teciduais são considerados células fagocitárias na defesa celular contra microorganismos patogênicos. O processo de fagocitose envolve a quimiotaxia, aderência e aglomerações de células PMNs

aderidas na superfície de antígenos presentes antes da ingestão e digestão fagocitária.

Em experimentos realizados com a indução de infecção uterina, foi constatado por Butt et al. (1991) e Watson et al. (1990) que houve um aumento da população de polimorfonucleares (PMNs) devido ao processo infeccioso.

Segundo Holt et al. (1989) os neutrófilos são as primeiras células que migram para a área de infecção e os linfócitos aparecem mais tarde, sendo que a presença destes é um indicativo de condição crônica. Este fato pode ser confirmado pelo trabalho realizado por Martins et al. (2002), onde realizaram biopsias endometriais em 29 vacas com problemas de fertilidade. Estes autores notaram através dos achados histopatológicos inflamatórios e degenerativos associados, a presença de inflamação de grau leve (endométrio com infiltrado mononuclear discreto focal ou difuso e fibrose periglandular discreta) grau moderado em 41,4% (endométrio exibindo alterações mais severas que o grupo anterior, tais como infiltrado mononuclear moderado e fibrose moderada) e grau acentuado 13,79% (alterações endometriais mais graves, tais como: infiltrações mononucleares moderadas e fibrose periglandular severa).

Flutuações nas concentrações de hormônios esteróides circulantes nos vasos durante o ciclo estral podem influenciar na atividade leucocitária. Por exemplo, altas concentrações de P_4 inibem a atividade fagocitária dos neutrófilos nos vasos e no útero (VEEPLASSCHE, 1984).

O mecanismo humoral da resposta imune contribui na defesa uterina através das imunoglobulinas (Ig). No início do processo inflamatório, a permeabilidade do endotélio da circulação local está alterada, permitindo a saída de fluidos do sistema vascular para os tecidos e cavidades. As imunoglobulinas são anticorpos

produzidos a partir de determinados antígenos (SONCINI, 1988). Concentrações de imunoglobulina nas secreções uterinas refletem de forma semelhante à extensão do processo inflamatório endometrial em virtude do desafio microbiano e sua possibilidade de recuperação clínica (AKNAZAROV, 1988). Imunoglobulinas têm sido encontradas nas secreções uterinas de bovinos e seu papel de proteção contra patógenos foram amplamente reportados (CURTAIN et al., 1971; DHALIWAL et al., 1996a, 1996b; DUNCAN et al., 1972; WHITMORE; ARCHBALD, 1977).

Como mecanismo de defesa, a remoção física do fluido e partículas do útero tem papel muito importante. No pós-parto observa-se uma rápida redução no tamanho do útero, em consequência da vasoconstrição e das contrações miométriais, continuando até 40-50 dias, quando se aproxima do tamanho anterior à gestação. A máxima frequência de contrações coincide com a primeira onda de crescimento folicular que acontece entre o 10º e 14º dia pós-parto (HUSSAIN; DANIEL, 1991).

A manutenção das contrações uterinas após a expulsão fetal favorece a eliminação do conteúdo, reduzindo a proliferação de microrganismos inespecíficos, pois nesta fase poderá ocorrer endometrite e consequentemente o comprometimento da fertilidade desta fêmea (OLIVEIRA FILHO, 1996).

As endometrites bacterianas são das causas mais comuns de infertilidade na vaca, causando graves prejuízos econômicos porque atrasam a involução uterina, prolongam o intervalo parto-cio, aumentam o número de serviços por concepção e, conseqüentemente, o intervalo entre partos.

Boss e Ahlers (1994) descobriram *post mortem* indicativos de endometrite aguda e crônica, causadas por corpo estranho (isqueiro de cigarro) encontrado

dentro do útero. A mucosa uterina estava coberta por secreções mucopurulenta. Corpos lúteos estavam regredidos e a ausência de folículos terciários indicou irregularidades no ciclo estral.

Klund (1977) relatou quatro casos de inseminações artificiais (IA) em vacas, nos quais foi depositada a palheta de inseminação no corno uterino após o procedimento. Em dois casos não foi encontrado bezerros após o abate. Nas outras duas vacas foram realizadas laparotomias no dia 14 após a inseminação. Em um animal foi constatada a ausência da palheta, isso devido provavelmente às contrações uterinas, que podem tê-las empurrada para fora do útero. Já no outro animal a palheta foi encontrada embutida no endométrio e o animal teve gestação confirmada.

2.7 MÉTODOS DE ESTUDO PARA MONITORAÇÃO DO MICROAMBIENTE UTERINO

Com o objetivo de encontrar proteínas que possam estar envolvidas no processo de comunicação materno-fetal, uma vez que o mesmo ainda não é totalmente compreendido, foram caracterizadas moléculas secretadas tanto pelo endométrio quanto pelo concepto. Tal caracterização é geralmente alcançada pela análise do fluído uterino, obtido por diferentes técnicas.

Alavi-Shoushtari, Asri-Rezai e Abshenas (2006) analisaram as proteínas contidas no tecido uterino *post mortem* através da técnica de curetagem. Cento e quinze vacas foram abatidas em diferentes dias do ciclo estral e os tratos genitais

foram obtidos. Para a determinação da fase do ciclo estral foram examinados estruturas presentes no ovário e tonicidade do útero. As proteínas contidas nos fluídos uterinos foram analisados pela técnica de eletroforese em géis de agarose.

Knickerbocker et al. (1986) analisaram proteínas secretadas pelo concepto nos dias 16 e 18 responsáveis na extensão da função do corpo lúteo. Para tal experimento foram realizadas cirurgias no dia 10 do ciclo estral. Utilizando a técnica de laparotomia na região ventral, o útero e o ovário foram exteriorizados e a localização do CL foi verificada. Um cateter estéril foi inserido via incisão no istmo do oviduto e fixado a 30-50mm dentro da porção anterior do lúmen uterino ipsolateral ao CL. O cateter foi exteriorizado através de uma punção no flanco do animal e acondicionado em um tubo plástico embebido com solução degermante. Esta técnica permitiu a administração intra-uterina de proteínas secretadas por concepto bovino em vacas cíclicas. Observou o aumento no tempo de funcionamento do CL e intervalo entre estros, nas vacas tratadas em relação às vacas controle que receberam infusão de albumina bovina. Com este estudo pode-se comprovar que as proteínas secretadas pelo concepto sinalizaram o estabelecimento da gestação em vacas nas primeiras 2 – 3 semanas pós-estro.

Uma outra técnica cirúrgica de canulação foi descrita por Killian et al. (1992), onde foram canulados 23 vacas com objetivo de se compreender a composição e a função do fluido obtido de diferentes regiões do oviduto (ampola e istmo). O procedimento consistiu de uma técnica de laparotomia com incisão na região da tuberosidade do coxal paralela a musculatura do membro pélvico para facilitar a exteriorização do órgão. A junção útero-oviduto e a porção final do infundíbulo foram ligadas. O cateter foi inserido no lúmen do oviduto para coleta de fluídos. O autor descreveu que o fluído do oviduto coletado *in vivo* via cateter intra-luminal

continha moléculas que alcançaram o lúmen do oviduto por transudação seletiva do soro (LEESE, 1988) que não estão presentes em meios condicionados produzidos por cultura. A técnica adotada permitiu a compreensão do ambiente intra-luminal de ovidutos e seus efeitos na função de gametas, fertilização e desenvolvimento embrionário.

Apesar de alguns trabalhos apresentarem metodologias diferentes para obtenção de proteínas uterinas ou estudo do ambiente uterino, estes métodos não permitem o monitoramento eficaz da dinâmica de secreção de tais moléculas, já que analisam a presença das mesmas em um único ponto no tempo (lavagens uterinas); ou utilizam-se de um modelo *in vitro*, onde a produção de moléculas passa a ser influenciada pelas condições do sistema de cultura.

MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

O Material e Método compreendeu generalidades (número de animais utilizados, alimentação administrada e local onde foram realizados os experimentos), fármacos e reagentes, delineamento experimental, procedimentos experimentais (fase preparatória e fase experimental) e por fim análises.

3.1 GENERALIDADES

O experimento foi desenvolvido na cidade de Pirassununga, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, nas dependências do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) e no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM). O experimento teve início dia 06 de julho e foi finalizado no dia 30 de novembro de 2005.

Foram utilizada vacas secas da raça Holandesa preto e branco, adultas e com escore corporal igual ou superior a 3 (escala de 0 a 5; WILDMAN et al., 1982). Os animais foram mantidos em baias e piquetes de *Brachiaria* sp e receberam suplementação de cana de açúcar, concentrado, sal mineral e água.

3.2 FÁRMACOS E REAGENTES

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

- Biocid® (antisséptico, 2,6% de iodo). Frasco com 1000mL, Laboratório Pfizer Ltda, Guarulhos São Paulo –SP.
- Cloridrato de lidocaína (anestésico, cloridrato de lidocaína 2%®). Frasco com 100mL, Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacêutico, São Paulo-SP.
- Equipalazone® (Associação de antiinflamatório, analgésico e antipirético, 200mg de Fenilbutazona). Frasco com 100mL, Marcolab, Duque de Caxias-RJ.
- Factal pó® (Associação antiséptica, Fenitrothion 4g, violeta de genciana 1g, essência de citronela 0,4g). Frasco com 200g, Minerthal Farmacologic Industria e Comércio Ltda, Jacarei – SP.
- Minoxel® (antibiótico, Ceftiofur Sódico 4g). Frasco com 100mL, Lapisa e Formil química Ltda, Jandira – SP.
- PGF2α (Cloprostenol Sódico® 265mc/mL). Frasco com 2mL, Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacêutico, São Paulo - SP.
- Ringer® (Solução fisiológica, Cloreto de sódio 0,860g, Cloreto de potássio 0,030g, Cloreto de cálcio 2H₂O 0,033g, Água para injeção q.s.p. 100mL). Frasco com 500mL, Fresenius Kabi Brasil Ltda, Campinas - SP.
- Riodeine tópico® (antiséptico, Iodo ativo 1%). Frasco de 1000mL, Indústria farmacêutica Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto – SP.
- Septipen Plus® (Associação antibiótica, Benzilpenicilina benzantina

3000.000UI, Benzilpenicilina potássica-1500.000UI, Benzilpenicilina procaína 1500.000UI, Sulfato de estreptomicina - 2,5g, Diclofenaco Sódico-225mg). Frasco com 20mL, Vallée, Montes Claros-MG.

- Tecsclor® (Antisséptico tópico para lavagem de materiais, Dioxido de cloro 5%). Frasco com 1000mL. Serquimico Ltda, São Paulo - SP.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

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. Estes procedimentos estão ilustrados esquematicamente na figura 2 e foram descritos detalhadamente a seguir. O experimento dividiu-se em duas fases: fase preparatória e fase experimental. Na fase preparatória foram realizados procedimentos de indução das ovulações inicial e final, procedimentos pré-cirúrgicos, cirúrgicos e pós-cirúrgicos. Na fase experimental foram realizados os seguintes procedimentos: transferência de embriões, microlavagem uterina, abate, análise macroscópica do aparelho reprodutor feminino e obtenção de tecidos para análise histopatológica.

Figura 2 - 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)

3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os procedimentos experimentais foram divididos em duas fases: Fase preparatória e Fase experimental.

3.4.1 Fase preparatória

Durante a fase preparatória foram realizadas as seguintes atividades: indução da ovulação inicial, procedimentos pré-cirúrgicos, procedimentos cirúrgicos de implantação de cateteres intra-uterinos, procedimentos pós-cirúrgicos e indução da ovulação final.

3.4.1.1 Indução da ovulação inicial

No início do experimento examinaram-se os órgãos genitais internos por palpação retal e ultrassonografia transretal (aparelho Aloka[®], modelo SSD 500 equipado com transdutor linear de 7,5 MHz ou aparelho Pie Medical[®], modelo Scanner 480 equipado com transdutor linear 5 MHz) para avaliação morfo-funcional dos ovários e útero (Figura 3 A). Nove vacas foram selecionadas de acordo com o tamanho dos cornos uterinos (superior a 10cm de comprimento) e condição ovariana classificada com escore 1 (portadoras de corpo lúteo) (MADUREIRA et al., 2004) e, portanto, consideradas cíclicas.

Para a indução do estro os animais receberam uma injeção intramuscular contendo 530µg de cloprostenol sódico (Figura 3 B). Procedeu-se a observação do estro por 30 min, duas vezes ao dia (07:00 e 17:30 h). As vacas que apresentaram sintomas de estro foram selecionadas para o experimento (Figuras 4 C, D). O dia do estro foi considerado o dia zero da fase preparatória.

Figura 3 - Procedimentos de indução do estro relacionado à fase preparatória (Fotografias A e B)

- A) Exame ginecológico de avaliação morfo-funcional dos ovários e do útero por palpação e ultra-sonografia transretal.
- B) Indução do estro através de injeção intramuscular de Cloprostenol sódico.

Figura 4 - Procedimentos de indução do estro relacionado à fase preparatória (Fotografias C e D)

- C) Animais exibindo comportamento de estro (aceitação da monta).
- D) Detalhe do períneo da vaca que aceitou monta após a indução do estro. Notar corrimento do muco cristalino (seta) do trato reprodutor da fêmea.

3.4.1.2 Procedimentos pré-cirúrgicos

Para a realização da cirurgia, foi necessária a utilização de uma terapia profilática com o uso de antibiótico e antiinflamatório sistêmico. Para tanto, a utilização de medicamentos antes do procedimento cirúrgico teve com objetivo diminuir a ocorrência de infecção em resposta do procedimento cirúrgico. Tal prática é importante em animais de grande porte, quando a cirurgia não é realizada em centro cirúrgico.

No dia 1 da fase preparatória, 24 horas antes do procedimento cirúrgico, foi iniciada antibioticoterapia com 2 frascos de Septipen plus[®], via intramuscular. Foram utilizados também 20ml de antiinflamatório, analgésico e anti-pirético da marca Equipalazone[®], via endovenosa.

3.4.1.3 Procedimentos cirúrgicos de implantação de cateteres intra-uterinos

Os procedimentos cirúrgicos para a implantação de cateteres intrauterinos tiveram como objetivo desenvolver uma técnica para obtenção de fluidos uterinos em vacas cíclicas e vacas prenhes. As vacas utilizadas na cirurgia foram apartadas do rebanho após a observação do estro e levadas para o curral, onde permaneceram em jejum alimentar e hídrico por no mínimo 12 horas antes da cirurgia.

A cirurgia foi realizada sempre no dia 2 da fase preparatória. Os animais foram contidos em tronco de contenção previamente lavado com jatos de água contendo Tecsia Clor® para uma anti-sepsia do local.

No antímero direito, região da prega do flanco, 5cm ventral à região da tuberosidade do coxal, realizou-se a tricotomia e posterior anti-sepsia com solução de iodopovidona e álcool iodado (Figuras 5 A,B). Foi introduzida em dois pontos cruentos uma agulha 40X12mm. Com auxílio de uma dosadora automática tipo pistola (Hoppner®) injetou-se cloridrato de lidocaína (100 ml) sendo a agulha retirada e introduzida a fim de atingir planos mais profundos (Figura 5 C). Em associação com anestésico local infiltrativo, realizou-se a anestesia epidural (cloridrato de lidocaína; 5 ml) (MASSONE, 2003) (Figura 5 D).

O cirurgião e o auxiliar realizaram a higienização seqüenciada das mãos e dos antebraços com água corrente e sabão. Após a escovação e enxágüe das mãos e antebraço, utilizou-se solução degermante (iodo 2%) sobre as mãos e enxágüe com solução de álcool iodado (Figura 5 E) (TURNER; MCILWRAITH, 2002). Utilizou-se pijama cirúrgico, avental e luvas estéreis (Figura 5 F).

Os instrumentos cirúrgicos foram previamente esterilizados e a mesa instrumental foi montada de acordo com a técnica citada por Vargas e Porcides (1998).

Figura 5 - Procedimentos cirúrgicos de implantação de cateteres intra-uterinos
(Fotografias de A à F)

- A) Procedimento de tricotomia realizado na região da tuberosidade do coxal.
- B) Procedimento de anti-sepsia na região da tuberosidade do coxal após a tricotomia, utilizando solução degermante.
- C) Anestesia local infiltrativa. Notar a região da tuberosidade do coxal (---), local de administração do anestésico (seta), pistola de aplicação de medicamentos (P).
- D) Anestesia epidural. Anestésico depositado ao redor da duramater no espaço vertebral Co1-Co2.
- E) Procedimento de higienização das mãos e antebraços com água corrente e sabão. Notar escovação das mãos para posterior enxágue e utilização de solução degermante e álcool idado.
- F) Procedimento de paramentação do cirurgião com a utilização do avental e luvas estéreis.

No local de analgesia (região da prega do flanco) foi realizada uma incisão vertical estendendo-se 10 a 15 cm ventralmente ao processo transverso da vértebra lombar. Para acesso à cavidade pélvica foi necessário realizar incisões sequenciais na pele, no músculo oblíquo abdominal externo, no músculo oblíquo abdominal interno, no músculo abdominal transverso e por fim no peritônio (Figura 6 G). A identificação do útero foi feita por palpação e os cornos uterinos foram exteriorizados (Figura 6 H). Com o auxílio de uma haste perfurante de aço inox (HpBio[®]) de 15cm de comprimento, a extremidade balonete (comprimento: 35mm; diâmetro externo: 8,2mm; diâmetro interno 7,2mm; 88 furos de 0,7mm) de cateteres de silicone (HpBio[®], grau médico, comprimento: 150cm; diâmetro externo: 2,5mm; diâmetro interno: 1,2mm), foi alojada no lúmen do terço cranial, próximo à junção útero-oviduto de cada corno uterino (Figuras 6 I, J, K). Os cateteres foram fixados na serosa do útero com o auxílio de anguladores de silicone de baixo perfil (HpBio[®]) (Figura 6 L).

Figura 6 - Procedimentos cirúrgicos de implantação de cateteres intra-uterinos (Fotografias de G à L)

- G) Procedimento cirúrgico. Evidenciar panos de campo posicionados sobre o animal (★) para proteção do campo cirúrgico. Na região da prega do flanco foi realizada a incisão para acesso à cavidade abdominal (seta).
- H) Exteriorização do útero para a implantação dos cateteres no lúmen (terço cranial) dos cornos uterinos. Notar corno uterino direito (Dir) e corno uterino esquerdo (Esq).
- I) Implantação do cateter no corno uterino direito. Notar (seta) a haste perfurante de aço inox (HpBio[®]) acoplada à extremidade o cateter de silicone (Ct) sendo projetado para o lúmen dos cornos uterinos (terço cranial) e exteriorizado posteriormente.
- J) Extremidade do cateter contendo o “balonete” repleto de orifícios sendo projetado para lúmen do corno uterino (seta).
- K) Cornos uterinos exteriorizados extremidade contendo balonete implantadas no lúmen dos cornos uterinos direitos (Dir) e esquerdo (Esq).
- L) Detalhe dos cateteres implantados no terço cranial dos cornos uterinos. Notar (seta) os anguladores de baixo perfil (HpBio[®]) com a finalidade de fixar os cateteres na serosa do útero evitando deslocamento.

Após a implantação e fixação dos cateteres intrauterinos, os cornos uterinos foram devolvidos à cavidade pélvica mantendo as devidas posições *in situ*. Para a exteriorização da extremidade do cateter oposta à extremidade contendo o balonete, realizou-se punção na pele do animal cranial à incisão principal (região da fossa paralombar) e atravessaram-se os cateteres através do orifício resultante (Figura 7 M).

A incisão de laparotomia foi suturada 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) (Figura 7 N, O).

Imediatamente após as cirurgias, foram feitas lavagens uterinas via cateter em ambos os cornos, com infusões seqüências de solução de Ringer simples (10ml por infusão) até que o líquido infundido fosse recuperado com aspecto límpido (Figura 7 P, Q, R). Ao término de cada lavagem, infundiram-se 10ml de ceftiofur em cada cateter.

Os cateteres foram higienizados com gaze embebida em solução de álcool iodado. As 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 protegidos com gaze embebida a uma solução anti-séptica iododada. Estes foram acondicionados dentro de uma bolsa de plástico que foi alojada dentro de uma bolsa couro (8 x 8cm) fixada na pele do animal com fio de nylon agulhado 0,70mm (PARAMED[®]) (Figura 8 S,T,U). Sobre a ferida cirúrgica e o orifício de

exteriorização dos cateteres, realizou-se diariamente a assepsia local com líquido antiséptico (Riodeine[®]), seguida de pomada a base de clorexidine (Furanil[®]) e repelente cicatrizante (Facthal pó[®]).

Ao término do procedimento cirúrgico os animais foram alojados em baias e piquetes, onde permaneceram durante toda a fase preparatória e fase experimental.

A remoção dos pontos ocorreu no 10º dia da fase preparatória (Figura 8 V,W,X).

Figura 7 - Procedimentos cirúrgicos de implantação de cateteres intra-uterinos
(Fotografias de M à R)

- M) Cateteres implantados, no lúmen do corno uterino direito (verde) e corno uterino esquerdo (vermelho). Notar a exteriorização dos cateteres através de um orifício resultante de uma punção (seta). Notar incisão da pele e tecidos adjacentes para o acesso a cavidade abdominal e útero (Inc)
- N) Procedimento de sutura. Notar o segundo plano de sutura contínuo simples, através do músculo abdominal externo, músculo abdominal interno e fáscia subcutânea (seta).
- O) Detalhe da sutura de pele realizada com pontos simples separados utilizando linha de nylon 0,70 mm (seta).
- P) Detalhe da lavagem uterina realizada imediatamente após o procedimento cirúrgico. Notar a infusão com solução de ringer simples via cateteres implantados no lúmen dos cornos uterinos (seta).
- Q) Detalhe da primeira recuperação da solução de ringer simples infundida para a lavagem do lúmen uterino. Notar líquido recuperado de aspecto serosanguinolento (seta).
- R) Detalhe da segunda recuperação da solução de ringer simples infundida para lavagem do lúmen uterino. Notar solução de aspecto mais translúcido comparado à primeira recuperação (seta).

Figura 8 - Procedimentos cirúrgicos de implantação de cateteres intra-uterinos (Fotografias de S à X)

- S) Procedimento de infusão da solução antibiótica via cateteres no lúmen dos cornos uterinos (seta) após as lavagens com solução de ringer simples.
- T) Evidenciar extremidades dos cateteres envoltos por gazes (ct) e alojados em uma bolsa de plástico repleta de solução degermante (Bht).
- U) Bolsa de couro fixada na pele do animal para proteção da bolsa hermética de plástico contendo as extremidades dos cateteres (●).
- V) Ferida cirúrgica repleta de pomada a base de clorexidine (seta). Bolsa de couro (●) onde estão alojadas as extremidades dos cateteres.
- W) Detalhe da ferida cirúrgica após a aplicação da pomada a base de clorexidine Furanyl® e repelente cicatrizante Facthal pó® (seta). bolsa de couro (●) onde estão alojadas as extremidades dos cateteres.
- X) Acondicionamento do animal após o procedimento cirúrgico em baia com dieta alimentar e hídrica *ad libidum*.

3.4.1.4 Procedimentos pós-cirúrgicos

Uma vez ao dia administraram-se anti-inflamatório (fenilbutazona, 15ml, i.v.) 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 diminuir o processo inflamatório pós-cirúrgico e evitar infecções decorrentes de possíveis contaminações ocorridas no procedimento cirúrgico.

Procedeu-se lavagem uterina com 10ml de solução fisiológica suplementada com ceftiofur (20% v/v) em cada corno uterino 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 0,2 ml de solução de ceftiofur em cada um dos cateteres, com o objetivo apenas de mantê-los desobstruídos. Este procedimento foi repetido até a primeira ovulação pós-cirúrgica.

3.4.1.5 Indução da ovulação final

No 15º dia da fase preparatória, todos os animais receberam 2ml de PGF2 α para a indução da ovulação. 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 afecções 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 corpo lúteo sub-luteinizado com PGF2 α . Por fim, endometrites foram tratadas com lavagem uterina utilizando infusões de 10ml de solução fisiológica com ceftiofur em cada corno uterino. Resolvidas às afecções os animais receberam aplicação de 2ml de PGF2 α para induzir o estro e promover a ovulação para o início da fase experimental.

3.4.2 Fase experimental

Durante a fase experimental foram realizadas as seguintes atividades: transferências de embriões, microlavagens uterinas, abate, análise macroscópica do aparelho reprodutor feminino e obtenção de tecidos para análise histopatológica.

3.4.2.1 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 presença e aspecto. 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 vacas transferidas) ou não (n=3 vacas cíclicas) 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 (Figura 9 A, B). 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 solução desinfetante (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 pelo vestíbulo e vagina (SQUIRES et al., 2000). Os embriões foram inovulados na porção cranial do corno uterino ipsolateral ao ovário com corpo lúteo como na figura 9 C,D, E.

Figura 9 – Procedimentos de descongelamento, seleção e inovulação dos embriões (fotografias de A a D; desenho E)

- A) Detalhe do descongelamento da palheta contendo embriões ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) durante 20 segundos.
- B) Detalhe do descongelamento da palheta contendo embriões ($\pm 37^{\circ}\text{C}$) em banho maria por 20 segundos.
- C) Detalhe da lavagem dos embriões selecionados em meio de manutenção (Holding).
- D) Evidenciar a inovulação dos 3 embriões selecionadas no terço cranial do corno uterino.
- E) Desenho esquemático do posicionamento dos embriões em relação ao útero e aos cateteres implantados cirurgicamente.

3.4.2.2 Microlavagens uterinas

Microlavagens uterinas foram realizadas em todas as vacas nos dias 14, 16, 18 e 20 do ciclo estral ou gestação inicial. Em cada corno uterino foram realizadas três infusões de 6ml com solução fisiológica (Figura 11 A, B, C). As infusões foram realizadas com fluxo aproximado de 1ml/min. Aspirou-se a solução infundida, utilizando-se uma seringa de 20ml com uma agulha 40x16 mm acoplada a extremidade do cateter exteriorizada da cavidade abdominal (Figura 11 D).

Os microlavados (fluídos uterinos) foram armazenados em tubos cônicos de prolipropileno estéreis de 15ml, identificados conforme o corno uterino de origem e acondicionados em gelo para a mensuração dos volumes obtidos (Figura 11 E). Posteriormente, os microlavados do corno direito e corno esquerdo foram agrupados (*pool* do “corno direito” e *pool* do “corno esquerdo”) e centrifugados a 3000 x g durante 15 minutos a 4°C (Figura 11 F). Os sobrenadantes foram armazenados em temperatura -80°C para análises futuras.

Figura 10 – Procedimentos de microlavagens uterinas realizados no dia 14, 16, 18 e 20 pós-estro (Fotografias de A a F)

- A) Materiais utilizados para as microlavagens uterinas. Em (1) tubos de plásticos enumerados para armazenagem do fluído uterino recuperado; (2) seringas de 10ml, agulhas 40x12mm e um frasco de 500ml solução de ringer simples estéril; (3) gaze, luvas, antibiótico para infusão após a microlavagem, solução degermante, pó repelente e rolo de papel toalha; (4) pasta de documentação com histórico do animal.
- B) Preenchimento da seringa estéril com 6ml de solução de ringer simples para início da microlavagem.
- C) Infusão de 6ml (1ml por minuto) de solução de ringer simples no lúmen do útero via cateteres implantados.
- D) Recuperação do microlavado uterino (solução de ringer simples + fluído uterino)
- E) Armazenamento do microlavado uterino (solução de ringer simples + fluído uterino) em recipiente com gelo
- F) Pool dos microlavados de cada corno uterino para posterior centrifugação alíquotagem e armazenamento à temperatura de -80 °C.

3.4.3 Necrópsia e Histopatologia

As vacas foram abatidas no 20º dia da fase experimental após a realização da microlavagem uterina. Os abates dos animais foram realizados no “Matadouro Escola” da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga, da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP de acordo com as normas do Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Estado de São Paulo – SISP. Os animais foram insensibilizados e abatidos de acordo com as metodologias adotadas pelo matadouro escola (Figura 12 A, B).

Os tratos reprodutivos foram removidos cerca de 10 minutos após o abate, envoltos em gelo, levados para o laboratório e submetidos à análise macroscópica.

O trato reprodutor da fêmea foi posicionado em uma mesa metálica na posição dorso ventral. Realizou-se uma incisão caudo-cranial, da vulva à junção útero-oviduto. Em vacas submetidas à transferência de embrião, o corno uterino ipsolateral ao corpo lúteo foi incisado primeiro, para que se determinasse a presença ou ausência de conceitos (Figura 12 C,D).

A seguir removeram-se fragmentos de 1cm³ de tecidos uterinos. As áreas escolhidas para a posterior análise histopatológica: 1) região ao redor do cateter implantado no corno uterino esquerdo; 2) região ao redor do cateter implantado no corno uterino direito; 3) região proximal a junção útero-oviduto do corno uterino direito; 4) região proximal ao ligamento intercornual do corno uterino direito; 5) região do corpo do útero (Figura 12 E).

Figura 11 – Procedimentos de abate dos animais após as microlavagens, análise macroscópicas do trato reprodutor feminino e obtenção de tecidos para análise histopatológicas (Fotografias de A a E)

- A) Animal sendo levado para o “Matadouro escola” no dia 20 da fase experimental.
- B) Insensibilização humanitária através de uma pistola pneumática seguindo as normas da linha de abate.
- C) Trato reprodutor feminino posicionado sobre uma mesa metálica coberta por tecido preto para análise macroscópica e foto-documentação. Em (cdir) corno uterino direito; (cesq) corno uterino esquerdo; (ct) extremidade do cateter; (od) ovário direito; (oe) ovário esquerdo; (cx) cervix; (vg) vagina.
- D) Trato reprodutor feminino após a incisão caudo-cranial para à análise detalhada da luz do órgão com objetivo da determinação da presença ou ausência do conceito. Em (cdir) corno uterino direito; (cesq) corno uterino esquerdo; (ctb) extremidade do cateter com balonete; (od) ovário direito; (oe) ovário esquerdo; (cx) cervix; (vg) vagina.
- E) Trato reprodutor feminino após análise macroscópica. Notar as numerações identificando os fragmentos obtidos para a análise histopatológica. Em (1) região ao redor do cateter implantado no corno uterino esquerdo; (2) região ao redor do cateter implantado no corno uterino direito; (3) região proximal à junção útero-oviduto do corno uterino direito; (4) região proximal ao ligamento interconual do corno uterino direito; (5) região do corpo do útero; (cdir) corno uterino direito; (cesq) corno uterino esquerdo; (ctb) extremidade do cateter com balonete; (od) ovário direito; (oe) ovário esquerdo; (cx) cervix; (vg) vagina.

Os fragmentos foram acondicionados em tubos cônicos de polipropileno de 15ml contendo solução fixadora de paraformaldeído 4%. Após a fixação do material por 24 horas, procedeu-se a lavagem do material em tampão fosfato 0,2M para retirada do fixador, seguida de desidratação em uma série de soluções de etanol em concentrações crescentes de 70 à 100%, diafanização em xilol, seguida de embebição em parafina (Paraplast-Histosec[®]).

As espécimes emblocadas foram seccionados em micrótomo automático (Leica, RM2155) obtendo-se cortes de 5 μ m. Um corte de cada fragmento (regiões 1 a 5) foi aderido a uma lâmina histológica e deixado em estufa a 60°C por um período não superior a 8 horas. Os cortes foram então desparafinizados e corados seguindo as técnicas de hematoxilina e eosina, Tricrômio de Masson e Tricoma de Gomory (BEHMER, 1976).

Realizou-se a foto-documentação dos cortes das cinco regiões estudadas em cada animal. Utilizou-se um sistema computadorizado de análise de imagens composto por um microscópio óptico (Leica[®] DMR) acoplado a uma câmera digital (Leica[®] DC 300 F) que transferiu as imagens para o monitor de um microcomputador equipado com um *software* de análise de imagens (Leica Qwin; Leica Microsystem Imaging Solution Ltd, Cambridge, UK) localizado no Laboratório de Estereologia e Anatomia Química (LSCA) do departamento de Anatomia dos animais domésticos e silvestres da FMVZ-USP. Para cada corte foram fotografados 10 campos aleatórios seguindo do endométrio para o perimétrio. A imagem de cada campo (250 X 315 μ m; 78.750 μ m²) foi sobreposta por uma reticula contendo seis quadrados, cada um medindo 3.906,25 μ m² (62,5 X 62,5 μ m). O número de células mononucleares e de células polimorfonucleares foi contado em cada quadrado (Figura 12). Para cada variável, o número médio de células dos

quadrados de cada campo foi calculado e o valor total por campo foi obtido por regra de três. A seguir, o valor médio de cada variável por corte foi obtido pela média dos valores médios dos campos. Finalmente, por regra de três ajustaram-se as contagens médias de cada variável para uma área de $10.000\mu\text{m}^2$ ($100 \times 100\mu\text{m}$).

Figura 12 - Desenho esquemático da metodologia adotada para contagem celular do corte referente a cada região uterina.

- A) De cada corte fotografaram-se 10 campos aleatórios obtidos ($250\mu\text{m} \times 315\mu\text{m}$).
- B) Cada campo foi sobreposto por uma retícula contendo seis quadrados
- C) O número de células mononucleares e polimorfonucleares foi contada em cada quadrado contido na retícula ($62,5\mu\text{m} \times 62,5\mu\text{m}$)

Segundo Martins et al. (2002), a definição do processo inflamatório em tecidos endometriais pode ser realizada de acordo com a quantificação celular. Para tanto foram atribuídos os graus de 1 a 4 para a inflamação aguda, onde a inflamação foi considerada do grau 1 (normal) se dez campos ao acaso, contivessem até 20 células polimorfonucleadas, grau 2 (leve) de 21 a 40 células polimorfonucleadas, grau 3 (moderada) de 41 a 70 células polimorfonucleadas e grau 4 (grave) com $n \geq 70$ células polimorfonucleadas. Para a inflamação crônica foi atribuído à mesma metodologia, porém a quantificação celular foi realizada com a contagem das células mononucleares.

No presente trabalho as contagens celulares foram normalizadas para uma área de $10.000 \mu\text{m}^2$. Para manter os critérios de caracterização da inflamação descritos por Martins et al. (2002), que utilizaram campos com $70.000 \mu\text{m}^2$, os números descritos acima foram divididos por sete e arredondados para o número inteiro mais próximo. Ou seja, a um tecido normal foi atribuído o grau 1 (normal) quando contaram-se até 3 células em $10^4 \mu\text{m}^2$, grau 2 (leve) de 4 a 6 células em $10^4 \mu\text{m}^2$, grau 3 (moderada) 7 a 10 células em $10^4 \mu\text{m}^2$ e grau 4 (grave) $n \geq 11$ células em $10^4 \mu\text{m}^2$. Estas determinações foram atribuídas tanto para a quantificação de células mononucleadas como células polimorfonucleadas.

Para o número de glândulas endometriais (totais, normais e dilatadas), os resultados foram obtidos pela contagem por campo ($78.750 \mu\text{m}^2$). Obteve-se valor médio dos dez campos analisados e ajustaram-se as contagens médias de cada variável para uma área de $100.000 \mu\text{m}^2$ por regra de três. Estimou-se ainda a proporção de glândulas dilatadas dividindo-se o número de glândulas dilatadas pelo número de glândulas totais e multiplicando-se o resultado por 100.

Consideraram-se dilatadas as glândulas que apresentaram luz glandular maior que 15 μm .

A ocorrência de fibroplasia periglandular foi determinada contando-se o número de glândulas uterinas contendo três ou mais camadas de fibrócitos periglandulares em $10^5 \mu\text{m}^2$ e calculando-se a proporção dessas glândulas em relação ao número total de glândulas.

3.4.4 Análises

As análises compreenderam variáveis relacionadas ao procedimento cirúrgico, técnica de microlavagem uterina, aos achados de necrópsia, achados histopatológicos e por fim análises estatísticas.

3.4.4.1 Variáveis relacionadas ao procedimento cirúrgico

- Frequência¹ de ocorrência de seroma durante a fase preparatória.
- Frequência de ocorrência de exsudato inflamatório na ferida cirúrgica durante a fase preparatória.
- Frequência de ocorrência de miíase na ferida cirúrgica na fase preparatória.
-

¹ A menos que especificamente citado, as variáveis de frequência foram definidas como o número de animais apresentando a ocorrência sobre o número total de animais x 100 (%).

- Frequência de ocorrência de animais que não apresentaram a cicatrização total da ferida cirúrgica na fase preparatória.
- Frequência de ocorrência de animais que apresentaram deiscência de sutura na ferida cirúrgica durante a fase preparatória.
- Frequência de ocorrência de mucometra pré-cirurgia na fase preparatória.
- Frequência de ocorrência de edema uterino durante o procedimento cirúrgico na fase preparatória.
- Frequência de ocorrência de endometrite pós-cirurgia na fase preparatória.
- Frequência de ocorrência de corrimento vaginal pós-cirurgia na fase preparatória.

3.4.4.2 Variáveis relacionadas à técnica de microlavagem uterina

- Frequência de ocorrência da re-fixação da bolsa de couro à pele do animal para armazenamento e proteção dos cateteres durante a fase preparatória e experimental.
- Frequência de ocorrência de inflamação do orifício para a exteriorização dos cateteres.
- Frequência de ocorrência de precipitação do antibiótico contido dentro dos cateteres durante a fase preparatória e experimental.
- Frequência de ocorrência de rompimento parcial dos cateteres durante a fase preparatória.

- Frequência de ocorrência da perda dos cateteres intrauterinos implantados durante a fase preparatória.
- Intervalo entre a última infusão de antibiótico na fase preparatória e o início da fase experimental (dias).
- Taxa de recuperação (volume recuperado sobre volume infundido; %).
- Intervalo de tempo entre a implantação dos cateteres intrauterino e o abate (dias).
- Frequência de ocorrência de grumos nos microlavados ao longo da fase experimental.
- Frequência de ocorrência de microlavados com aspecto serosanguinolento ao longo da fase experimental.
- Frequência de ocorrência de microlavados com aspecto turvo ao longo da fase experimental.

3.4.4.3 Variáveis relacionadas aos achados de necropsia

- Taxa de prenhez (número de vacas contendo conceito / número de vacas que receberam transferência de embriões x 100; %).
- Frequência de ocorrência de peritonite focal justaposta ao trajeto dos cateteres.
- Frequência de ocorrência de hiperemia de serosa uterina.
- Frequência de ocorrência de exsudato inflamatório envolvendo os cateteres na cavidade abdominal.

- Freqüência de ocorrência de aderência útero-visceral.
- Freqüência de ocorrência de aderência intercornual.
- Freqüência de ocorrência de aderência do ovário direito a estruturas adjacentes.
- Freqüência de ocorrência de aderência do ovário esquerdo a estruturas adjacentes.
- Freqüência de ocorrência de muco vaginal cristalino.
- Freqüência de ocorrência de endometrite.
- Freqüência de ocorrência de fibrina envolvendo o cateter alojado dentro do útero.

3.4.4.4 Variáveis relacionadas aos achados histopatológicos

- Contagem de células polimorfonucleares (número/10.000 μm^2).
- Contagem de células mononucleares (número/10.000 μm^2).
- Contagem de glândulas endometriais (normais, dilatadas fibrosadas e totais) (número/100.000 μm^2).
- Proporção de glândulas dilatadas sobre o total de glândulas (%).
- Proporção de glândulas fibrosadas sobre o total de glândulas (%).

3.4.4.5 Análises estatísticas

A eficiência de recuperação dos microlavados uterinos foi analisada por ANOVA usando o PROC GLM do programa SAS. As variáveis independentes foram: estado (transferida ou cíclica), vaca, lado (direito ou esquerdo), dia (14, 16, 18 ou 20) e interações. Os resultados foram apresentados como médias dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão da média.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados descritos referem-se às variáveis relacionadas ao procedimento cirúrgico, microlavagem uterina, achados de necrópsia e achados histopatológicos. Em nenhuma vaca que recebeu a transferência de embriões após a implantação cirúrgica dos cateteres intruterinos foi encontrado o conceito ao abate (taxa de prenhez 0%). As possíveis causas estão discutidas em cada tópico abaixo.

4.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os resultados referentes à frequência de ocorrência das variáveis relacionadas à ferida cirúrgica foram expressos na figura 13.

A ocorrência de seroma na ferida cirúrgica foi de 33,33% (animais 4, 7 e 8). Este fato ocorreu em consequência da utilização de três planos de sutura. Stainki (2000) relatou que a formação de seroma ocorre pelo acúmulo de soro e fluídos teciduais no espaço morto entre os planos teciduais de uma ferida. O processo fisiológico de formação de seroma esta envolvido diretamente no processo de cicatrização (coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação) citados por Mandelbaum, Di Santis e mandelbaum (2003).

A deiscência dos pontos (22,22%) foi apresentada pelos animais 3 e 6 enquanto que a inflamação e má cicatrização da ferida cirúrgica 22,22% foi

constatada nos animais 2 e 8. Para as variáveis relacionadas, deiscência dos pontos, inflamação e má cicatrização da ferida cirúrgica, normalmente estão associadas à ruptura da ferida cirúrgica, que pode ter ocorrido por auto-mutilação, síntese inadequada da ferida, aumento da pressão ou tensão na ferida, infecção local ou cicatrização lenta devido a distúrbios no metabolismo (STAINKI, 2000).

As vacas 2, 4, 6, 7 e 8 apresentaram pelo menos uma ocorrência relacionada à ferida cirúrgica, sendo que o animal 2 apresentou três ocorrências.

Figura 13 - Frequência de ocorrência de variáveis relacionadas à ferida cirúrgica (número de vacas apresentando ocorrência/número total de vacas - % e razão)

1. Número de vacas que apresentaram seroma na ferida cirúrgica / número total de vacas (% e razão).
2. Número de vacas que apresentaram exsudato inflamatório na ferida cirúrgica / número total de vacas (% e razão).
3. Número de vacas que apresentaram míase na ferida cirúrgica / número total de vacas (% e razão).
4. Número de vacas que apresentaram má cicatrização da ferida cirúrgica / número total de vacas (% e razão).
5. Número de vacas que apresentaram deiscência de sutura na ferida cirúrgica / número total de vacas (% e razão).

Os resultados referentes às ocorrências uterinas foram expressos na figura 14.

A mucometra pré-cirurgia apresentou frequência de 11,11%, sendo que apenas o animal 5 apresentou acúmulo de líquido ou muco dentro do útero no momento de implantação dos cateteres. Esta alteração pode estar envolvida com a obstrução do canal cervical ou da vagina e hiperestrogenismo encontrados em casos de animais com cisto folicular (NASCIMENTO; SANTOS, 1997). Outra possível causa de ocorrência de mucometra pode estar relacionada com a endometrite sub-clínica. Drillich (2002) relatou que para se diagnosticar a endometrite sub-clínica, exames complementares são necessários como a citologia endometrial (realizado pela obtenção de células de lavados uterinos) ou a biopsia uterina.

Edema uterino foi observado nos animais 2, 4, 5, 6, 7 e 8 (66,67%) no momento de implantação dos cateteres. Endometrite e corrimento pós-cirurgia foi observado apenas no animal 2 (11,11%). Tais variáveis podem estar envolvidas no processo inflamatório do útero, uma vez que estes sinais são clássicos de um processo inflamatório decorrente do trauma (cirurgia), confirmando os relatos de Jones, Hunt e King (2000), onde o líquido contido nos tecidos e o líquido extravasado são ricos em macromoléculas e células que se acumulam nos interstícios da área inflamada.

Com a exposição do útero ao ambiente externo no momento da cirurgia, a presença de agentes infecciosos ou bactérias oportunistas (*Escherichia coli*, *Proteus spp*, *Enterobacter*, *Streptococcus* alfa-hemolítico, *Staphylococcus* não-hemolítico, *Pasteurella haemolytica*, *Bacillus spp*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Clostridium spp*), predispõe o órgão a afecções específicas, como as cervicites e endometrites, promovendo a infertilidade e mortalidade embrionária (CHRISTIANSON, 1992). As variáveis relacionadas à ocorrência de afecções no procedimento cirúrgico, principalmente a endometrite pós-cirurgia poderiam levar a resultados negativos na obtenção de fluídos uterinos através da técnica aqui utilizada, bem como a manutenção da prenhez. Porém, a incidência de endometrite comprovada por exame clínico foi baixa, o que sugere a eficiência dos métodos de assepsia e higienização empregados, bem como da proteção antimicrobiana exercida pelos fármacos utilizados.

Relacionando os resultados gerais do procedimento cirúrgico descrito nesta seção, com a taxa de prenhez observada de 0%, supõe-se que as afecções apresentadas provavelmente não causaram distúrbio na fisiologia do útero. Vale ressaltar, por exemplo, que os procedimentos adotados foram semelhantes aos procedimentos de transferência de embrião (método cirúrgico). De fato, tal técnica consiste de laparotomia, exteriorização e manipulação do órgão reprodutor feminino e sutura da ferida cirúrgica. Contudo, em contraste com os dados obtidos na presente dissertação, reportou-se no trabalho apresentado por Demczuk (1998) taxas de prenhez atingindo 47% quando as inovulações dos embriões foram feitas pelo método cirúrgico em condições práticas de fazenda. Ainda, Thibier; Nibart (1992) relataram que os índices de gestação poderiam chegar a 75% com embriões frescos inovulados pelo método cirúrgico, porém nas condições em que

as receptoras fossem muito bem manejadas, como ocorre em centrais específicas para esta finalidade.

Figura 14 - Frequência de ocorrência de variáveis relacionadas às afecções e fisiologia uterina (número de vacas apresentando ocorrência/número total de vacas - % e razão)

1. Número de vacas que apresentaram mucometra pré-cirurgia / número total de vacas (% e razão).
2. Número de vacas que apresentaram edema uterino durante o procedimento cirúrgico na fase preparatória / número total de vacas (% e razão).
3. Número de vacas que apresentaram endometrites pós-cirurgia na fase preparatória / número total de vacas (% e razão).
4. Número de vacas que apresentaram corrimento vaginal pós-cirurgia na fase preparatória / número total de vacas (% e razão).

4.2 TÉCNICA DE MICROLAVAGEM UTERINA

As frequências de ocorrência das variáveis relacionadas à técnica de microlavagem uterina utilizando os cateteres implantados no lúmen uterino foram expressas nas figuras 15 e 16.

A inflamação do orifício de exteriorização dos cateteres e precipitação do antibiótico contido no interior dos cateteres durante a fase preparatória e experimental apresentaram uma frequência de ocorrência de 100%.

O orifício realizado na pele do animal para a exteriorização dos cateteres, não apresentou uma boa cicatrização, possibilitando a entrada de agentes contaminantes e como consequência a instalação de um processo inflamatório. De fato os cateteres permaneceram soltos impedindo o processo de remodelação tecidual do orifício e agindo de forma constante como corpo estranho, mesmo sendo estes hipoalergênicos (MANBELBAUM; DI SANTIS; MANBELBAUM, 2003). Guidugli-Neto (1997) descreveu que os fatores que levam à inflamação estão relacionados com os agentes agressores e com o hospedeiro. Neste caso a presença dos cateteres predispôs a uma reação inflamatória e a uma infecção secundária em consequência da via de acesso estabelecida.

No que se refere à precipitação da solução de antibiótico contida no interior dos cateteres, pode-se sugerir que a temperatura na qual foi mantida a solução ($\cong 38,5^{\circ}\text{C}$, equivalente à temperatura corporal interna do animal) foi mais elevada que a indicada para a sua conservação (4°C), possibilitando assim, a sua precipitação. Por outro lado, pode ter ocorrido algum tipo de interação química entre o cateter de silicone e a solução antibiótica.

Foi necessário refazer a fixação da bolsa de couro (utilizada para a proteção dos cateteres) na pele de 5 de 9 animais, fato este que pode estar relacionado com o local de permanência dos animais após a cirurgia. Os piquetes ou baias eram cercados por arame liso (piquete) ou alvenaria (baia) que possibilitaria a remoção mecânica da bolsa de couro.

Houve rompimento parcial dos cateteres do animal 5, fato que não alterou os procedimentos propostos. Entretanto no animal 9, esse rompimento acabou levando à perda de ambos os cateteres na fase preparatória. Para esse animal ficou inviabilizada a realização das microlavagens uterinas.

Figura 15 - Frequência de ocorrência de variáveis relacionadas à manutenção dos cateteres intrauterinos implantados (número de vacas apresentando ocorrência/número total de vacas - % e razão)

1. Número de vacas nas quais foi realizada a re-fixação da bolsa de couro na pele para armazenamento e proteção dos cateteres durante a fase preparatória e experimental / número total de vacas (% e razão).
2. Número de vacas que apresentaram inflamação do orifício realizado na pele do animal para a exteriorização dos cateteres / número total de vacas (% e razão).
3. Número de vacas que apresentaram precipitação do antibiótico contido dentro dos cateteres durante a fase preparatória e experimental / número total de vacas (% e razão).
4. Número de vacas que apresentaram o rompimento dos cateteres durante a fase preparatória / número total de vacas (% e razão).
5. Número de vacas que apresentaram a perda dos cateteres durante a fase preparatória / número total de vacas (% e razão).

Figura 16 - Observações relacionadas à operação dos cateteres para a realização das microlavagens (Fotografias de A a D)

- A) Notar os pontos de re-fixação da bolsa de couro na pele do animal utilizando fio de nylon (ponta de setas)
- B) Evidenciar o local de fixação da bolsa de couro na pele do animal. O orifício de exteriorização dos cateteres com processo inflamatório instalado (seta).
- C) Microlavados armazenado em tubos de 15ml antes da centrifugação. Evidenciar no tubo com tampa azul a solução de antibiótico precipitado removido do interior do cateter antes da microlavagem.
- D) Ausência da bolsa de couro e perda dos cateteres por causa desconhecida antes da fase experimental, local de fixação da bolsa de couro e exteriorização dos cateteres (seta).

Uma vez que o animal 9 (transferida), perdeu os cateteres, dados dessa seção referem-se aos demais animais. Além disso, não foi possível realizarem-se lavados no dia 16 da vaca 1, de modo que nesse dia o procedimento foi realizado em apenas quatro vacas no grupo das transferidas.

Houve efeito de vaca na taxa de recuperação de microlavagens uterinas ($P < 0,01$; Figura 17). Notou-se que a taxa de recuperação variou de 35,20% para o animal 5 à 86,11% no animal 1. Houve interação estado x dia ($P < 0,01$; Figura 18). Observou-se que ao longo dos dias de microlavagens uterinas, no grupo de vacas cíclicas, a taxa de recuperação foi decrescente, ao contrário do grupo de vacas transferidas, no qual a taxa de recuperação aumentou. Contudo, não houve interação estado x lado x dia ($P > 0,01$; Figura 19), uma vez que dentro de cada estado, as mudanças na taxa de recuperação foram similares em ambos os cornos uterinos.

Figura 17 - Valores médios ($\pm$ EPM) da taxa de recuperação para cada animal nos grupos de vacas cíclica e vacas transferidas

Figura 18 - Valores médios ($\pm$ EPM) da taxa de recuperação para cada dia de microlavagem nos grupos de vacas cíclicas e vacas transferidas

Figura 19 - Valores médios ($\pm$ EPM) da taxa de recuperação para cada dia de microlavagem do corno uterino direito e corno uterino esquerdo nos grupos de vacas transferidas (A) e cíclicas (B)

Para os valores referentes à taxa de recuperação das microlavagens, observou-se que não houve recuperação superior a 90% do fluido infundido nos cornos uterinos. Supõe-se, que o tamanho dos cornos uterinos e a difusão da solução fisiológica infundida, podem ter influenciado na taxa de recuperação. A taxa de recuperação dos microlavados de vacas transferidas foi maior que a taxa de recuperação de vacas cíclicas ao longo das microlavagens, entretanto este fato não pode ser explicado pelas variáveis estudadas.

Os resultados referentes ao intervalo de tempo entre a cirurgia e o abate dos animais (dias) estão expressos na figura 20. Somando 18 dias da fase preparatória a 20 dias da fase experimental, era esperado que os cateteres permanecessem no lúmen uterino por 38 dias em média. Todos os cateteres possibilitaram as microlavagens durante todo o procedimento experimental, mesmo naqueles animais em que permaneceram um longo período. Apenas o animal 9 apresentou um intervalo de tempo inferior à 38 dias propostos, devido a perda dos cateteres por causa desconhecida. De nove vacas nas quais foram realizadas as cirurgias, apenas os animais 3, 6 e 9 apresentaram o número de dias dentro do esperado. O atraso observado nos demais animais ocorreu em consequência de afecções ovarianas e uterinas, observadas no dia 15 da fase preparatória conforme descrito em detalhes por Freire (2006).

Figura 20 – Intervalo de tempo (dias) entre a cirurgia e o abate dos animais

Kübar e Jalakas (2002), observaram que animais apresentando degeneração cística de ovário comumente apresentaram endometrite crônica de grau leve ou outras alterações uterinas, podendo-se constatar nestes animais um alto índice de infertilidade.

No presente trabalho é possível que o uso dos cateteres tenha levado a distúrbios ovarianos e conseqüente variação hormonal e falha na manutenção da prenhez. De fato, no trabalho de Turin et al. (1996), dispositivos intra-uterinos (DIU) foram utilizados para o controle do cio em 230 novilhas Hereford-Angus, comprovado-se a ausência de cio em 98% dos animais e um ganho de peso superior a 25% comparadas as 230 vacas controle. Concentração sérica de progesterona foi de quatro a cinco vezes menor que o do grupo controle ($0,7 \pm 0,09$ ng/ml vs $3,3 \pm 0,8$ ng/ml), sugerindo falha de ovulação e formação de corpo lúteo. Segundo os autores, os resultados sugerem que o DIU teve ação

contraceptiva importante e promoveu alterações na função ovariana. Já em contradição com os dados de Turin et al. (1996), outros autores não observaram diferença entre os tratamentos, principalmente na supressão de estro, como relatou Farias Jr. (2000) para novilhas cruzadas (Charolês x nelore) e vacas Nelores, Fordyce et al. (2001) para vacas Brahman, Horton et al. (1979) para novilhas (Charolês x Hereford, Charolês x Angus e Hereford x Angus) e Oliveira Filho et al. (1999) para vacas Nelores.

No presente trabalho, segundo reportado por Freire (2006), baseando-se nas concentrações plasmáticas de progesterona, as vacas dividiram-se em quatro categorias: vacas que apresentaram ciclos curtos (animais 7, 8 e 9), vacas que apresentaram luteólise no dia esperado (animais 3, 4 e 6), vacas que não apresentaram luteólise até o dia 20 da fase experimental (animais 1 e 5) e um vaca que não apresentou concentrações detectáveis de progesterona durante toda a fase experimental (animal 2). Sugere-se que altas concentrações de $\text{PGF2}\alpha$ possa ter influenciado na fisiologia do ciclo estral. Scenna et al. (2004) reportaram que a manipulação do útero momentos antes da inoculação dos embriões pela técnica de transferência convencional, promoveu a produção de $\text{PGF2}\alpha$ em altas concentrações, alterando o desenvolvimento do embrião e resultando em decréscimo da taxa de prenhez.

As freqüências de ocorrência de microlavados com aspecto serosanguinolento ou turvo e presença de grumos, estão expressos nas figuras 21, 22 e 23.

Em relação aos microlavados com aspecto serosanguinolento houve freqüência de ocorrência chegando a 40% no dia 14 da fase experimental. Nos

demais dias houve um ou nenhum animal por grupo apresentando microlavado com tal aspecto (Figuras 21 e 24 A).

Figura 21 – Frequência de ocorrência de microlavados com aspecto serosanguinolento ao longo da fase experimental (número de vacas que apresentaram microlavados com aspecto serosanguinolento/ número total de vacas - % e razão)

Com relação ao aspecto turvo dos microlavados, estes foram observados a cada dia em ao menos metade das vacas. Frequências de ocorrência chegando aos 66,67% foram observadas nos dias 16 e 18 da fase experimental (Figuras 22 e 24 B)

Figura 22 – Frequência de ocorrência de microlavados com aspecto turvo ao longo da fase experimental (número de vacas que apresentaram microlavados com aspecto turvo/ número total de vacas - % e razão)

Todas as vacas cíclicas apresentaram grumos nos microlavados uterinos em todos os dias da fase experimental (Figuras 23 e 24 C). Quanto às vacas transferidas no máximo duas vacas apresentaram grumos entre os dias 14 e 20 da fase experimental.

Figura 23 – Frequência de ocorrência de grumos nos microlavados ao longo da fase experimental (número de vacas que apresentaram microlavados com presença de grumos/número total de vacas - % e razão)

Figura 24 – Fotografias dos microlavados obtidos em diferentes dias do período experimental.

- A) Flúido uterino com aspecto serosanguinolento após a microlavagem
- B) Flúido uterino com aspecto turvo após a microlavagem
- C) Flúido uterino com presença de grumos após a microlavagem

A ocorrência de microlavados com aspecto serosanguinolento no dia 14 foi alta comparada aos demais dias de microlavagem. Sugere-se que essa ocorrência foi devida ao acúmulo de líquido intrauterino em consequência da cirurgia. Em tecidos submetidos a trauma, os vasos sangüíneos perdem a permeabilidade ocorrendo à migração de células para o tecido e formação de líquidos na cavidade conforme os relatos de Galindo (2003). Houve mudança do aspecto serosanguinolento para o aspecto turvo e com presença de grumos ao longo dos dias de microlavagens. Observou-se também que todos os animais que apresentaram microlavados com aspecto turvo, também apresentaram grumos, principalmente os animais 2, 3, 5, 7 e 8. Propõe-se que a mudança do aspecto apresentada nos microlavados deveu-se em geral, à instalação de processo inflamatório. Galindo et al. (2003), Guidugli-Neto (1997) e Tizard (1985) descreveram a presença de secreções relacionadas à processos inflamatórios, compostas por pús, líquido de densidade, cor e cheiro variável, constituído por soro, exsudato e células mortas principalmente neutrófilos e macrófagos. Evidencias histológicas do processo inflamatório foram discutidas posteriormente na presente dissertação.

No presente experimento houve manipulação dos órgãos reprodutivos tanto para a realização de exames ultrasonográficos como na realização das microlavagens. Além disso, houve estímulo mecânico pela movimentação dos cateteres no útero dos animais. Tais estímulos podem ter levado à ocorrências de inflamações uterinas.

Embora tenha-se obtido sucesso na recuperação de fluidos dos cateteres intrauterinos os aspectos dos microlavados aqui apresentado não foram satisfatórios. Esperava-se maior freqüência de lavados com aspecto límpido.

Possivelmente houve interação negativa entre os processos inflamatórios no útero dos animais e evidenciados pela presença de grumos, com a taxa de prenhez nula observada. Associada à inflamações, ocorre sabidamente a liberação de $\text{PGF2}\alpha$, que conforme Scenna et al. (2005), pode ser tóxica ao concepto. Tal possibilidade pode ter contribuído para falhas na manutenção das gestações no presente experimento.

A técnica de microlavagem adotada neste trabalho pode ter influenciado no estabelecimento da gestação ainda de outra maneira. O fluido uterino removido possui moléculas que participam no diálogo bioquímico entre o concepto e o endométrio materno associado à manutenção da prenhez inicial.

4.3 ACHADOS DE NECRÓPSIA

Os resultados obtidos pela análise das variáveis relacionadas aos achados de necrópsia estão expressos nas figuras 26 a 31. A frequência de ocorrência de peritonite focal (Figuras 25 e 26 A e B) foi de 100%, uma vez que todos os animais apresentaram depósito de fibrina na cavidade abdominal, principalmente no antímero que foi realizada a cirurgia. Hiperemia de serosa uterina (Figura 26 C) foi observado nos animais 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 (88,89%). Ocorreu nos animais 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (66,67%) um processo inflamatório focal (Figura 26 D e E), evidenciando-se o isolamento dos cateteres por tecidos de granulação preenchidos por exsudato inflamatório.

Figura 25 – Frequência de ocorrência de variáveis relacionadas aos achados de necropsia: processo inflamatório (número de vacas apresentando ocorrência/número total de vacas - % e razão)

1. Ocorrência de peritonite focal justaposta ao trajeto dos cateteres
2. Ocorrência de hiperemia da serosa uterina
3. Ocorrência de exsudato inflamatório envolvendo os cateteres na cavidade abdominal.

Figura 26 – Fotografias dos achados de necropsia relacionados ao processo inflamatório parauterino

- A) Presença de peritonite focal e aderências de estruturas envolvendo os cateteres no trajeto até o útero. Notar em (Ct) cateteres uterinos removidos de dentro do tecido; (PF) peritonite focal e tecidos musculares aderidos ao peritônio com depósito de fibrina; (Od) ovário direito; (Cdir) corno uterino direito; (Cesq) corno uterino esquerdo; (Oe) ovário esquerdo; (Cx) cervix; (Vg) vagina.
- B) Detalhe da figura A, notar o trajeto nos quais os cateteres estavam envolvidos pelos tecidos musculares, peritoneal e adicionados de exsudato inflamatório (EF).
- C) Trato genital feminino removido da cavidade pélvica do animal. Notar em (HIP) hiperemia de serosa uterina; (Ct) cateteres uterinos implantados no lúmen uterino; (Od) ovário direito; (Cdir) corno uterino direito; (Cesq) corno uterino esquerdo; (Oe) ovário esquerdo; (Cx) cervix; (Vg) vagina.
- D) Detalhe do trajeto dos cateteres (Ct). Evidenciar exsudato inflamatório (EF) envolvendo os cateteres após a remoção do trato genital da cavidade pélvica.
- E) Detalhe do trajeto dos cateteres (Ct). Evidenciar exsudato inflamatório (EF) envolvendo os cateteres após a remoção do trato genital da cavidade pélvica, (Od) ovário direito; (Cdir) corno uterino direito; (Cesq) corno uterino esquerdo; (Oe) ovário esquerdo; (Cx) cervix;

Com relação às aderências, as mesmas foram encontradas entre útero e vísceras (Figuras 27 e 28 A) nos animais 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (77,78%) submetidos ao procedimento cirúrgico. Os animais 1, 2, 4 e 5 (44,44%) apresentaram ocorrência de aderência intercornual (Figura 28 B). Os sete animais citados anteriormente mais o animal 9, apresentaram-se com aderência do ovário direito (Figura 28 C) com estruturas adjacentes (antímero onde foi realizado a cirurgia) sendo que no ovário esquerdo não houve ocorrência de aderências.

Figura 27 – Frequência de ocorrência de variáveis relacionadas aos achados de necropsia: aderências (número de vacas apresentando ocorrência/número total de vacas - % e a razão)

1. Ocorrência de vaca que apresentaram aderência útero-visceral
2. Ocorrência de vacas que apresentaram aderência internornual
3. Ocorrência de vacas que apresentaram aderência do ovário direito às estruturas adjacentes
4. Ocorrência de vacas que apresentaram aderência do ovário esquerdo às estruturas adjacentes

Figura 28 – Fotografias dos achados de necropsia relacionados as aderências encontradas

- A) Aderência útero-visceral (AD), corno uterino aderido na parede abdominal e peritônio (CUT).
- B) Aderência intercornual (AD), cateteres implantados dentro do lúmen uterino (CT), corno uterino direito (Cdir), corno uterino esquerdo (Cesq).
- C) Aderência do ovário direito em estruturas adjacentes. Ovário direito (Od), aderência do ovário direito com o mesovário (AD).

A inter-relação das variáveis citadas acima está de acordo com a definição apresentada por Jones et al. (2000), para um quadro de peritonite crônica. Tal afecção esta envolvida principalmente com o local de exteriorização dos cateteres, que apresentou em 100% dos casos um processo inflamatório devido à via de acesso estabelecida no momento da cirurgia. Esta afecção é considerada crônica devida ocorrência de aderências que foram capazes de isolar a infecção num segmento particular do peritônio.

A presença de muco cristalino (Figura 29 e 30 A) teve uma frequência de ocorrência de 66,67% (animais 1, 2, 3, 4, 5 e 6). Em especial os animais 3, 4 e 6 apresentaram luteólise entre os dias 16 e 20, no entanto considera-se normal a presença de muco cristalino nesta fase do ciclo estral (final de diestro e /ou próestro) (FREIRE, 2006). Sob influência de estrógeno, o endométrio é restaurado iniciando a fase proliferativa. A mucosa torna-se espessa, congesta e edematosa com a predominância de células secretoras de muco (GRUNERT; GREGORY, 1989). Para os animais 1, 2 e 5 não foi possível explicar o motivo da presença de muco cristalino, uma vez que estes animais não apresentaram luteólise no período experimental. De fato a ocorrência do muco cristalino pode estar associada as mudanças fisiológicas ocorridas após a implantação dos cateteres (afecção uterina e distúrbios ovarianos).

Figura 29 – Frequência de ocorrência de variáveis relacionadas aos achados de necropsia (número de vacas apresentando ocorrência/número total de vacas % e a razão)

1. Ocorrência de muco vaginal cristalino
2. Ocorrência de endometrite pós-abate
3. Ocorrência de fibrina envolvendo o cateter

Observou-se a ocorrência de endometrite pós-abate (Figura 29 e 30 B) em dois animais do grupo cíclicas (66,67% animal 5 e 8). Já no grupo de vacas transferidas, apenas o animal 2 (16,67%) apresentou endometrite pós-abate. Para os animais estudados, foram classificados com endometrite aqueles que apresentaram macroscopicamente uma inflamação superficial do endométrio, não se estendendo além do extrato esponjoso e contendo exsudato inflamatório purulento à necrópsia.

Figura 30 – Fotografias dos achados de necropsia relacionados exsudatos e secreções do trato reprodutivo

- A) Presença de muco cristalino no lúmen da vagina e lúmen uterino após o abate (dia 20 do período experimental). Notar em (MC) muco cristalino; (Cx) cervix; (Vg) vagina.
- B) Endometrite purulenta. Em (EP) exsudato purulento dentro do corno uterino esquerdo (Cesq); ovário esquerdo (Oe); corno uterino direito (Cdir).
- C) Presença de fibrina (Fi) envolvendo os cateteres alojados no interior dos cornos uterinos (Ct). Em (Oe) ovário esquerdo; (Cdir) corno uterino direito; (Cesq) corno uterino esquerdo.

A endometrite, histologicamente, é caracterizada por rompimento da superfície epitelial, infiltração de células inflamatórias, congestão vascular, edema estromal, e graus variados de linfócitos e células plasmáticas acumuladas na camada superficial do endométrio (DRILLICH, 2006; GRIFFIN et al., 1974; JUBB et al., 1970). Bactérias oportunistas normalmente associados à endometrites chegam pela rota ascendente, seguido de monta natural, inseminação artificial, abortamento ou período pós-parto como relatados por alguns autores (BONDURANT, 1999; DHALIWAL et al., 2001; JONES, 2000; OKKER et al., 2002; REBHUN, 1995). A ocorrência de endometrite como consequência dos procedimentos cirúrgicos durante a fase preparatória foi observada apenas no animal 2, como relatado anteriormente. No entanto, deve-se atenção especial a esse animal, uma vez que o mesmo apresentou afecções como cisto folicular e endometrite na fase preparatória e experimental em relação aos outros animais que apresentaram endometrite pós-abate (animais 5 e 8), associa-se esta ocorrência com a contaminação do útero através da técnica de microlavagem uterina ou proliferação de bactérias oportunistas desencadeada por um processo inflamatório remanescente do procedimento cirúrgico. Um outro fator associado à endometrite, foi à alta ocorrência de inflamação do orifício de exteriorização dos cateteres (100%) como relatado. Para tanto, o orifício de exteriorização pode ter servido como via de acesso aos agentes contaminantes e facilitado à contaminação uterina pelo trajeto no quais os cateteres seguiram até sua implantação no lúmen uterino.

Ao contrário dos achados de Killian (1999) onde apenas 14% dos animais estudados apresentaram fibrina nas extremidades dos cateteres, a ocorrência no

presente estudo foi de 100% dos animais (animais 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) (Figuras 29 e 30 C).

Portanto, mesmo desconsiderando os três animais que apresentaram endometrite após o abate, o número de animais com fibrina na extremidade do cateter continuou alto (62,5%), podendo-se considerar que o acúmulo de fibrina formou uma barreira física comprometendo relativamente o processo de recuperação das microlavagens uterinas.

Relacionando os achados de necropsia com a taxa de prenhez de 0% nos animais estudados. Observou que as afecções parauterina (aderências, peritonite focal e exsudato inflamatório no trajeto dos cateteres) apresentaram ocorrências mais elevadas em relação às afecções uterinas (endometrites e fibrinas). A endometrite foi considerada a afecção uterina mais grave. Apresentando um processo infeccioso em 3 animais, originados da via de acesso instalada após a exteriorização dos cateteres. No entanto, nos demais animais foram observados no útero depósito de fibrina, considerado um dos sintomas do processo inflamatório. Esses achados podem estar relacionados com algum distúrbio fisiológico, contribuído assim para falhas no estabelecimento da gestação.

4.4 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

Os resultados relacionados à quantificação de células polimorfonucleares nos tecidos obtidos ao abate estão expressos nas figuras 31, 32, 33 e 34. Observou-se que os animais 2, 3 e 5 apresentaram mais que três células por $10^4 \mu\text{m}^2$ que caracteriza uma inflamação aguda de grau (2). Conforme Butt et al. (1991), Galindo

et al. (2003), Holt (1989), Hussain e Daniel (1992) e Watson et al. (1990), o mecanismo inicial de defesa do útero contra infecções bacterianas ocorre através da fagocitose e digestão das bactérias, principalmente por células polimorfonucleares. O exsudato inflamatório apresentado no lúmen uterino de vacas com endometrite após o abate, indicou um processo inflamatório que foi confirmado como agudo após quantificação de células polimorfonucleares.

Figura 31 – Fotomicrografia do endométrio bovino. Notar na seta as células polimorfonucleares distribuídas ao longo do endométrio, caracterizando endometrite aguda. Coloração em H.E., 40X

Com os resultados apresentados anteriormente, os animais 2, 3 e 5 apresentaram histórico que possibilitava a confirmação do processo inflamatório, principalmente quando relacionando com a mudança no aspecto do recuperado (microlavagens) serosanguinolento para turvo e presença de grumos. Apesar do número de afecções encontrada nos achados de necrópsia, à análise

histopatológica confirmou que os animais 2, 3 e 5 encontravam-se com uma inflamação aguda do tipo leve (grau 2).

Os valores médios da contagem de células polimorfonucleares para cada corte de tecido não ultrapassaram três células por $10^4 \mu\text{m}^2$. Assim, não identificou-se nenhuma região onde ocorreu inflamação aguda especificamente. Contudo, numericamente, a região ao redor do cateter implantado no corno uterino direito (corte 2) apresentou o maior número de células polimorfonucleares. Tal fato pode estar associado ao contato direto do cateter com o tecido uterino, principalmente pela movimentação constante do cateter promovendo uma irritação uterina no local.

Figura 32 – Contagem de células polimorfonucleares para cada animal (média $\pm$ EPM)

Figura 33 – Contagem de células polimorfonucleares para cada corte de tecido (média $\pm$ EPM)

- 1) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino esquerdo
- 2) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino direito
- 3) Região proximal à junção útero-oviduto no corno uterino direito
- 4) Região proximal ao ligamento intercornual do corno uterino direito
- 5) Região do corpo do útero

Figura 34 – Número de células polimorfonucleares (número/ $10^4\mu\text{m}^2$) para cada animal nos cortes de tecidos uterinos

- 1) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino esquerdo
- 2) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino direito
- 3) Região proximal à junção útero-oviduto do corno uterino direito
- 4) Região proximal ao ligamento intercornual do corno uterino direito
- 5) Região do corpo do útero

Os resultados relacionados à quantificação de células mononucleares nos tecidos obtidos ao abate estão expressos nas figuras 35, 36, 37 e 38. Observou-se que os animais 1, 4, 7, 8, e 9 apresentaram mais que três células por $10^4 \mu\text{m}^2$ comparados aos demais animais. Estes dados indicaram uma inflamação crônica de grau (2). A caracterização de uma inflamação crônica se faz através do aparecimento das células mononucleadas após a proliferação de leucócitos e inibição da atividade leucocitária. Veeplassches (1984) relatou que flutuações nas concentrações de hormônios esteróides circulantes nos vasos durante o ciclo estral podem influenciar na atividade leucocitária, como por exemplo, as altas concentrações de P_4 , que inibem a atividade fagocitária dos neutrófilos nos vasos e no útero.

Figura 35 – Fotomicrografia de endométrio bovino. Notar na seta as células mononucleares distribuídas ao longo do endométrio, caracterizando a endometrite aguda. Coloração em H.E., 40X

Dos cinco animais que apresentaram inflamação crônica (grau 2) no útero, apenas o animal 8 apresentou endometrite após o abate conforme os achados de necrópsia. A ausência de manifestação clínica de endometrite em indivíduos com endométrio apresentando alterações inflamatórias histológicas esta de acordo com as informações relatadas por Brus (1964), Neves (1976) e Vinha e Arias (1986) sobre a inexistência da associação de sintomas clínicos e lesões de endométrio, como também discordar das observações de Aragão et al. (1984) que observaram correlações significativas. Neste caso Drillich (2006) relatou que na ausência de sinais clínicos que caracterizaram endometrite crônica de grau leve (descarga de muco com aspecto turvo ou muco cristalino com flocos de pús e ausência de útero aumentado) e endometrite crônica severa (útero repleto de líquido e útero aumentado de tamanho, acompanhado de cervix dilatada e descarga mucupurulenta) pode ocorrer um tipo de endometrite, muito discutida pelos veterinários, chamada de endometrite sub-clínica. Estudos recentes descreveram o diagnóstico para a endometrite sub-clínica. A utilização de ultrassonografia possibilita a visualização de pequenas quantidades de líquidos intrauterinos. Contudo existe a possibilidade de resultados falsos positivos. Associados, por exemplo, ao aparecimento de mucos no período de estro. Outras técnicas de diagnóstico incluem a utilização de citologia uterina, obtida por esfregaços de lavados uterinos ou biopsia uterina. No entanto, essas técnicas não proporcionam facilidade na execução, principalmente a campo, além de necessitarem de materiais apropriados que pode gerar custo elevado (DRILLICH, 2006).

De fato, associação de evidências clínicas e histológicas do ambiente endometrial torna-se importante no exame clínico do aparelho genital, uma vez que

as alterações histológicas endometriais e sinais clínicos podem refletir importantes mudanças na função do aparelho genital.

Em relação aos valores médios da contagem de células mononucleares para cada corte de tecido, observou-se a ocorrência de um processo inflamatório crônico de grau (2) nos cortes 2, 4 e 5. Com estes achados histopatológicos pôde-se inferir que o local que mais apresentou células mononucleares foi a região ao redor do cateter implantado no corno uterino direito, supõe-se que a reação inflamatória causada neste local pode ter ocorrido pelo trauma realizado na implantação dos cateteres, ou no excesso de movimentação dos cateteres ao longo do experimento, uma vez que os mesmos não foram fixados na pele do animal e apenas na serosa uterina. Além disso, pode-se inferir também, que o processo inflamatório acentuado nesta região foi conseqüente da migração de agentes contaminantes vindo do exterior do animal (orifício de exteriorização dos cateteres realizado na pele do animal) que não apresentou cicatrização total.

Figura 36 – Contagem de células mononucleares para cada animal (média ± EPM)

Figura 37 – Contagem de células mononucleares para cada corte de tecido (média $\pm$ EPM)

- 1) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino esquerdo
- 2) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino direito
- 3) Região proximal à junção útero-oviduto no corno uterino direito
- 4) Região proximal ao ligamento intercornual do corno uterino direito
- 5) Região do corpo do útero

Figura 38 – Número de células mononucleares (número/ $10^4 \mu\text{m}^2$) para cada animal nos cortes de tecidos

- 1) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino esquerdo
- 2) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino direito
- 3) Região proximal à junção útero-oviduto do corno uterino direito
- 4) Região proximal ao ligamento intercornual do corno uterino direito
- 5) Região do corpo do útero

Após a quantificação de glândulas endometriais normais e dilatadas (Figuras 39 e 40), observou-se que o animal 7 apresentou um número de glândulas endometriais maior em relação aos outros animais estudados (10 glândulas/ $10^5\mu\text{m}^2$). Já o animal 2 apresentou o menor número de glândulas endometrias (4,34 glândulas/ $10^5\mu\text{m}^2$). O animal 4 apresentou o maior número de glândulas dilatadas (5,84 glândulas/ $10^5\mu\text{m}^2$) comparado com os demais animais. Já os animais 2 e 8 apresentaram quantidades de glândulas endometriais dilatadas abaixo de 1 glândula/ $10^5\mu\text{m}^2$ (Figuras 41 e 42)

Um terço dos animais estudados apresentaram com os valores médios de glândulas dilatadas acima de 50%.

Analisando a quantidade de glândulas endometriais por corte de tecido (Figuras 42 e 44), a região proximal à junção útero-oviduto no corno uterino direito apresentou maior quantidade de glândulas endometriais comparada com as demais regiões que mantiveram uma média de 6,36 glândulas/ $10^5\mu\text{m}^2$. Ao contrário, pode-se observar que o número de glândulas dilatadas por corte de tecido, apresentou um valor médio inferior a 50% do total de glândulas endometriais. O menor valor de glândulas endometriais dilatadas foi apresentado na região proximal à junção útero-oviduto (19,91%) e maior valor foi a região proximal ao ligamento intercornual do corno uterino direito (43,67%).

Figura 39 – Fotomicrografia do endométrio bovino. Notar na seta as glândulas endometriais normais. Coloração em Tricomo de Gomory, 40X

Figura 40 – Fotomicrografia do endométrio bovino. Notar na seta as glândulas endometriais dilatadas. Coloração em Tricomo de Masson, 40X

Figura 41 – Contagem de glândulas endometriais (normais, dilatadas e totais / $10^5 \mu m^2$) para cada animal (média $\pm$ EPM)

Figura 42 - Contagem de glândulas endometriais (normais, dilatadas e totais / $10^5 \mu m^2$) para cada corte de tecido uterino (média $\pm$ EPM)

- 1) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino esquerdo
- 2) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino direito
- 3) Região proximal à junção útero-oviduto no corno uterino direito
- 4) Região proximal ao ligamento intercornual do corno uterino direito
- 5) Região do corpo do útero

Figura 43 – Proporção do número de glândulas dilatadas sobre o número total de glândulas para cada animal (%)

Figura 44 – Proporção do número de glândulas dilatadas sobre o número total de glândulas para cada corte de tecido uterino (%)

- 1) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino esquerdo
- 2) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino direito
- 3) Região proximal à junção útero-oviduto no corno uterino direito
- 4) Região proximal ao ligamento intercornual do corno uterino direito
- 5) Região do corpo do útero

Os resultados relacionados à quantificação de glândulas com fibroplasia periglandular nos tecidos obtidos ao abate estão expressos nas figuras 45, 46, 47, 48 e 49.

Pode-se observar que o número de glândulas com fibroplasia periglandular (i.e., apresentando $n \geq 3$ camada de fibrócitos) foi menor no animal 4 (0,43 glândula/ $10^5 \mu\text{m}^2$) e maior no animal 8 (3,14 glândula/ $10^5 \mu\text{m}^2$).

Figura 45 – Fotomicrografia de endométrio bovino. Evidenciar na seta fibroplasia periglandular (fibrócitos ao redor das glândulas endometriais). Coloração em H.E., 40X

Figura 46 – Contagem de glândulas com fibroplasia periglandular para cada animal (média $\pm$ EPM)

Quando foi analisado o número de glândulas com fibroplasia periglandular por corte de tecido, notou-se que a região proximal ao ligamento intercornual do corno uterino direito continha o maior número de glândulas com fibroplasia (2,68 glândula/ $10^5 \mu\text{m}^2$).

Figura 47 – Contagem de glândulas com fibroplasia periglandular para cada corte de tecido (média $\pm$ EPM)

- 1) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino esquerdo
- 2) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino direito
- 3) Região proximal à junção útero-oviduto no corno uterino direito
- 4) Região proximal ao ligamento intercornual do corno uterino direito
- 5) Região do corpo do útero

Figura 48 – Proporção do número de glândulas fibrosadas sobre o número total de glândulas para cada animal (%)

Figura 49 – Proporção do número de glândulas fibrosadas sobre o número total de glândulas para cada corte de tecido (%)

- 1) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino esquerdo
- 2) Região ao redor do cateter implantado no corno uterino direito
- 3) Região proximal à junção útero-oviduto no corno uterino direito
- 4) Região proximal ao ligamento intercornual do corno uterino direito
- 5) Região do corpo do útero

Analisando as alterações glandulares, pode-se supor que as mudanças morfológicas glandulares e endometriais foram desencadeadas por oclusão do lúmen das glândulas afetadas, causando acúmulo de secreções no lúmen de algumas glândulas. Essas transformações endometriais não diferiram do verificado por Cupps et al. (1973), os quais salientaram que o trauma do endométrio como resultado do parto ou infecção uterina está associado com reorganização endometrial. Em alguma instância, durante o processo de cicatrização subsequente do lúmen, onde algumas glândulas tornam-se ocluídas.

Integrando os achados histopatológicos de glândulas dilatadas e fibroplasia periglandular, podê-se inferir que não houve associação entre essas variáveis. Os animais que apresentaram inflamação aguda (animal 2, 3 e 5) tiveram uma dilatação glandular variando de 17 à 58% e maior número de fibroplasia periglandular (21 à 68%). Já os animais que apresentaram inflamação crônica o número de glândulas dilatadas variou de 8 à 65% e fibroplasia periglandular de 9,2 à 59,8%. Embora a inflamação e fibrose possam prejudicar o funcionamento normal do endométrio, em alguns animais a infiltração celular (processo inflamatório) pode ser eliminada permanecendo apenas a fibroplasia periglandular, que na maioria dos casos, quando considerados de grau severo podem favorecer a infertilidade do animal (GONZÁLEZ et al., 1985).

As alterações demonstradas por achados histopatológicos associados com os achados de necrópsia confirmaram que apesar do número de afecções, o tecido uterino encontrava-se apenas com uma inflamação aguda ou crônica de grau leve (grau 2), comprovando a capacidade do útero de combater infecções ou processo inflamatório decorrido por traumas. Um fator negativo que pode ter impossibilitado o combate ao processo inflamatório foi o uso de antibióticos predominantemente

após os microlavados uterinos, funcionando como inibidores da resposta uterina a agressões microbianas (BORDIN, 2000).

Associando as variáveis, inflamação aguda e crônica dos achados histopatológicos com a taxa de prenhez. Sugere-se que o processo inflamatório pode ter contribuído para o aumento das concentrações de prostaglandina E2 (PGE) e prostaglandina F2-alfa (PGF2 α), promovendo a regressão precoce do corpo lúteo ou à luteólise, estendendo a fase luteal (HERATH et al. 2006). Outro fator que deve ter influenciado na manutenção da gestação, foi o elevado número de glândulas fibrosadas e dilatadas. Estas fibroplasias e dilatações glandulares ocorreram devido ao processo de reorganização endometrial iniciado após a instalação do processo inflamatório. Prejudicando assim a secreção de moléculas essenciais para a nutrição do conceito.

[illegible]

Tabela 2 - Ocorrência das variáveis relacionadas às microlavagens uterinas (fase experimental)

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grupo (C/T)	T	T	T	T	C	T	C	C	T
Variáveis									
Taxa de recuperação do microlavado – (%)	86,11	54,93	48,26	58,12	35,20	51,00	73,95	52,70	0
Intervalo entre a cirurgia e abate (dias)	81	86	38	57	67	38	52	59	30
Ocorrência de grumos no microlavados no dia 14 (sim/não)	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	
Ocorrência de grumos no microlavados no dia 16 (sim/não)		Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	
Ocorrência de grumos no microlavados no dia 18 (sim/não)	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	
Ocorrência de grumos no microlavados no dia 20 (sim/não)	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	
Ocorrência de microlavados serosanguinolentos no dia 14 (sim/não)	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	
Ocorrência de microlavados serosanguinolentos no dia 16 (sim/não)		Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	
Ocorrência de microlavados serosanguinolentos no dia 18 (sim/não)	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	
Ocorrência de microlavados serosanguinolentos no dia 20 (sim/não)	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	
Ocorrência de microlavados turvo no dia 14 (sim/não)	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	
Ocorrência de microlavados turvo no dia 16 (sim/não)		Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	
Ocorrência de microlavados turvo no dia 18 (sim/não)	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	
Ocorrência de microlavados turvo no dia 20 (sim/não)	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	

Tabela 3 - Ocorrência das variáveis relacionadas aos achados de necrópsia (fase experimental)

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grupo (C/T)	T	T	T	T	C	T	C	C	T
Variáveis									
Peritonite focal (sim/não)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Hiperemia de serosa uterina (sim/não)	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Exsudato inflamatório (sim/não)	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	nao
Aderência útero-visceral (sim/não)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Aderência intercornual (sim/não)	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
Aderência ovário direito (sim/não)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Aderência ovário esquerdo (sim/não)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Endometrite no abate (sim/não)	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não
Fibrina envolvendo o cateter (sim/não)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Tabela 4 - Ocorrência das variáveis relacionadas aos achados histopatológicos (fase experimental)

Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grupo (C/T)	T	T	T	T	C	T	C	C	T
Variáveis									
n ≥ 3 céls. Polimorfonucleares (sim/não)	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
n ≥ 3 céls. mononucleares	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Proporção de glândulas dilatadas (%)	31,92	17,04	32,52	65,34	58,24	56,68	20,53	8,72	12,50
Proporção de fibroplasia periglandular (%)	53,4	68	57	9,2	21,4	44	28,2	59,8	26,6

Tabela 5 – Escores atribuídos às variáveis por animal relacionadas à fase preparatória e experimental.

	Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Grupo (C/T)	T	T	T	T	C	T	C	C	T
	Variáveis									
ESCORE DAS VARIÁVEIS TOTAIS / ANIMAL	¹ Afecções no procedimento. cirúrgico	1	0	1	1	0	1	1	0	1
	² Taxa de recuperação	2	1	0	1	0	0	1	0	
	³ Intervalo entre a cirurgia e o abate	0	0	2	1	0	2	1	1	0
	⁴ Ocorrência de alteração no microlavado	2	0	1	2	0	2	0	1	
	⁵ Achados de necropsia	0	0	1	0	0	0	0	1	1
	⁶ Número de céls. polimorfonucleares	0	1	1	0	1	0	0	0	0
	⁷ Número de céls. mononucleares	1	0	0	1	0	1	1	1	1
	⁸ Proporção de glândulas dilatadas	1	2	1	0	0	0	1	2	2
	⁹ Proporção de fibroplasia periglandular	0	0	0	2	1	1	1	0	1
	¹⁰ Escore total (0 a 16)	7	4	7	8	2	7	6	6	6

¹Afecções no procedimento cirúrgico: 0 = mas que cinco afecções; 1 = de cinco a três afecções; 2= de zero a duas afecções.

²Taxa de recuperação: 0 = $\leq 60\%$ de recuperação do líquido infundido; 1 = de 61 à 80% de recuperação do líquido infundido; 2= $\geq 80\%$ de recuperação do líquido infundido.

³Intervalo entre a cirurgia e o abate: 0 = ≥ 60 dias; 1 = de 40 a 59 dias; 2= ≤ 39 dias.

⁴Ocorrência de alteração no microlavado: 0 = ≥ 7 alterações; 1 = de 4 à 6 alterações; 2 = ≤ 3 alterações.

⁵Achados de necropsia: 0 = ≥ 6 achados; 1 = de 3 à 5 achados; 2 = ≤ 2 achados.

⁶Número de céls. polimorfonucleares: 0 = ≥ 3 células; 1 = ≤ 2 células.

⁷Número de céls. mononucleares: 0 = ≥ 3 células; 1 = ≤ 2 células.

⁸Proporção de glândulas dilatadas: 0 = $\geq 50\%$ de glândulas; 1 = de 20 à 49% de glândulas; 2= até 20% de glândulas.

⁹Proporção de fibroplasia periglandular: 0 = $\geq 50\%$ de glândulas; 1 = de 20 à 49% de glândulas; 2= até 20% de glândulas.

¹⁰Somatória dos escores de Afecções no procedimento cirúrgico, Taxa de recuperação, Intervalo entre a cirurgia e o abate, Ocorrência de alteração no microlavado, Achados de necropsia, Número de céls. polimorfonucleares, Número de céls. mononucleares, Proporção de glândulas dilatadas, Proporção de fibroplasia periglandular.

Analisando-se os escores das variáveis totais/animal na fase preparatória e experimental, observou-se que os resultados poderiam ser divididos em quatro grupos:

Grupo 1: Animais que apresentaram percentual de escore $\geq$ a 50% em relação as variáveis estudadas (animal 4).

Grupo 2: Animais que apresentaram percentual de escore $\leq$ 49% em relação as variáveis estudadas (animais 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 9).

Grupo 3: Variáveis que apresentaram percentual de escore $\geq$ 50% (Proporção de glândulas dilatadas e número de células mononucleadas).

Grupo 4: Variáveis que apresentaram percentual de escore $\leq$ 49% (Afecção no procedimento cirúrgico, taxa de recuperação, intervalo entre a cirurgia e o abate, ocorrência de alteração no microlavado, achados de necrópsia, número de células polimorfonucleares e proporção de fibroplasia periglandular).

Baseando-se na soma total de escores dos grupos estabelecidos acima, observou-se que os procedimentos cirúrgicos afetaram negativamente todos os animais.

O grupo 1 e 3 foram os que apresentaram melhores resultados, no entanto apenas o animal 4 e as variáveis proporção de glândulas dilatadas e número de células mononucleadas apresentaram o percentual de escore $\geq$ 50%. Já os grupos 2 e 4, foram os que apresentaram os piores resultados,. As variáveis achados de necrópsia e contagem de células polimorfonucleares foram as que se destacaram com os menores percentuais de escore 16,66% e 33,33% respectivamente. Sugere-se que para alcançar resultados positivos referentes ao procedimento

cirúrgico adotado e taxa de prenhez, a escolha de animais sadios reprodutivamente e a eliminação da via de acesso para agentes contaminantes (orifício de exteriorização dos cateteres) pode ser muito importante, principalmente no que se refere ao sucesso na obtenção de fluidos uterinos em diferentes dias do ciclo estral e da prenhez inicial de modo permitir uma análise sistemática e contínua das secreções do microambiente uterino principalmente durante o período crítico.

CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES

6 CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES

Ao final do presente estudo foi possível concluir que as principais alterações pós-cirúrgicas apresentadas foram: má cicatrização do orifício de exteriorização dos cateteres, endometrites, depósitos de fibrinas (grumos) e remoção do fluido uterino envolvido no diálogo materno-fetal.

Houve diferenças individuais no tipo e intensidade das afecções observadas, indicando que diferentes animais possuem diferentes respostas a um mesmo procedimento. Desta forma, ficou evidente que a escolha de animais sadios reprodutivamente ao início do experimento teria sido muito importante.

A abordagem cirúrgica para colheita do fluido intrauterino pode ter alterado negativamente o ambiente uterino que se tornou incompatível com o estabelecimento da prenhez.

Diante de tais achados, sugere-se que as alterações causadas pela implantação cirúrgica de cateteres intrauterinos com o objetivo de estudar o microambiente uterino comprometeram o mesmo de tal forma que torna-se pouco recomendável a utilização do método. Portanto, sugere-se que estudos visando a elucidação do diálogo bioquímico materno-fetal sejam feitos utilizando-se técnicas menos invasivas, nas quais analisa-se o fluido uterino através de lavados uterinos obtidos pela utilização sonda de *Foley (in vivo)* ou lavados do lúmen uterino realizado após o abate.

REFERÊNCIAS

- AKNAZAROV, B. K. Study of humoral factors of local protective functions in cows. **Veterinariya**, v. 8, p. 41-43, 1988.
- 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.
- ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira- FNP**. São Paulo: Consultoria & Comércio, 2005. 340 p.
- AYALON, N. "A review of embryonic mortality in cattle." **Journal Reproduction Fertility** v. 54, p. 483-493, 1978.
- BANKS, W. J. Sistema reprodutor feminino. In: _____. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. cap. 27, p. 565-588.
- 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. Q. **Avaliação da capacidade funcional dos neutrófilos pela técnica da quimiotaxia em éguas susceptíveis e resistentes as endometrites**. 1997. 114 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Paulista "Júlio Mesquita", Botucatu, 1997.
- BARTOL, F. F.; ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W.; LEWIS, G. S.; GODKIN, J. D.; THACHER, W. W. Characterizaion of proteins produced in vitro by periattachment bovine conceptus. **Biology Reproduction**, v. 32, p. 681-693, 1985.
- BARTOL, F. F.; THATCHER, W. W.; LEWIS, G. S.; BLISS, E. L. L.; DROST, E.L.; BAZER, F. W. Effects of estradiol-17 β on PGF and total protein content in bovine uterine flushings and perpheralblood concentrations of 13,14-dihydro-15keto PGF2 α . **Theriogenology**, v. 15, p. 345-358, 1981.
- 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)
- BEHMER, O. A. *et al.* **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1976.

BERENDT, F. J.; FROHLICH, T.; SCHMIDT, S. E.; M., REICHENBACH, H. D.; WOLF, E.; ARNOLD, G. J. Holistic differential analysis of embryo-induced alterations in the proteome of bovine endometrium in the preattachment period. **Proteomics**, v. 5, p. 2551-2560, 2005.

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.

BINELLI, M. Estratégias Anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H. **Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. Local: editora, 2000. p. 99-114. (apresentado no Simpósio de controle farmacológico em Ruminantes).

BORDIN, E. L. Algumas considerações sobre o "Complexo metrite-endometrite-piometra", patogenia clínica e controle. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 4., 2000, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, 2000. p. 32-37.

BOSS, A.; AHLERS, D. Endometrities caused by a foreign body in a cow. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 101, n. 9, p. 353-354, 1994.

BOUTERS, R.; VANDEPLASSCHE, M. Postpartum infection in cattle. Diagnosis and preventive and curative treatment. **Journal of the South African Veterinary Medical Association**, v. 48, p. 237-239, 1977.

BRADFORD, G. E. Contributions of animal agriculture to meeting global human food demand. **Livestock production Science**, v. 59 p. 95-112, 1999.

BUTT, B. M.; BESSRE, T. E.; SENGER, P. L. P. R. Specific antibody to *Haemophilus sommus* in the bovine uterus following intramuscular immunization. **Infectology Immunology**, v. 61, p. 2558-2562, 1993.

BUTT, B. M.; SENGER, P. L.; WIDDERS, P. R. Neutrophil migration into the bovine uterine lumen following intrauterine inoculation with killed *Haemophilus sommus*. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 93, p. 341-345, 1991.

CALLESEN, H.; LOVENDAHL, P.; BAK, A.; GREVE, T. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v.73, n.6, p.1539-43, 1995.

CARTMILL, J. A.; LE-ZARKOUNY, S. Z.; HENSLEY, B. A.; ROZELL, T. G.; SMITH, J. F.; STVENSON, J. S. An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperatures before or after calving or both. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 799-806, 2001.

CORBEIL, L. B.; SCHRIG, J. R.; DUNCAN, J. R.; CORBEIL, R. R. WINTER, A. J. Immunoglobulin classes and biological function of *Campylobacter* (Vibrio) fetus antibodies in serum and cervicovaginal mucus. **Infectology Immunology**, v. 10, p. 422-429, 1974.

CHRISTIANSON, W. T.; Stillbirths mummies abortions and early embryonic death. The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice, v. 8, p. 623 - 639, 1992.

CURTAIN, C. C.; CLARK, B. L.; DUFTY, J. H. The origins of the immunoglobulins in the mucus secretions of cattle. **Clinical Experimental Immunology**, v. 8, p. 335-344, 1971.

CUPP, A. A.; STUMPF, T. T.; KOJIMA, F. N.; WETH, L. A.; WOLFE, M. W.; BOBERSON, M. S.; KITOOK, R. J.; KINDER, J. E. Secretion of gonadotropins changes during the luteal phase of the bovine oestrous cycle in the avsence of corresponding changes in progesterone or 17 β -oestradiol. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 2, p. 109-119, 1995.

DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. In:_____. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 397 p.

DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, v. 121, p. 41-49, 2001.

DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; DOBSON, H.; MONTGOMERY, J.; ELLIS, W. A.; BAKER, J. Presence of antigen and antibodies in serum and genital discharges of heifers after intrauterine inoculation of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. **Research Veterinary Science**, v. 60, p. 157-162, 1996a.

DHALIWAL, G. S., MURRAY, R. D., DOBSON, H., MONTGOMERY, J., ELLIS, W. A. Presence of antigen and antibodies in serum and genital discharges of cows from dairy herds naturally infected with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. **Research Veterinary Science**, v. 60, p. 163-167, 1996b.

DEMCZUK, Estefano, KOZICKI, Luiz Ernandes, PONTELLI, Edilson Santos et al. Embryotransfer in Simmental cows in northwest Paraná and South of Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, vol.35, no.4, p.34-45, 1998.

DINIZ, E.G.; JACOMINI, J.O. Transferência de embriões bovinos. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. 11., Belo Horizonte, 1995. Anais. Belo Horizonte : Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.423.

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.

DRILLICH, M. An update on uterine infections in dairy cattle. **Slovenian Veterinary Research**, v. 43, n. 1, p. 11-15, 2006.

DUNCAN, J. R.; WILKIE, B. N.; HIESTAND, F.; WINTER, A. J. The serum and secretory immunoglobulins of cattle: characterisation and quantitation. **Journal Immunology**, v. 108, p. 965–976, 1972.

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.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**: 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997 p. 147– 55.

FARIAS JR., D.F. **Efeitos da ovariectomia, aplicação de anel de látex no pedículo ovariano e dispositivo intra-uterino no ganho de peso, características da carcaça e carne em novilhas e vacas destinadas ao abate..** 2000, 76 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2000.

FRANK, T.; ANDERSON, K. L.; SMITH, A. R.; WHITMORE, H. L.; GUSTAFSSON, B.K. Phagocytosis in the uterus: a review. **Theriogenology**, v. 20, p. 103–111, 1983.

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..** 2006. 123 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FORDYCE, G.; JUBB, T. F.; FITZPATRICK, L. A.; WHYTE, T. R.; COOPER, N. J.; BOLAM, M. J.; HADDON, D.J.; HILL, F.; D'OCCHIO, M.J. Contraceptive efficacy of na intra-uterine device in Brahman cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 3-4, p. 193-204, 2001.

GALINDO, A. S. D.; KUNZ, T. L.; GAMBARINI, M.L.; FILHO, B. D. O. Mecanismo de defesa uterino na fêmea bovina. **Revista CFMV**, n. 30, p. 49-58, 2003.

GARRET, J. E.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; MORGAN, G. L. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, p. 437-446, 1988.

GEORGIV, S. Study of the general immunologic response and microbial content of the uterus of cows in the puerperal period. **Veterinary Science**, v. 15, p. 69–77, 1978.

GONZALEZ, H. E.; CROWELL, W. A.; CAUDLE, A.B.; THOMPSON, F. N. Morphometric studies of the bovine uterus; Microscopic lesions and retrospective history. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 12, p. 2588-2595, 1985.

GRIFFIN, J. F. T.; HARTIGAN, P. J.; NUNN, W. R. Nonspecific uterine infection and bovine fertility I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks postpartum. **Theriogenology**, v.1, p. 91–106, 1974.

GROSS, T. S.; PLANTE, C.; THATCHER, W. W.; HANSEN, P. J.; HELMER, S. D.; PUTNEY, D. J. Secretory proteins of the bovine conceptus alter endometrial prostaglandin and protein secretion *in vitro*. **Biology Reproduction**, v. 39, p. 977-987, 1988.

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

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R. Reproductive cycles. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 55-66.

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.

HANSEL, W.; McENTEE, K. The female reproductive process. In: SWENSON, M. J. **Dukes physiology of domestic animals**. 9. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1977. p. 773-800.

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.

HOLT, L. C.; WHITTIER, W. D.; GWAZDAUSKAS, F. C.; VINSON, W. E.; SPONENBERG, P. S. Involution, pathology and histology of the uterus in dairy cattle with retained placenta and uterine discharge following GnRH. **Animal Reproduction Science**, v. 21, p. 11-23, 1989.

HORTON, G. M. J.; STRICKLIN, W. R.; MANNS, J. G. Intravaginal devices for feedlot heifers. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 915-917, 1979.

HUMBLLOT, P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. **Theriogenology**, v. 56, p. 1417-1433, 2001.

HUSSAIN, A. M.; DANIEL, R. C. Bovine normal and abnormal reproductive: A review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 26, p. 101-111, 1991.

HUSSAIN, A. M.; DANIEL, R. C.; Phagocytosis by uterine fluid and blood neutrophils and hematological changes in postpartum cows normal and abnormal parturition. **Theriogenology**, v. 32, p. 1253-1267, 1992.

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.

IRITANI, A.; GOMES, W. R.; Van DENMARK, N. L. Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in ewes. **Biology Reproduction**, v. 1, p. 77-82, 1969.

JANOWITZ, U. Untersuchungen zu Einflussfaktoren auf den Transfererfolg bei Empfängern im Rahmen des Embryotransfers beim Rind. **Animal Breeding Abstracts**, v.63, n.6, p.402, 1995. Resumo 2826.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C. The female genital system: In **Pathology of domestic animals**. 2. ed. San Diego, CA: Academic Press, 1970. p. 487–573.

KANEKO, S.; MIYOSHI, M.; ABUKAMA, T.; YAMANAKA, S.; MOCHIZUKI, M., YOSHIHARA, S. Effect of retained placenta on subsequent bacteriological and cytological intrauterine environment and reproduction in Holstein dairy cows. **Theriogenology**, n. 4, v. 48, p.617-23, 1997.

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, p. 349–470, 1993.

KLUND, T. Semen straw (French straw) in the uterus. **Nordisk Veterinaermedicin**, v. 29, n. 3, p. 124-127, 1977.

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.

KÜBAR, H.; JALAKAS, M. Pathological changes in the reproductive organs of cows and heifers culled because of infertility. **Journal Veterinary medicine Series A**, v. 49, p. 65-372, 2002.

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

LAMBERT, E.; WILLIAMS, D. H.; LYNCH, P. B. et al. The extent and timing of prenatal loss in gilts. **Theriogenology**, v. 36, p. 655-665, 1991.

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.

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

MADUREIRA, E. H.; PIMENTEL, J. R. V.; ALMEIDA, A. B.; ROSSA, L. A. F. Sincronização com progestágenos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...**, São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004, p. 117-128.

MALAYER, J. R.; HANSEN, P. J.; BUHI, W. C. Effect of day of the oestrous cycle, side of the reproductive tract and eat shock on in vitro protein secretion by bovine endometrium. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 84, p. 567-578, 1988.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, P. E.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 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.; ROBISON, R. S.; WHATES, D. C. The regulation of interferon γ . Production and uterine receptors during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 317-328. 1999.

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.

MARTINS, C. F.; VASQUES, L.; NEIS, F.; TARDIN, M.; VISIOLY, V.; FERNANDES, C. E. Biópsia endometrial em vacas *Bos indicus* em regime extensivo de criação com problemas de fertilidade. **Ensaio e Ciência**, v. 6, p. 13-33, 2002.

MASLAR, I. A.; POWERS-CRADDICK, 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.

MASSONE, F. **Atlas de anestesiologia veterinária**. São Paulo: Editora Roca, 2003.

MATSUDA, H.; OKUDA, K.; IMORI, T. Tissue concentrations of eosinophils in the bovine oviduct and uterus at different stages of the oestrous cycle. **Research in Veterinary Science**, v. 34, p. 369-370, 1983.

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.

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.

MORROW, D. A. Postpartum ovarian activity and involution of the uterus and cervix in dairy cattle. **Veterinary Scope**, v. 19, p. 2–13, 1969.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. **The viscera of the domestic mammals**. 2. ed, Berlin-Hamburg: Verlag Paul Parey. 1979. 317 p.

NOAKES, D. E. Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. In: NOAKES, D. E.; PARKINSON, T. J.; ENGLAND, C. G. W. **Arthur's veterinary reproduction and obstetrics**. 8. ed. London: Saunders, 2001. cap. 1, p. 2-53.

OLDS, D.; VAN DENMARK, N. L. Composition of lumenal fluids of bovine female genitalia. **Fertility and Sterility**. v. 18, p. 603-607, 1957.

OLIVEIRA FILHO, B. D. **Involução uterina na vaca**. Jaboticabal [B. D. Oliveira Filho] 1996. 25 p. (Monografia apresentada a - Faculdade de Ciências Agrárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal).

OLIVEIRA FILHO, B.D.; SILVA, H.L.; GAMBARINI, M.L.; GORDO, J.M.L. Utilização do dispositivo intra-uterino em vacas: avaliação do ganho de peso. In: CONBRAVET, 26., 1999, Campo Grande, MS, **Anais...** Campo Grande, MS, [n. s.], 1999. 1 CD-ROM.

OLIVEIRA, P.G.; VISINTIN, J.A.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C. Efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH) e da gonadotrofina da menopausa humana (hMG) como agentes superovulantes em tratamentos sucessivos de vacas da raça Holandesa, variedade preta e branca, utilizadas em transferência de embriões. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.31, n.3/4, p.288-94, 1994.

OTHANI, S.; OKUDA, K.; NISHIMURA, K.; MOHRI, S. Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 39, p. 1033-1042, 1993.

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.

PITURRU, P.G. **Embryotransfer bei Piemonteser-Rindern nach Superovulationseinleitung mit PMSG/Anti-PMSG sowie mit verschiedenen FSH-Präparaten unterschiedlicher Dosierung**. Hannover, 1994. 91p. Tese (Doutorado) – Tierärztliche Hochschule Hannover.

POLDING, J. B.; LALL, H. K. Some genital abnormalities of the Indian cow and buffalo with reference to anatomical differences in their reproductive organs. **Indian Journal of Veterinary Science**, v. 15, n. 3, p. 178-182, 1945.

PRIEDKLNS, J.; LEISER, R. Female reproductive system. In: DELLMANN, H. D.; EURELL, J. **Textbook of veterinary histology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. p. 247-286.

ROMANIUKOWA, K. Phagocytosis in the uterus. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, **10.**, **1984**, Urbana Champaign. **Proceedings ... 1984** v. 4, n. 11, p. 30-33. 1984.

REBHUN, W. C. Reproductive diseases. In: **Disease of dairy cattle**. Baltimore: Williams, Wilkins, 1995. p. 309-352.

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.

SCHULTZ, R. H.; FAHNING, M. L.; GRAHAN, E. F. A chemical study of uterine fluid and blood serum of normal cows during the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 27, p. 355-367, 1971.

HERATH, S.; FISHER, D. P.; WERLING, D.; WILLIAMS, E. J.; LILLY, S. T.; DOBSON, H.; BRYANT, C. E.; SHELDON, M. Expression and function of toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 562 - 570, 2006.

SCENNA, F. N.; EDWARDS, J. L.; ROHRBAHC, N. R.; HOCKETT, M. E.; SAXTON, A. M.; SCHRICK, F. N. Detrimental effects of prostaglandin F2alpha on preimplantation bovine embryo. **Prostaglandin other lipid mediators**, v. 73, n. 3-4, p. 215 - 226, 2004.

SCENNA, F. N.; HOCKETT, M. E.; TOWNS, T. M.; SAXTON, A. M.; ROHRBAHC, N. R.; Whrman, M.E.; SCHRICK, F. N. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. **Prostaglandin other lipid mediators**, v. 78, p. 38 - 35, 2005.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**, 2. ed. Pullman: Current Conceptions, 2002. 281 p.

SISSON, S. Aparelho Urogenital. In: GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. cap. 31, p.879 - 895.

SONCINI, M. I. Imunologia. **Revista de Ensino de Ciência**, n. 20, p. 21-28, 1988.

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, 2000 United States. **Proceedings...** [s. l.: n. s.], 2000. p. 335

STINSON, M. W.; WEBER, A. F.; ZEMJAMIS, R. The bovine endometrium. – An electron microscopic study. **American Journal of Veterinary Research**, v. 23, n. 97, p. 1164-1182, 1962.

SUNDARAVADANAN, V. K.; VENKATASWAMY, V. Histology and histochemistry of bovine uterus. **Indian Journal of Animal Science**, v. 43, n. 12, p. 1050-1053, 1973.

SZÉCHY, M. L. M.; BENEVIDES FILHO, I. M.; SOUZA, L. M. Idade ao primeiro parto, intervalo de partos e peso ao nascimento de um rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, v. 2, n. 2, p. 47-49, 1995.

THATCHER, W. W.; HANSEN, P. J. Systems to alter embryo survival. In: VAN HORN, H. H.; WILCOX, C. J. **Large dairy herd management**. Champaign: American Dairy Science Association, 1992. p. 16-30.

THATCHER, W. W.; MACMILLAN, K. L.; HANSEN, P. J. Embryonic losses:, cause and prevention. In: FIELDS, M. J.; SANDS, R. S. (Eds.) **Factors affeting calf crop**, Boca Ratib: CRC Press, 1994. p. 135–153.

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.

THIBIER, M.; NIBART, M. Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals. **Animal Reproduction Science**, v.28, n.1/4, p.139-48, 1992.

TIZARD, I. **Imunologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1985. 321 p.

TURNER, A. S.; MCILWRAITH, C. W. **Técnica cirúrgica em animais de Grande Porte**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. 341 p.

VANDEPLASSCHE, M. Stimulation and inhibition of phagocytosis in domestic animals. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND AI. **10.**, 1984, Urbana. **Proceedings...** v. 3, p. 475–477.

VANDEPLASSCHE, M., Bouters, R. Puerperal metritis in the bovine. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND AI. **4.**, 1976, Krakow, Poland. **Proceedings...** p. 660–666.

VANROOSE, G.; DEKRUIF, A.; VANSOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 131-143, 2000.

VISINTIN, J. A.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H. Superovulação de novilhas da raça Nelore com diferentes doses de FSH/LH e congelação de embriões pelo método *one-step* com etilenoglicol. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 36, n. 5, p. 267-272, 1999.

- VIVEIROS, A. T. M. **Fisiologia da reprodução de bovinos**. Lavras: UFLA, 1997. p. 62.
- WALES, R. G.; RESTALL, B. J. Uterus of ewe I. Secretion from the cannulated uterus. **Australian Journal of Biology Science**. v. 24, p. 1009-1021, 1971.
- WATSON, E. D.; DIEHL, N. K.; EVANS, J. F. Antibody response in the bovine genital tract to intrauterine infusion of *Actinomyces pyogenes*. **Research Veterinary Science**, v. 48, p. 70–75, 1990.
- 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.
- WHITMORE, H. L.; ARCHBALD, L. F. Demonstration and quantitation of immunoglobulins in bovine serum, follicular fluid, and uterine and vaginal secretions with reference to bovine viral diarrhea. **American Journal Veterinary Research**, v. 38, p. 455–457, 1977.
- WILDIMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E. et al. A dairy cow body condition score system and its relationship to select production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 495-501, 1982.
- WOODING F. B. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta**, v. 13, p.101–113. 1992.
- WRATHALL, A. E.; SUTMOLLER, P. Potencial of embryo transfer to control transmission of disease. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual of the international embryo transfer society**. Champaign: IETS, 1998. p. 17-44.