

Bruno Leonardo Mendonça Ribeiro

**Avaliação de tratamentos alternativos no controle das infertilidades uterinas em bovinos**

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

**Departamento:**

Clínica Médica

**Área de concentração:**

Clínica Veterinária

**Orientador:**

Profa. Dra. Lilian Gregory

De acordo: 

Orientadora

São Paulo  
2019

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

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

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3800  
FMVZ

Ribeiro, Bruno Leonardo Mendonça  
Avaliação de tratamentos alternativos no controle das infertilidades uterinas em bovinos / Bruno Leonardo Mendonça Ribeiro. – 2019.  
82 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Gregory.

1. Endometrite. 2. Células tronco. 3. Vacas. 4. Infertilidade. 5. Biomateriais. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de tratamentos alternativos no controle de infecções uterinas em bovinos", protocolada sob o CEUA nº 2489230217 (D-005994), sob a responsabilidade de **Lilian Gregory** e equipe; *Bruno Leonardo Mendonça Ribeiro* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 18/10/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of alternative treatments for the control of uterine infections in cattle", utilizing 180 Bovines (180 females), protocol number CEUA 2489230217 (D-005994), under the responsibility of **Lilian Gregory and team**; *Bruno Leonardo Mendonça Ribeiro* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/18/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 06/2017 a 06/2018

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 10 anos**

N: **180**

Linhagem: **Holandesa**

Peso: **250 a 1000 kg**

Local do experimento: **Fazenda Alvorada- Bragança Paulista**

São Paulo, 05 de novembro de 2018

Profa. Dra. Annelise de Souza Traidi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Ribeiro, Bruno Leonardo Mendonça

Título: Avaliação de tratamentos alternativos no controle das infertilidades uterinas em bovinos

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

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Dedico a minha maior incentivadora quem sempre acreditou em mim, minha mãe,  
Aurora Mendonça Ribeiro...

## AGRADECIMENTOS

A Deus criador e responsável pelo conhecimento das coisas mais simples às mais complexas. A minha eterna apoiadora, a quem devo tudo que sou, minha mãe.

À Profa. Dra. Lilian Gregory, pelo privilégio e a confiança depositada em mim para ser seu orientado durante a graduação, residência médica e pós-graduação, agradeço ao constante aprendizado, as conversas e boas risadas no convívio diário.

Ao grande responsável por me fazer gostar da vida acadêmica, exemplo de professor, de ser humano e humildade, Prof. Dr. Carlos de Sousa Lucci.

À Dra. Claudia Del fava que aceitou um estagiário no início da graduação sedento por conhecimento.

Aos meus amigos, Mário Reyes, pelas conversas da vida, correria de documentos. Enoch que mesmo nos EUA, foi fundamental para eu chegar a esse momento.

À minha irmã por todo seu carinho e conselhos sábios que me conhece mais do que eu mesmo e que apenas com um olhar me orienta.

À minha parceira e companheira, suportando minha inquietação, Geysa Almeida.

Ao Prof. Dr. Luiz Pfeifer que me ajudou em vários momentos, permitindo que utiliza-se os animais na Embrapa, segurando para que não fossem leiloados até o termino do estudo. Agradeço a toda sua equipe, Eliz, Jéssica que sempre estiveram presentes otimizando todo processo.

À Doutoranda Joice que me ajudou com a produção cultivo das células, como ela diz: “suas filhas.” À Margarita e ao professor Francisco do departamento de engenharia de biomateriais que me proporcionaram iniciar estudos com nanotecnologia.

Aos professores de ruminantes do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP: Alice Maria Meilville Paiva Della Libera, Fernando José Benesi, Enrico Lippi Ortolani, Maria Claudia Araripe Sucupira, Fábio Pogliani, Viviani Gomes pela convivência harmoniosa, conhecimentos transmitidos, além de todos os professores do Instituto Biológico de São Paulo, Alessandra Nassar, Maria do Carmo.

E principalmente a todos os animais, por possibilitarem a obtenção dos resultados apresentados neste trabalho e por terem servido de aprendizagem e ensinamentos, devo meu respeito.

## RESUMO

RIBEIRO, B.L.M. **Avaliação de tratamentos alternativos no controle das infertilidades uterinas em bovinos**. 2019. 82f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O desempenho reprodutivo insatisfatório em vacas é importante questão referente à produtividade, pois afeta a lucratividade do rebanho, levando à diminuição da produção leiteira e do número de bezerros. No pós-parto, doenças como a metrite e endometrite são prevalentes principalmente em animais com aptidão leiteira. Essas enfermidades, entre outras causas, podem dar origem a animais repetidores de serviço, “Repeat Breeding”, afetando negativamente o desempenho reprodutivo e conseqüentemente sua produção. Com o intuito de buscar novas formas de tratamento, em que não tenha resíduo no leite ou não gere resistência a antimicrobianos, atualmente muito se fala em terapias alternativas, como o uso de células tronco, ou mesmo o uso de biomateriais, baseado em nanotecnologia. Este estudo foi separado em dois experimentos; Experimento I – Uso de biomateriais no tratamento em 37 vacas de 25 a 40 dias pós parto, diagnosticadas com endometrite por meio da citologia, ultrassonografia e vaginoscopia; Experimento II- Uso de terapia celular, células tronco, em 9 vacas consideradas “Repeat Breeding”, que apresentavam degeneração endometrial, diagnosticada por exame histopatológico. Os resultados obtidos no experimento I demonstraram ótimos resultados quanto à cura dos animais submetidos ao tratamento com o biomaterial Limax comparado ao grupo controle, mostrando nível de significância em algumas variáveis ( $p < 0,001$ ). No experimento II, a suspeita de que as “Repeat Breeding” teriam degeneração endometrial se confirmou, excluindo as causas nutricionais, infecciosas e hormonais. Os animais submetidos ao tratamento com células tronco, apresentaram pela ultrassonografia Doppler cores, aumento na vascularização do parênquima uterino 30 dias após a infusão. Portanto, esse estudo apresentou a expansão de uso de novas tecnologias, que não agridem o ambiente e não trazem danos à saúde animal e do homem.

Palavras chave: Endometrite, células tronco, vacas, infertilidade, biomateriais.

## ABSTRACT

**RIBEIRO, B.L.M. Evaluation of alternative treatments for the control of uterine infertility in cattle.** 2019. 82f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Unsatisfactory reproductive performance in cows is an important issue regarding productivity, as it affects the profitability of the herd leading to a decrease in dairy production and the number of calves. In postpartum, diseases such as metritis and endometritis are prevalent mainly in animals with milk aptitude. These diseases, among other causes may give rise to repetitive breeding animals, "Repeat Breeding", negatively affecting the reproductive performance and consequently its production. In order to find new forms of treatment, in which there is no residue in the milk or does not generate resistance to antimicrobials, currently much is spoken about alternative therapies such as the use of stem cells or even the use of biomaterials based on nanotechnology. This study was separated in two experiments; Experiment I - Use of biomaterials in the treatment of 38 cows 25 to 40 days postpartum diagnosed with endometritis by means of cytology, ultrasonography and vaginoscopy; Experiment II- Use of cell therapy, stem cells, in 9 cows considered "Repeat Breeding", which present an endometrial degeneration, diagnosed by histopathology. The results obtained in the experiment I showed excellent results regarding the cure of the animals submitted to treatment with the Limax biomaterial compared to the control group, showing a level of significance in some variables ( $p < 0.001$ ). In Experiment II, the suspicion that the "Repeat Breeding" may be because endometrial degeneration was confirmed, excluding the nutritional, infectious and hormonal causes. The animals submitted to treatment with stem cells showed color Doppler ultrasonography, increased vascularity of the uterine parenchyma 30 days after infusion. Therefore, this study showed the expansion of use of new technologies, which do not harm the environment and do not harm human or animal health.

Key words: Endometritis, stem cells, cows, infertility, biomaterials.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amostras de secreções obtidas pela vagina.....	23
Figura 2 - Esquema do delineamento Experimento I.....	32
Figura 3 - (A) Espéculo vaginal, com catarro genital purulento grau III, exame de vaginoscopia. (B) Visualização da cérvix por meio do espéculo vaginal .....	34
Figura 4 - Figura 4:(A) Corte ultrassonográfico transversal mensurando cérvix; (B) Corte ultrassonográfico transversal indicando e mensurando corno esquerdo e direito .....	35
Figura 5 - (A-E): Caracterização do escore de vascularização de mesométrio e endométrio, Doppler cores. ....	36
Figura 6 - crescimento de colônia bacteriana meio Agar sangue .....	38
Figura 7 - Biomaterial sendo preparado para infusão no útero da vaca.....	39
Figura 8 - (A) Tecido endometrial glandular de vacas “Repeat Breeding”; (B) Tecido conjuntivo no parênquima uterino de vacas “Repeat Breeding”.....	43
Figura 9 - (A) Coleta de células tronco, intramedular região lombosacra; (B) Cultivo de células tronco.....	44
Figura 10 - (A) Pellet de célula tronco;(B) infusão intrauterina das células tronco.....	45
Figura 11 - Valores médios e erros-padrão da medida de ECC comparado os tratamentos com o controle ao longo do tempo.....	51
Figura 12 - Valores médios e erros-padrão do catarro genital comparando os tratamentos com o controle ao longo do tempo.....	52
Figura 13 - Valores médios e erros-padrão da medida de cérvix comparado comparando os tratamentos com o controle ao longo do tempo .....	53
Figura 14 - Valores médios e erros-padrão da medida de cornos uterinos comparado os tratamentos com o controle ao longo do tempo. ....	54
Figura 15 - Valores médios e erros-padrão da citologia, comparando os tratamentos com o controle ao longo do tempo.....	56
Figura 16 - Figura 17- Proporção de animais positivos para isolamentos por micro-organismo.....	57

## LISTA DE TABELA

Tabela 1-Relação de animais curados de acordo com o tempo e o tipo de tratamento..	46
Tabela 2-Valores médios e desvio-padrão das variáveis Escore de condição Corporal (ECC), catarro genital, cérvix, corno uterino esquerdo, corno uterino direito, Doppler cores e citologia endometrial em 10 animais submetidos ao tratamento Limax, avaliado em três diferentes tempos .....	47
Tabela 3-Valores médios e desvio-padrão das variáveis Escore de condição Corporal (ECC), catarro genital, cérvix, corno uterino esquerdo, corno uterino direito, Doppler cores e citologia endometrial em 12 animais submetidos ao tratamento Limax com quitosana, avaliados em três diferentes tempos.....	48
Tabela 4-Valores médios e desvio-padrão das variáveis Escore de condição Corporal (ECC), catarro genital, cérvix, corno uterino esquerdo, corno uterino direito, Doppler cores e citologia endometrial em seis animais submetidos ao tratamento quitosana, avaliado em três diferentes tempos.....	49
Tabela 5-Valores médios e desvio-padrão das variáveis Escore de condição Corporal (ECC), catarro genital, cérvix, corno uterino esquerdo, corno uterino direito, Doppler cores e citologia endometrial em nove animais submetidos ao tratamento controle, avaliado em três diferentes tempos.....	50
Tabela 6- Relação de micro-organismos isolados nos diferentes grupos.....	56
Tabela 7-Valores médios e desvio-padrão das variáveis Escore de condição Corporal (ECC), corno uterino esquerdo, corno uterino direito, Doppler cores e citologia endometrial em 9 animais submetidos ao tratamento com células tronco, avaliado em dois diferentes tempos com intervalo de 30 dias.....	58
Tabela 8- Características observadas no histopatológico, antes da infusão da terapia celular. ....	58

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>Kg</b>	Quilogramas
<b>Mg</b>	Miligrama
<b>Cm</b>	Centímetros
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>mL</b>	Mililitros
<b>µL</b>	Microlitros
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>TE</b>	Transferência de embrião
<b><i>T. pyogenes</i></b>	<i>Trueperella pyogenes</i>
<b><i>S. intermedius</i></b>	<i>Staphylococcus intermedius</i>
<b>ECC</b>	Escore de condição corporal
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>FIV</b>	Fertilização <i>in vitro</i>
<b>CL</b>	Corpo lúteo
<b>FIU</b>	Presença de fluido intrauterino
<b>TP</b>	<i>Trueperella pyogenes</i>
<b>CHIU</b>	Conteúdo Hipercoágulo intrauterino
<b>Eclv</b>	Corpo lúteo vascularizado esquerdo
<b>CLv</b>	Corpo lúteo vascularizado
<b>i.u.</b>	Intrauterino
<b>IR</b>	Índice resistividade
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>IP</b>	Índice Pulsatilidade
<b>MTM</b>	Média tempo médio
<b>Vmáx</b>	Velocidade máxima
<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofinas
<b>PGf2 <math>\alpha</math></b>	Prostaglandina

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>R\$</b>	Reais
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b><math>\mu</math></b>	Micro
<b>®</b>	Marca Registrada
<b>X</b>	Vezes
<b><math>\geq</math></b>	Maior ou igual que
<b>&lt;</b>	Menor que
<b>%</b>	Porcentagem
<b>=</b>	Igual
<b>+</b>	Positivo
<b>-</b>	Negativo
<b><math>\pm</math></b>	Mais ou menos

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1. TRATO GENITAL DE FÊMEAS BOVINAS .....	17
2.2. PUERPÉRIO .....	17
2.3. ENDOMETRITE .....	19
2.4. “REPEAT BREEDING” .....	21
2.5. EXAME GINECOLÓGICO .....	22
2.5.1 Citologia uterina .....	24
2.5.2 Exame Histopatológico .....	25
2.5.3. Exame ultrassonográfico .....	25
2.5.4. Ultrassonografia Doppler .....	26
2.6. TRATAMENTO ALTERNATIVO: BIOMATERIAIS, NANOTECNOLOGIA .....	27
2.6.1. Biomateriais .....	27
2.6.2. Quitosana .....	28
2.6.3. Terapia celular – Células Tronco.....	29
3. OBJETIVOS .....	30
3.1. OBJETIVO GERAL .....	30
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
4.1. EXPERIMENTO I .....	31
4.1.1.Exame Ginecológico .....	32
4.1.1.1 Inspeção.....	32
4.1.1.2 Palpação retal - Exploração clínica da cérvix, útero e ovários.....	33
4.1.1.3. Vaginoscopia - Inspeção indireta da vagina.....	33
4.1.1.4 Ultrassonografia .....	34
4.1.1.5 Ultrassonografia Doppler cores- Uterino.....	35
4.1.1.6 Citologia Uterina .....	37
4.1.1.7 Exame Microbiológico .....	37
4.1.2 MATERIAL .....	38
4.1.2.1 Biomateriais (Limax e Quitosana) .....	38
4.2. EXPERIMENTO II.....	39
4.2.1 Implantação das células tronco.....	40
4.2.2 Exame Ginecológico .....	41
4.2.2.1 Avaliação Ginecológica .....	41
4.2.2.2 Ultrassonografia .....	41

4.2.2.3	Ultrassonografia Doppler cores- Uterino .....	41
4.2.2.4	Citologia Uterina .....	41
4.2.2.5	Exame Microbiológico .....	42
4.2.2.6	Exame Histopatológico .....	42
4.2.3	MATERIAIS .....	43
4.2.3.1	Células Tronco .....	43
4.2.3.2	Infusão celular .....	44
5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
6.	RESULTADOS.....	46
6.1.	EXPERIMENTO I .....	46
6.1.2	Efeito do tratamento Limax sobre as variáveis de ECC, medidas ultrassonográficas e exame ginecológico .....	46
6.1.3	Efeito do tratamento Limax+Quitosana sobre as variáveis de ECC, medidas ultrassonográficas e exame ginecológico .....	48
6.1.4	Efeito do tratamento Quitosana sobre as variáveis de ECC, medidas ultrassonográficas e exame ginecológico .....	49
6.1.4	Efeito do tratamento controle sobre as variáveis de ECC, medidas ultrassonográficas e exame ginecológico .....	49
6.2.	COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS E INTERFERENCIA SOBRE AS VARIÁVEIS ECC, MEDIDAS ULTRASSONOGRÁFICAS E GINECOLÓGICAS.....	50
6.2.1	Efeito dos tratamentos comparado com grupo controle sobre a variável escore de condição corporal (ECC).....	50
6.2.2	Efeito dos tratamentos comparado com grupo controle sobre a variável - Catarro Genital .....	51
6.2.3	Efeito dos tratamentos comparado com grupo controle sobre a variável medidas ultrassonográficas –cérvis .....	52
6.2.4	Efeito dos tratamentos comparado com grupo controle sobre a variável medidas ultrassonográficas –cornos uterinos .....	53
6.2.5	Efeito dos tratamentos comparado com grupo controle sobre a variável medidas ultrassonográficas –vascularização uterina –Doppler cores .....	54
6.2.6	Efeito dos tratamentos comparado com grupo controle sobre a variável citologia .....	55
6.2.7	Micro-organismos encontrados nos diferentes tratamentos.....	56
6.3.	EXPERIMENTO II.....	57
7.	DISCUSSÃO .....	59
7.1.	EXPERIMENTO I: .....	59
7.2.	EXPERIMENTO II.....	64
8.	CONCLUSÕES .....	67
9.	REFERÊNCIAS .....	68

## 1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura leiteira é uma importante atividade econômica (LOPES; REIS; YAMAGUCHI, 2007). Dados publicados em 2018 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística comprovam que o rebanho brasileiro de bovinos chegou a aproximadamente 215 milhões em 2017, refletindo no aumento da demanda de produtos de origem animal (IBGE, 2018). Em consequência disso, os animais são exigidos quanto a sua produtividade (reprodução e produção leiteira). Essa exigência relaciona-se a diferentes fatores como: alterações nas concentrações hormonais, perdas embrionárias, aumento de dias abertos e maior incidência de problemas reprodutivos (RADOSTITS et al., 2007; BOLLWEIN; LÜTTGENAU; HERZOG, 2013).

O desempenho reprodutivo insatisfatório é uma importante questão referente à produtividade (GRÖHN; RAJALA-SCHULTZ, 2000), pois afeta a lucratividade do rebanho levando a diminuição da produção leiteira e do número de bezerros (LEBLANC, 2007). Um fator que exige atenção na criação de bovinos relatado por muitos autores é o período de transição, compreendido entre a terceira semana pré-parto à terceira semana pós-parto (GRUMMER, 1995). Neste período o animal passa por drástica mudança metabólica, mudando do estado de gestante para lactante. Em geral há um aumento das exigências nutricionais no início da lactação, quando o consumo de alimento geralmente é reduzido, provocando grande mobilização de outras reservas energéticas em especial lipídeos, aminoácidos, vitaminas e minerais (SANTOS et al., 2010).

Leblanc (2010) destacou que 30 a 50% das vacas em lactação são afetadas por problemas metabólicos ou sofrem com doenças infecciosas no primeiro mês de lactação.

Esses problemas geram redução na quantidade de leite e aumento nos custos de produção, além de reduzir o desempenho reprodutivo, prejudicando a sustentabilidade de produções leiteiras (SANTOS et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013).

No pós-parto, doenças como endometrite são prevalentes em vacas principalmente com aptidão leiteira, impactando negativamente no desempenho reprodutivo e conseqüentemente na produção animal (LEBLANC et al., 2002a; GILBERT et al., 2005). A endometrite é definida como inflamação da camada mais interna do útero, endométrio, sem manifestação sistêmica, ocorrendo geralmente após 21

dias pós-parto. Apesar da não manifestação sistêmica, relata-se a ocorrência de retorno regular ao cio (SHELDON et al., 2006). A endometrite não aparente pode ser definida como quadro de inflamação endometrial, normalmente determinada pela citologia, na ausência de secreção purulenta visualizada por vaginoscopia. Em animais sem manifestações clínicas, a enfermidade é diagnosticada pela mensuração da proporção de neutrófilos presentes em esfregaço de células endometriais, coletadas por lavado uterino ou pelo uso de escova citológica (SHELDON et al., 2006). Além de problemas reprodutivos no pós parto imediato, há ainda animais que não emprenham mesmo após três ou mais serviços associados com estro natural, esses animais são identificados como “Repeat Breeding” (PUROHIT, 2008).

Com o intuito de buscar novas formas de tratamento, muito se fala em terapias alternativas como o uso de células tronco ou mesmo o uso de biomateriais, que não causam danos aos organismos e possuem liberação controlada. Essa inovação, em diversas áreas da ciência, vem acompanhada das nanotecnologias (NARDUCCI, 2007).

A nanotecnologia constitui uma revolução na ciência e na tecnologia mundial, pois possui aplicação para diferentes áreas do conhecimento, como a física, química, ciência da computação, engenharia e biologia. No campo da saúde, o uso dessa tecnologia pode potencializar o tratamento de algumas enfermidades, podendo minimizar efeitos deletérios de outras substâncias associado com biomateriais, evitando assim que ocorra resistência de microrganismos a muitos fármacos utilizados na rotina clínica. Assim, biomateriais como a quitosana e argila estão sendo cada vez mais exploradas por suas propriedades e em prol da saúde e bem-estar do animal (BHUPINDER, 2011).

Diferente dos biomateriais, a terapia celular utilizando as células tronco torna-se importante, pois é capaz de replicar e renovar um tecido por meio da produção de células filhas idênticas, sob condições específicas (GARGETT, 2004). A terapia com células estaminais é uma promessa de reparo e / ou regeneração de tecido envelhecido ou danificado.

Portanto, a busca por tratamentos alternativos para enfermidades uterinas tem aumentado, visando garantir melhores índices reprodutivos e menores custos com tratamentos. Além de se obter melhor controle do uso de fármacos para minimizar a resistência a antibióticos, importante fator abordado pelo mercado mundial.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. TRATO GENITAL DE FÊMEAS BOVINAS**

O trato genital de vacas é constituído por ovários, ovidutos, tubas uterinas, útero, cérvix uterina, vagina e genitália (HAFEZ; HAFEZ, 2004; GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005). O ligamento largo tem a função de sustentação dos órgãos genitais internos, que consiste no mesovário, mesossalpinge e do mesométrio que suporta o útero. Em bovinos e ovinos, a união do ligamento largo é dorsolateral na região do íleo, com a convexidade dorsal e os ovários localizados próximos à pelve (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O útero é separado em dois cornos uterinos, corpo e cérvix. Sua parede é dividida em três regiões diferentes: endométrio, miométrio e perimétrio. O endométrio é a camada da mucosa, constituída pelo epitélio normalmente colunar e lâmina própria submucosa; o miométrio é composto por uma camada circular interna espessa de músculos lisos e uma subcamada longitudinal externa delgada que se continua no mesométrio; o perimétrio é uma camada serosa típica (BANKS, 1991).

### **2.2. PUERPÉRIO**

O puerpério compreende o período final do parto até o início dos primeiros sinais compatíveis para uma nova gestação em média uns 21 dias (MARQUES JÚNIOR, 1993; HORTA, 1995). O puerpério pode ser dividido em três fases: primeira fase (puerpério precoce) a hipófise encontra-se refratária ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o que ocorre do primeiro ao 14º dia após o parto, nesse período ocorrem as retenções de secundinas e a metrite puerperal aguda; A segunda fase, intermediária, o puerpério recente se encontra dentro do puerpério clínico que se estende até o 21º dia, neste ocorre a total regressão das dimensões uterinas, esse período compreende de

sensibilidade da hipófise ao GnRH até ocorrência da primeira ovulação. A terceira fase, pós-ovulatória, termina com a involução uterina completa, e sua duração depende das condições fisiológicas da vaca após o parto (OLSON et al., 1986; GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

Com o processo do parto, ocorre a abertura das barreiras anatômicas constituídas pela vulva, vagina e cérvix, possibilitando a ascensão de bactérias ao ambiente uterino, sendo *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* e *Fusobacterium necrophorum* consideradas as espécies mais relevantes envolvidas na patogênese de doenças uterinas (SHELDON et al., 2006; BICALHO et al., 2016).

Geralmente a infecção uterina ocorre logo após o parto e persiste durante as duas primeiras semanas. A maioria dos animais infectados consegue eliminar a infecção durante as cinco semanas seguintes, no entanto cerca de 10% apresentam a doença (PENG et al., 2013). Elkjaer et al. (2013) encontraram em sua pesquisa com 125 vacas Holandesas que todos os animais apresentaram bactérias no conteúdo uterino, aproximadamente 28 dias pós-parto.

Apesar da contaminação bacteriana uterina ocorrer na maioria dos animais, nem todos vão desenvolver a doença. Um dos fatores que irá determinar se o animal apresentará ou não a enfermidade é a eficácia do seu sistema imunológico. Outros fatores como a virulência das bactérias, estresse do animal e a carga de contaminação bacteriana no lúmen uterino também são fatores predisponentes à instalação da infecção no momento do parto (BICALHO et al., 2012; ELKJAER et al., 2013).

Alterações nos mecanismos de defesa contribuem para a persistência de bactérias patogênicas e favorecem o estabelecimento de doenças. Modificações no ambiente uterino e atraso no retorno da atividade ovariana podem resultar em infertilidade. O conhecimento do processo de involução uterina normal é essencial para diferenciar e aliviar possíveis alterações patológicas no útero após o parto (SHELDON; DOBSON, 2004; SHELDON et al., 2006, 2009).

Em decorrência de todas essas alterações a maioria das doenças uterinas ocorrem no período após o parto e as principais são metrite, endometrite clínica e endometrite citológica. Essas doenças são de grande importância devido a perdas econômicas e prejuízos no bem-estar animal, contribuindo para o desconforto da vaca, baixo

desempenho reprodutivo e eliminação precoce do rebanho, reduzindo o lucro do produtor rural (BICALHO et al., 2012; MACHADO et al., 2012a; PENG et al., 2013).

### 2.3. ENDOMETRITE

Endometrite é definida como a inflamação do revestimento endometrial do útero, caracterizada clinicamente pelo corrimento vaginal mucopurulento ou purulento, ocorrendo de 21 a 40 dias pós-parto (LEBLANC et al., 2002a; GILBERT et al., 2005; DUBUC et al., 2011). Na América do Norte, a incidência de endometrite é de aproximadamente 28%, variando de 5,3% a 52,6% (CHEONG et al., 2012).

Alguns autores identificaram fatores de risco para o desenvolvimento da endometrite, tais como: alta contaminação bacteriana no períneo no momento do parto (FÖLDI et al., 2006), estado metabólico peri-parto, retenção das membranas fetais pós-parto (LEBLANC et al., 2002a; SHELDON et al., 2009), gemelaridade e distocia (FÖLDI et al., 2006).

Os principais agentes bacterianos associados à inflamação do útero são a *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* e *Fusobacterium necrophorum*. No entanto outras bactérias como *Bacteroides* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Prevotella melaninogenica* e *Streptococcus* spp. também vem sendo associados a doenças uterinas (SANTOS et al., 2011; BICALHO et al., 2012; MACHADO et al., 2012b; SANTOS; BICALHO et al. 2012). Dentre as bactérias patogênicas, a *Trueperella pyogenes* está relacionada a consequências graves para a reprodução (ELKJAER et al. 2013).

Algumas pesquisas demonstram que a *Escherichia coli* é uma das primeiras bactérias a se estabelecerem no ambiente uterino após o parto. Após sua instalação essa bactéria causa alterações que podem favorecer o desenvolvimento de outros micro-organismos como o *Fusobacterium necrophorum* e *Trueperella pyogenes* que culminará na presença de doença (SANTOS et al., 2011; BICALHO et al., 2012).

A etiologia bacteriana das doenças uterinas no pós-parto é bastante dinâmica e apresenta um caráter multifatorial. Bicalho et al. (2012), realizaram pesquisa com a associação dos fatores de virulência presentes em *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* e *Trueperella pyogenes* com doenças uterinas em vacas leiteiras. Os autores observaram que vacas no período pós-parto (um a três dias de lactação) que continham *Escherichia coli* no conteúdo uterino tinham 16,2 vezes mais chances de desenvolver infecção por *Fusobacterium necrophorum* com oito a dez dias de lactação. Desta forma, podemos observar a interação das bactérias no período pós-parto para o estabelecimento de doença uterina.

Bicalho et al. (2012) também relataram que animais que apresentavam endometrite continham *Escherichia coli* com um a três dias de lactação e apresentavam *Trueperella pyogenes* na avaliação realizada com oito a dez dias e 34 a 36 dias de lactação. A prevalência de endometrite foi de 38,1% e 15,6% para vacas positivas e negativas para a *Escherichia coli*, respectivamente. Vacas que apresentaram *Trueperella pyogenes* com 34 a 36 dias de lactação tinham 8,8 mais chances de desenvolver endometrite clínica em comparação com vacas negativas. A presença de retenção de placenta também foi associada com a contaminação com *Escherichia coli*, sendo que animais que apresentaram o problema tiveram 44,8 vezes mais chances de se contaminarem com esta bactéria.

Além de danos uterinos a endometrite favorece a disfunção ovariana (por exemplo, tamanho menor do folículo, baixa concentração plasmática de estradiol, e fase luteal prolongada) (SHELDON et al., 2009). O desempenho reprodutivo diminuído (LEBLANC et al., 2002a; DUBUC et al., 2010) aumenta o descarte de animais devido à falha reprodutiva (LEBLANC et al., 2002a, b), e produção de leite reduzida (DUBUC et al., 2011).

Alguns animais podem apresentar resposta inflamatória menos intensa, com a ausência de manifestações clínicas. Esta forma da doença é denominada endometrite inaparente ou citológica. A endometrite inaparente é definida como um quadro de inflamação endometrial sem a presença de secreção purulenta, que resulta em uma redução significativa da capacidade reprodutiva (BARANSKI et al., 2012).

Vários métodos podem ser utilizados para o diagnóstico da endometrite, como a observação de descarga vaginal, palpação retal e vaginoscopia que auxiliam na detecção

de animais doentes e norteiam a maioria dos tratamentos. Nos casos de endometrite inaparente, é necessária a utilização de métodos mais precisos e específicos, como a ultrassonografia, biópsia uterina e exame citológico (THOMÉ et al., 2013). A biópsia é bastante sensível para o diagnóstico, porém é um método caro, fastidioso e demorado, enquanto a ultrassonografia não é muito específica, uma vez que o conteúdo intrauterino observado no ultrassom pode não estar presente em todos os animais com a afecção. Desta forma, a citologia na fase aguda é um dos principais métodos diagnósticos, e o exame pode ser realizado por meio de escova citológica, *swabs* e lavagem uterina. A escova citológica é considerada o método mais apropriado, pois apresenta um resultado mais fiel em relação à lavagem uterina e *swabs*. Após a coleta de material, o conteúdo deve ser avaliado microscopicamente para detectar a quantidade e proporção de leucócitos, polimorfonucleares, em relação às células epiteliais presentes na secreção uterina (SHELDON et al., 2006; BARANSKI et al., 2012). Essa relação é utilizada para diferenciar animais saudáveis de animais com endometrite inaparente (GILBERT et al., 2005).

Um assunto muito discutido é com relação a utilização ou não de tratamentos para endometrite. Embora a administração de prostaglandina (PGF<sub>2α</sub>) (HEUWIESER et al., 2000; KASIMANICKAM et al., 2005; GALVÃO et al., 2009; DUBUC et al., 2011) seja frequentemente recomendada para tratar endometrite, existem dados conflitantes na literatura sobre os seus benefícios no potencial reprodutivo dos animais. Antibiótico, como cefapirina é indicado para tratar vacas com endometrite ou descarga vulvar 13 dias pós-parto (LEBLANC et al., 2002b).

#### 2.4. “REPEAT BREEDING”

As fêmeas denominadas “Repeat Breeding” são animais que não apresentam prenhez positiva, mesmo após três ou mais serviços associados ao estro natural (PUROHIT, 2008; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A ineficiência reprodutiva em vacas devido à repetição regular do cio, mesmo após cobertura ou inseminação artificial, acarreta em problema oneroso para produtores rurais, atrasando o período de serviço, intervalo entre partos e conseqüentemente redução no nascimento de bezerros e queda na produção leiteira (THAKUR et al.,2006).

Por anos, muitos pesquisadores buscam a principal causa para essa patologia. Entretanto, a conclusão encontrada é que essa enfermidade pode estar associada às infecções do trato reprodutivo, idade, falha na detecção do cio, deformidades anatômicas do trato reprodutivo feminino, problemas hormonais (afetando produção de oócitos, ovulação e fixação embrionária) e deficiência nutricional (ALI et al., 2009; PATEL et al., 2007; SAH; NAKÃO, 2006; AZAWI; ALI; LAZIM; 2008)

Hafez (2004) destacam que nas vacas “Repeat Breeding”, a falha de fertilização e a mortalidade embrionária ocorrem em maior proporção do que em vacas sadias, porém não se sabe a real causa desse fato. Numerosos estudos concluíram que vacas com fertilidade normal podem apresentar aproximadamente 10% de morte embrionária precoce dentro de três semanas após a fertilização, e que essa porcentagem aumenta para 40% durante os primeiros 21 dias após a inseminação artificial em vacas “Repeat Breeding” (ROCHE, 1981).

Existem diferentes opiniões entre cientistas sobre a causa da “Repeat Breeding”, dentre elas estão a morfologia embrionária e a alteração endometrial, impedindo a fixação do embrião (AYALON, 1978; ALBIHN,1991).

## 2.5. EXAME GINECOLÓGICO

O exame ginecológico baseia-se em anamnese, exame físico geral, exame específico externo dos órgãos genitais femininos e exame interno dos órgãos genitais, consistindo do exame por palpação retal, inspeção indireta da cérvix e da mucosa vaginal por vaginoscopia, além de exames complementares como ultrassonografia, microbiologia, citologia e histopatológica (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

A vaginoscopia é um método de avaliação por inspeção indireta, rápido e com sensibilidade e especificidade maiores do que a palpação retal. Sua utilização auxilia na visualização e detecção de secreções provenientes da cérvix, útero ou vagina (LEBLANC et al., 2002a). Como vantagem, destaca-se a praticidade e o custo baixo, além de eliminar diagnósticos falso positivos gerados pela presença de secreções mucopurulentas ou purulentas originadas por vaginites, cistites ou pielonefrites (SHELDON et al., 2006). Barlund et al. (2008) encontraram sensibilidade de 53,9% e especificidade de 95,4% tendo a citologia esfoliativa endometrial como padrão ouro.

Há uma classificação para as secreções vaginais identificadas como catarro genital. De acordo com Grunert, Birgel e Vale (2005) inicia-se como: catarro genital grau 1- secreção mucopurulenta, com hiperemia da mucosa cervical e abertura do óstio cervical, podendo haver prolapso do primeiro anel cervical; grau 2- quando o exame revela catarro genital de aspecto purulento, podendo conter odor fétido; grau 3- conteúdo purulento e/ou sanguinolento, cérvix pérvia, podendo haver prolapso dos anéis; grau 4- piometra que caracteriza-se pelo acúmulo de exsudato purulento no lúmen uterino e corpo lúteo persistente em um dos ovários (SHELDON et al., 2006).

Willians et al. (2005) adaptaram essa classificação inicial para escores de 0 a 3. Sendo escore 0 – muco translúcido; escore 1 – muco com estrias de pus; escore 2 – secreção mucopurulenta com menos de 50% de pus; escore 3 – secreção mucopurulenta com mais de 50% de pus, ocasionalmente apresentando sangue (Figura 1).



Figura 1 - Amostras de secreções obtidas pela vagina.  
Legenda: 0 – muco; 1 – muco com estrias de pus; 2 – menos de 50% mucopurulento; 3 – mais de 50% mucopurulento podendo ter sangue (WILLIANS et al.,2005).

Outra ferramenta que auxilia o diagnóstico, semelhante à vaginoscopia, para identificar as diferentes secreções advindas do trato genital é o Metrichick (Simcro, New Zealand). O Metrichick é uma haste de aço inox com 50 cm de comprimento, contendo na região que será introduzida no animal uma estrutura cônica de silicone com 4 cm, que tem a função de recolher um pouco do conteúdo para análise visual. A classificação das secreções observadas, correspondem: 0 = nenhuma secreção; 1 = muco translúcido; 2 = muco com estrias de pus; 3 = mucopurulenta; 4 = secreção purulenta; 5 = secreção fétida e purulenta sanguinolenta (MCDUGALL et al., 2007).

### **2.5.1 Citologia uterina**

A citologia endometrial ao contrário da biópsia uterina é um método prático e eficiente para a avaliação dos processos infecciosos uterinos, ressaltando ainda que os neutrófilos são a principal linha de defesa do endométrio (DUBUC et al., 2010).

Esta técnica consiste em coletar uma amostra do interior do útero, fixar em uma lâmina, corar e quantificar o número de neutrófilos. A proporção limiar varia de 4% a 18% dependendo do autor e o tempo de amostragem depois do parto (GILBERT et al., 2005; DUBUC et al., 2011). Este método é relativamente fácil de usar, e permite o monitoramento da integridade do útero. O número elevado de polimorfonucleares (PMNs) reflete inflamação local. Em casos clínicos de metrite ou endometrite, o fluxo de neutrófilos para o lúmen uterino é causado pela presença de bactérias ou de suas endotoxinas (MATEUS et al., 2002; SHELDON, 2004).

Kasimanickam et al. (2005) evidenciaram que os resultados obtidos pela técnica da escova citológica foram superiores na detecção de animais com endometrite, indicando que este é um meio mais consistente e confiável de coleta que o lavado uterino para avaliar a citologia endometrial em vacas no puerpério.

### **2.5.2 Exame Histopatológico**

O método de diagnóstico definitivo para a classificação dos processos infecciosos uterinos, para muitos autores baseia-se na biópsia uterina ou exame histopatológico, entretanto, esse método de diagnóstico é invasivo, oneroso que exige um laboratório e técnico experiente para o processamento da amostra (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005). O exame de histopatológico uterino permite a avaliação morfológica endometrial que se devidamente analisada, pode encontrar o diagnóstico para infertilidade bovina, já que uma amostra do endométrio é representativa de toda mucosa uterina, não havendo diferenças significativas entre as variações histológicas nos cornos uterinos (BONNETT et al., 1991; RODRIGUEZ; GONZALES; GALLEGOS, 1991; MONTEIRO et al., 2003)

Diversos autores, ao analisarem o histopatológico uterino, encontraram relações quanto a vascularização, concentração de glândulas endometriais e presença de células inflamatórias (GONZALEZ et al.,1985; SAR et al.,1996). Portanto, com uma vasta literatura destacando as alterações histopatológicas em endométrio, Meira Jr. et al.(2012), estabeleceu um escore para as alterações vistas caracterizando as lesões histopatológicas da endometrite.

### **2.5.3. Exame ultrassonográfico**

O exame ultrassonográfico associado a palpação retal promove maior precisão na avaliação das dimensões uterinas e sua involução pós-parto (SHELDON; DOBSON, 2004).

Sheldon et al. (2006) afirmaram que a ultrassonografia é um método de avaliação uterina mais exato que a palpação retal, objetivo, não invasivo e tem como vantagem a realização de um diagnóstico em tempo real. Os autores concluíram ainda, que o método é eficiente na avaliação da involução uterina no puerpério através da mensuração do diâmetro da cérvix, diâmetro uterino e visualização da presença ou ausência de fluidos no lúmen.

A determinação do aumento do conteúdo intrauterino e as dimensões uterinas constituem um método confiável, com boa especificidade para o diagnóstico da endometrite após a terceira semana pós-parto considerando o histórico do animal (BARLUND et al., 2008; ORAL et al., 2009).

Além da ultrassonografia convencional em muitas áreas da saúde usa-se a ferramenta Doppler com objetivo de observar o fluxo sanguíneo (MIYAMOTO et al., 2006).

#### **2.5.4. Ultrassonografia Doppler**

A ultrassonografia com Doppler é um mecanismo utilizado para identificar focos de vascularização e o fluxo sanguíneo. A técnica de ultrassonografia apresenta como opções de trabalho o modo B (Bidimensional), utilizado para identificação anatômica, onde apresentam imagem em escala cinza. Outra opção proporcionada pelo Doppler é o modo Doppler cores, tornando possível estimar a perfusão e direção sanguínea no tecido, observando pontos coloridos durante o exame (GINTHER; MATTHEW, 2004). O Modo espectral no Doppler fornece valores exatos de índices relacionados a vascularização (GINTHER; MATTHEW, 2004).

O princípio de funcionamento do Doppler é detectar a movimentação das hemácias (GINTHER, 2007). Porém novos estudos sugerem que a detecção do fluxo ocorre devido ao peso das hemácias serem maior do que de outras células sanguíneas. As alterações de velocidade e sentido do sangue apresentam-se com cores diferentes. Por convenção, o fluxo na direção contrária ao transdutor é azul e o a favor é vermelho, podendo alterar a tonalidade de acordo com a intensidade e direção do fluxo (GINTHER, 2007).

O método espectral fornece valores sistólicos, diastólicos, relação de sístole e diástole, índice de resistência (IR), índice de Pulsatilidade (IP) e velocidade máxima do fluxo sanguíneo (GINTHER, 2007).

Ferreira e Meira Jr. (2011) relataram a importância no uso do Doppler como uma ferramenta para análise da viabilidade endometrial assim como para interação concepto-materna, além de auxiliar no diagnóstico de enfermidades uterinas.

Estudos realizados usando essa técnica mostraram associação entre o fluxo sanguíneo uterino e involução uterina tardia (HEPPELMANN; KRÜGER; LEIDL, 2013). Em vacas, o Doppler foi usado para avaliar o fluxo sanguíneo no útero durante o ciclo estral (BOLLWEIN et al., 2000), em animais com prenhez positiva, bem como no período pós-parto (BOLLWEIN; BAUMGARTNER; STOLLA, 2002).

## 2.6. TRATAMENTO ALTERNATIVO: BIOMATERIAIS, NANOTECNOLOGIA

O termo nanotecnologia é empregado como a tecnologia que permite manipular, criar ferramentas, material e estruturas em nível molecular, ou seja, átomos em estruturas funcionais de dimensões nanométricas (SCOTT, 2007). Neste contexto, a nanotecnologia é um campo da ciência aplicada ao controle e manipulação de matéria (nanomateriais), em escala inferior a um micrômetro (Um a 100 nanômetros) (COPPO, 2009).

Na Medicina veterinária, muitos pesquisadores afirmam que a nanotecnologia possibilita revolucionar o agronegócio na produção de alimento e controle de pragas. No campo médico, auxilia no diagnóstico e tratamento de doenças (SCOTT; CHEN 2002). A aplicação da nanotecnologia na medicina veterinária está em ascensão em diversas áreas, que incluem sistemas de imagem, administração de medicamentos e engenharia de tecidos (NARDUCCI, 2007).

Com essa vertente para área biológica, a nanotecnologia pode ser identificada como nanobiotecnologia, que aplica ferramentas resultantes da integração das ciências físicas, engenharia molecular, biologia, biotecnologia e química (ABDI, 2013). O advento dessa tecnologia proporciona o desenvolvimento de dispositivos cada vez menores para análises bioquímicas e diagnósticos moleculares com grandes melhorias na eficiência, precisão e sensibilidade dos resultados (RUMAYOR et al., 2005).

### 2.6.1. Biomateriais

Os biomateriais, são produtos derivados de materiais biodegradáveis, tratando-se de material, alguns autores definem sua composição por partículas de silicato de alumínio, além de diversos oligoelementos como titânio, magnésio, cobre, zinco, cálcio, sódio,

potássio níquel, ferro e lítio (GOMES; DAMAZIO; MARLENE, 2009; MACHADO, 2018). As concentrações dos minerais encontrados em sua composição potencializam os efeitos de alguns biomateriais.

Alguns minerais naturais, de constituição argilosos foram identificados como tendo a capacidade de eliminar uma variedade de bactérias patogênicas (WILLIAMS et al., 2004; HAYDEL; REMENIH; WILLIAMS, 2008).

Diante dessas informações, sabe-se que os biomateriais atualmente tem sido muito utilizados na indústria cosmética, em uma grande variedade de produtos (GOMES; DAMAZIO; MARLENE, 2009).

### **2.6.2. Quitosana**

A quitosana é um produto natural, sendo um bipolímero polissacarídeo, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado (GOOSEN, 1996).

Os polímeros biodegradáveis, segundo estabelecido pela “American Standard for testing and Methods” (ASTM-D883), são degradados primariamente pela ação de microorganismos (RAGHAVAN, 1995). Em geral, derivam de processos de CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, componentes celulares microbianos, sendo biocompatíveis e tendo sido reconhecidos como potenciais substitutos dos polímeros termoplásticos derivados do petróleo. O poli (ácido 3 - hidroxibutírico) PHB e seus copolímeros, co-hidroxivalérico (PHBV) são biodegradáveis pela ação dos micro-organismos em sua superfície, entretanto esse processo depende do ambiente envolvido, espessura e a concentração de valerato (GILEAD, 1995).

Atualmente novas tecnologias estão sendo empregadas com o intuito de auxiliar no tratamento de algumas enfermidades, como no caso da microencapsulação (ALE et al., 2015). Essa tecnologia é empregada na embalagem de sólidos, líquidos e substâncias gasosas em pequenas cápsulas de liberação controlada (ANAL; SINGH, 2007 e CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007).

### 2.6.3. Terapia celular – Células Tronco

As células tronco apresentam a propriedade de diferenciação. Dependendo do estímulo nela aplicado, pode-se classificar como: Totipotente (criar organismo completo); pluripotente (diferenciação celular das camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma); multipotente (diferenciação a um número limitado de linhagens) e onipotentes (diferenciação somente de um tipo celular) (KOCH; BERG; BETTS, 2009).

Outra classificação ocorre de acordo com sua origem, embrionária ou adulta (extraídas dos diversos tecidos, tais como medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical) (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005; DAHLGREN, 2009). As células tronco embrionárias exibem ilimitada capacidade de renovação e pluripotência *in vitro*, porém a predisposição destas células em formar teratomas dificulta sua possível aplicação clínica (GATTEGNO-HO; ARGYLE; ARGYLE, 2012).

As células tronco adultas, encontradas em tecidos adultos são responsáveis pela manutenção tecidual normal, tem sua utilização menos controversa, pois não envolvem a clonagem e são menos prováveis em formar tumores, pelo seu potencial de diferenciação limitado - multipotentes (LEUNG; CHAN; CHEUNG, 2006; GATTEGNO-HO; ARGYLE; ARGYLE, 2012).

As células tronco mesenquimais (CTMs) podem se diferenciar em diferentes tipos celulares *in vitro*, por sua relativa facilidade de expansão em cultura, características imunológicas, secreção de citocinas que modulam a resposta inflamatória, reestabelecem o suprimento vascular e reparam o tecido lesionado, o que faz das CTMs uma fonte promissora de CT para a terapia celular (MONTEIRO et al., 2008). Segundo Lange-Consiglio et al. (2013), as células da membrana amniótica e do cordão umbilical são uma fonte promissora para obtenção de CTMs, pois são menos imunogênicas e sua coleta não é invasiva, podendo ainda se diferenciar em células neurais e endoteliais (SENEGAGLIA et al., 2009).

Gutierrez-Nibeyro (2011) ressalta que a medula óssea e tecido adiposo são as fontes mais comuns de obtenção de CTMs (GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011), podendo ser ainda extraídas do tecido de cordão umbilical (VIDAL et al., 2012), membrana

amniótica (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013) e sangue periférico (KOERNER et al., 2006).

As CTMs normalmente são obtidas dos próprios pacientes (autólogas), pois geralmente não resultam em nenhum efeito deletério na sua implantação (exemplo tumores). No entanto, o uso de células autólogas possui limitações, como sua utilização em lesões agudas e idade dos pacientes, devido à diminuição na proliferação, no potencial de diferenciação e na quantidade de CTMs nestes pacientes (CHEN et al., 2007).

A terapia celular é baseada no conceito de que uma população celular multi ou pluripotente no local da injúria tecidual pode diferenciar, proliferar, e se organizar de maneira que resulte em um tecido normal, tanto estruturalmente quanto funcionalmente (BURK et al., 2013). Deve-se salientar que o tratamento com CTMs não substitui ou acelera a reabilitação padrão, sendo um tratamento adicional para otimizar o resultado (BURK et al., 2013).

Em termos gerais, pode-se dividir em dois grupos: células tronco embrionárias e células tronco adultas. Estudos apontam a presença de células tronco no miométrio de mulheres, que contribuem na remodelação uterina, especialmente durante a gravidez (ONO et al. 2012, MARUYAMA, ONO; YOSHIMURA, 2013).

Desta forma, na medicina veterinária em geral, diversos estudos estão sendo realizados para tratamento de doenças sanguíneas, hepáticas, cardíacas, entre outras, pelo fato das células tronco mensenquimais originarem tecidos distintos de acordo com o estímulo que recebem (GATTEGNO-HO; ARGYLE; ARGYLE, 2012).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1.OBJETIVO GERAL**

Avaliar o uso de tratamentos alternativos para doenças uterinas em vacas.

### 3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a eficácia do uso de biomateriais (Limax e quitosana) no tratamento de endometrite em vacas de 25 a 40 dias pós-parto;
- Avaliar o efeito da administração de células tronco no útero de vacas “Repeat Breeding” diagnosticadas por exame histopatológico com degeneração endometrial.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi dividido em dois experimentos:

Experimento I- tratamento com biomateriais em vacas diagnosticadas com endometrite.

Experimento II- tratamento com células tronco em animais diagnosticados “Repeat Breeding”.

### 4.1.EXPERIMENTO I

Foram avaliados 37 animais da raça girolanda ½ sangue, livres de brucelose e tuberculose, em uma propriedade no município de Sobral - CE. As vacas foram distribuídas de forma aleatória em quatro grupos e tratadas. Sendo o Grupo I-10 animais com catarro genital e tratados com Limax (L); Grupo II- 12 animais com catarro genital e tratados com Limax + quitosana (LQ); Grupo III- seis animais com catarro genital e tratamento com quitosana (Q); Grupo IV- nove animais com catarro genital sem tratamento, denominado controle (C).

Após 7 dias da visita inicial, foi realizada uma segunda avaliação ginecológica e coleta de material, com o objetivo de constatar a melhora no exame ultrassonográfico e citológico, onde animal foi considerado curado ou não.

Na terceira visita, 14 dias após a primeira, os animais foram avaliados para determinar o sucesso do tratamento ou falha terapêutica, onde por fim, foi realizada a última coleta das amostras para microbiológico e citologia (Figura 2).

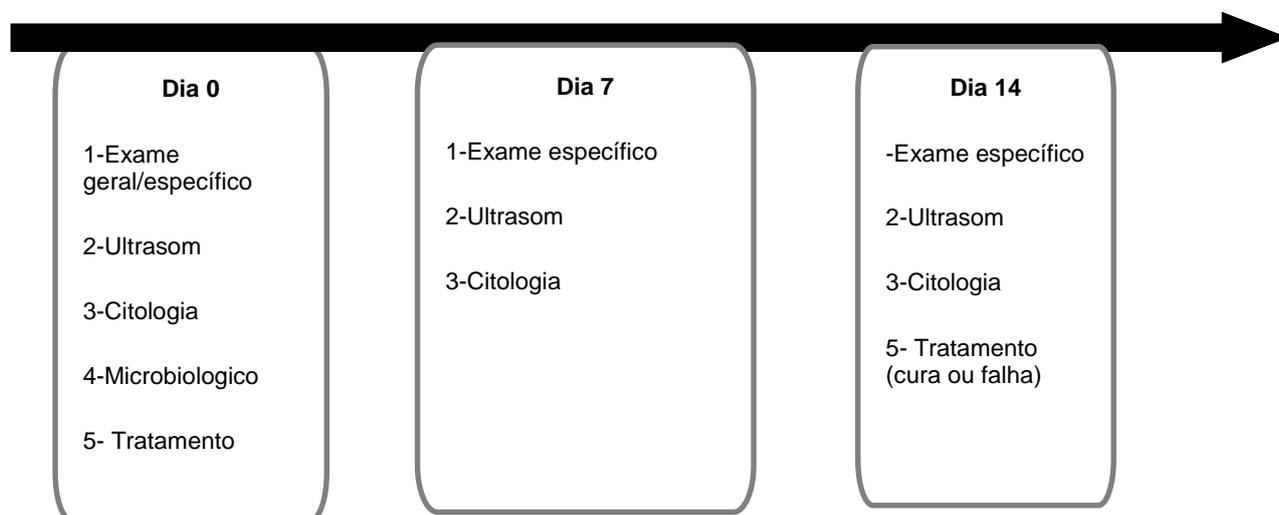


Figura 2 - Esquema do delineamento Experimento I (Ribeiro, B.L.M. 2018)

#### **4.1.1.Exame Ginecológico**

A avaliação ginecológica dos animais nos experimentos I e II foi baseada no exame clínico específico estabelecido por Grunert, Birgel e Vale, (2005), sendo composto por palpação retal, inspeção direta e indireta da região perineal e vagina.

##### **4.1.1.1 Inspeção**

Ao inspecionar o estado geral do animal, avaliando quanto ao estado, atitude e condições nutricionais, utilizou-se a escala descrita por Edmonson et al. (1989), avaliando o escore de condição corporal (ECC) e escalonando os animais entre 1 (muito magro) a 5 (muito gordo). A região perineal foi inspecionada com o objetivo de observar a presença de lesões, vestígios de muco ou secreção de fluxo vaginal, alterações no formato, posição,

cicatrizes e comprometimento da estrutura vulvar. A exposição da mucosa vulvo-vestibular foi realizada com afastamento da rima vulvar para avaliação da coloração desta, investigando a presença de vesículas e pústulas.

#### **4.1.1.2 Palpação retal - Exploração clínica da cérvix, útero e ovários**

A avaliação clínica do sistema genital feminino iniciou-se com a palpação retal conforme o proposto por Grunert, Birgel e Vale (2005). Na palpação retal, analisou-se inicialmente a cérvix e cranialmente o corpo do útero, prega intercornual, cornos uterinos e ovários além de formações anatômicas anexas aos órgãos genitais, ligamentos, artérias e linfonodos. Nos ovários, avaliou-se formações que caracterizassem sua função, como folículos e corpo lúteo (CL).

No exame da cérvix, procurou-se avaliar alterações morfológicas como aumento de volume, alterações na simetria, aderências e abscessos. Referente ao útero e cornos uterinos, verificaram-se sua localização dentro da cavidade, tamanho, simetria entre os cornos e consistência (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

#### **4.1.1.3. Vaginoscopia - Inspeção indireta da vagina**

Ao término da palpação, iniciou-se a vaginoscopia que foi realizada por meio de um espéculo vaginal tubular de Götze, 38 por 4 cm, de aço inox, auxiliado por uma fonte de luz, para observar a mucosa vaginal, cérvix e presença de secreção. O instrumento foi previamente lavado com água, detergente e posteriormente flambado em uma bandeja de aço inox e resfriado com solução fisiológica estéril NaCl 0,9%. Na sequência o instrumento foi introduzido na vagina do animal. Previamente a esse procedimento, a região perineal e a vulva foram submetidas a higienização utilizando papel toalha.

A coloração da mucosa vaginal e de cérvix foram avaliadas utilizando-se as definições propostas por Grunert, Birgel e Vale (2005) (Figura 3).

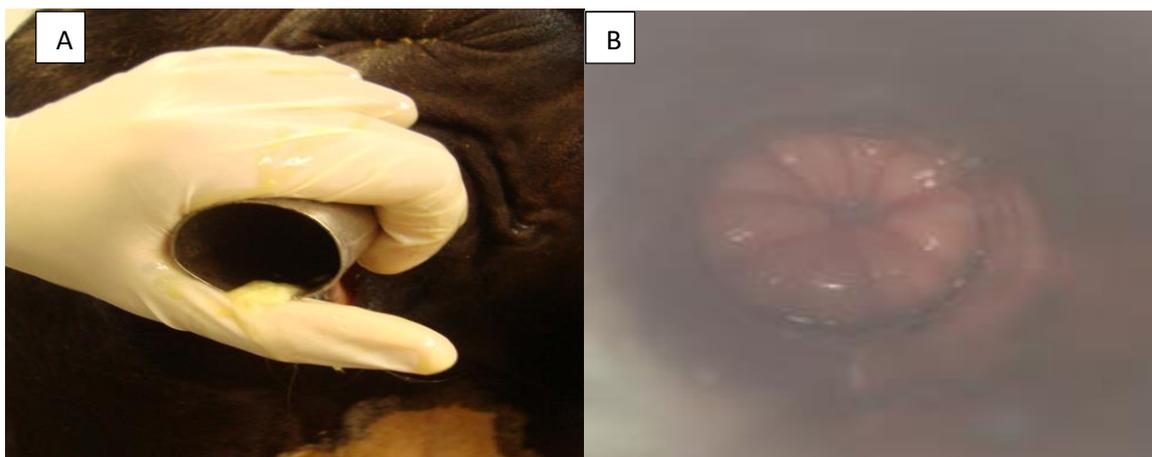


Figura 3 - (A) Espéculo vaginal, com catarro genital purulento grau III, exame de vaginoscopia. (B) Visualização da cérvix por meio do espéculo vaginal; avaliação da mucosa, coloração, abertura de cérvix, secreção (Ribeiro, B.L.M. 2018)

Quando observado secreções alteradas ou outra condição, essas foram classificadas em transparente, turva, mucopurulenta, purulenta e sanguinolenta, conforme o proposto por Grunert, Birgel e Vale (2005) e demonstrado na (Figura 1).

#### 4.1.1.4 Ultrassonografia

O estudo ultrassonográfico do útero no puerpério foi realizado com o equipamento M-Turbo, Fuji film Sonosite (Bothel, Wa, EUA) com uma probe micro convexa (8-5 MHz), como proposto por Meira Jr et al. (2012) e Heppelmann, Krüger e Leidl (2013).

A avaliação ultrassonográfica foi realizada por meio de cortes transversais, onde foram determinados os diâmetros de cérvix e cornos, presença de conteúdo no lúmen uterino, além das estruturas ovarianas. Os diâmetros cervical e uterino foram classificados como pequenos ou negativos (<3,5 cm), médios ou suspeitos (entre 3,5 e 5 cm) e grandes ou positivos (> 5 cm). As dimensões uterinas foram avaliadas de acordo com Meira Jr et al. (2012) (Figura 4).

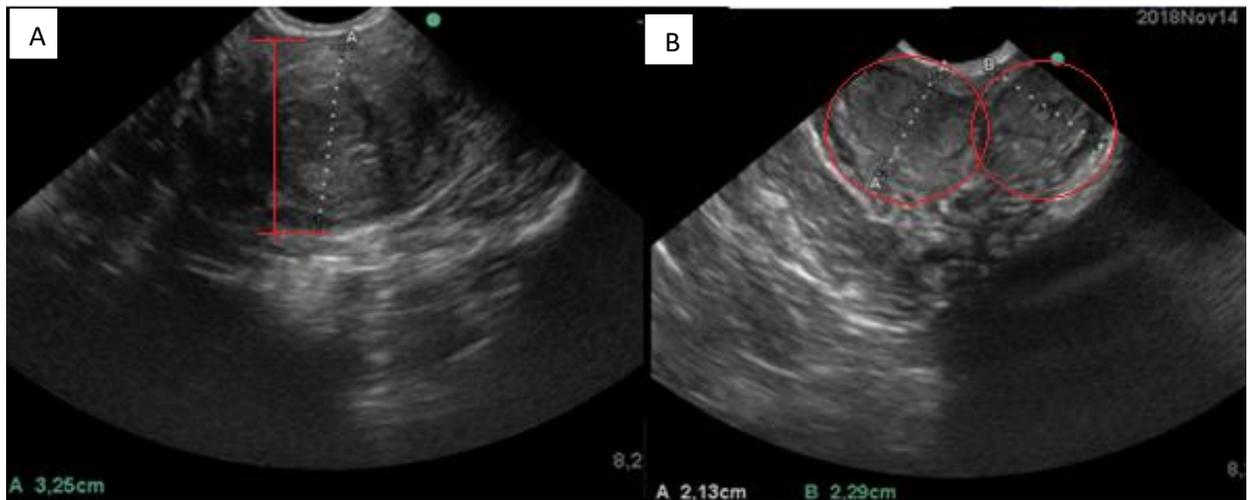


Figura 4 - Figura 4:(A) Corte ultrassonográfico transversal mensurando cérvix; (B) Corte ultrassonográfico transversal indicando e mensurando corno esquerdo e direito (Ribeiro, B.L.M. 2018).

#### 4.1.1.5 Ultrassonografia Doppler cores- Uterino

A avaliação do padrão hemodinâmico do tecido uterino pela técnica colorimétrica (modo Doppler cores) na região de ligamento intercornual foi utilizada para reconhecer alterações hemodinâmicas no tecido. Utilizou-se a escala colorimétrica estabelecida para padrões reprodutivos descrito por Ginther (2007), com o intuito de se correlacionar com processo inflamatório.

Os procedimentos envolveram a avaliação subjetiva da vascularização do parênquima uterino: Mesométrio e endométrio (0 - sem vascularização a 4 - extremamente vascularizado) conforme descrito por Ginther (2007) e Ribeiro (2016) (Figura 5).

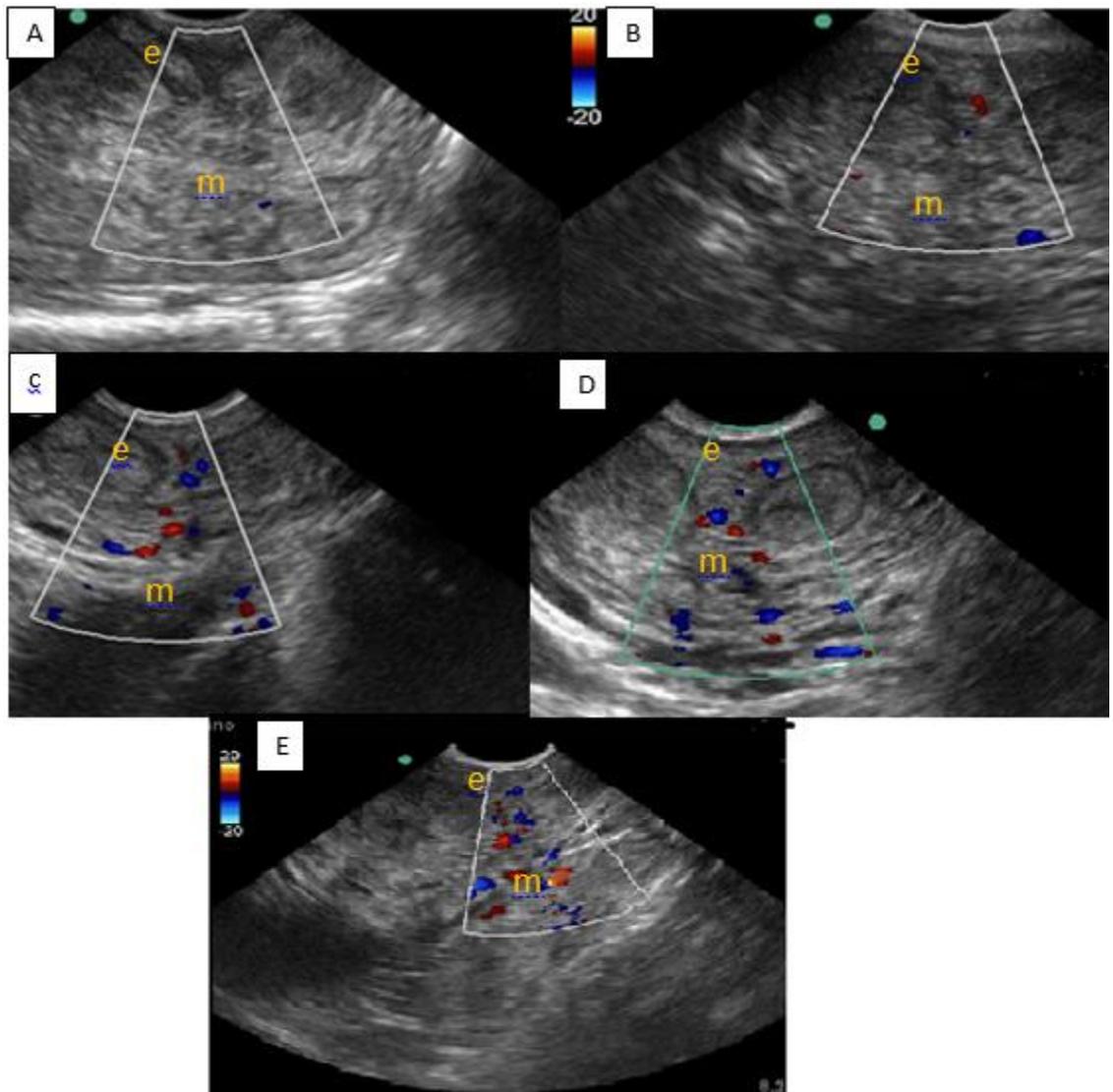


Figura 5 - (A-E): Caracterização do escore de vascularização de mesométrio e endométrio, Doppler cores. Legenda: (A) Caracterização de escore 0 para a avaliação subjetiva do padrão de vascularização do parênquima uterino, mesométrio (m);(B) Caracterização de escore 1 para a avaliação subjetiva do padrão de vascularização do mesométrio; (C) Caracterização de escore 2 para a avaliação subjetiva do padrão de vascularização do mesométrio; (D) Caracterização de escore 3 para a avaliação subjetiva do padrão de vascularização do mesométrio; (E) Caracterização de escore 4 para a avaliação subjetiva do padrão de vascularização do mesométrio (m) e afetando até região do endométrio (e) (Ribeiro, B. L.M, 2018)

#### **4.1.1.6 Citologia Uterina**

Após a limpeza da vulva com papel e álcool 70%, a fim de diminuir a contaminação da amostra, foi introduzida uma pipeta de inseminação equina intrauterina no útero bovino, acoplado a uma seringa com 40 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril, utilizada para distender a parede uterina proporcionando a infusão e conseqüentemente a recuperação do conteúdo uterino para o exame microbiológico e citológico conforme processo descrito por Gilbert et al. (2005). Após esse processo as lâminas foram coradas com kit Panótica®.

A avaliação da citologia uterina foi realizada por meio da contagem com diferenciação de 200 células, sob aumento de 400X, em microscópio óptico da marca Olympus modelo CX31, para a determinação da porcentagem de células polimorfonucleares neutrófilos (%PMN). Para esta contagem a lâmina foi totalmente avaliada com fim de selecionar área representativa, dando preferência àquelas em que não houvesse sobreposição de células.

Foram considerados positivos no exame citológico os animais que apresentassem porcentagens de neutrófilos superiores a 10% de acordo com o que foi preconizado por Kasimanickam et al. (2004).

#### **4.1.1.7 Exame Microbiológico**

As amostras para exame microbiológico foram obtidas pelo mesmo processo de coleta para citologia. Ao recuperar na seringa, em torno de 3 mL eram armazenados em swab stuart e colocado em isopor para manter a temperatura da amostra. Sendo processadas posteriormente no laboratório de microbiologia. Para realização do isolamento e identificação bacteriana, 10 µL da suspensão das amostras de lavado uterino em caldo tioglicolato foram semeados em ágar sangue de carneiro 5%, incubados por 72

horas à 37°C em condições de microaerofilia. Após o período de incubação, havendo proliferação bacteriana neste meio, foram observadas as características morfológicas das colônias como tamanho, forma, coloração, presença e tipo de hemólise. (Figura 6)



Figura 6 - Crescimento de colônia bacteriana meio Agar sangue, seta vermelha (Ribeiro, B.L.M. 2019).

A seguir, foi realizada a bacterioscopia, corando-se pelo método de Gram esfregaços das diferentes colônias, onde ao microscópio foram observadas a morfologia, a disposição das células e as características tintoriais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). As espécies bacterianas foram identificadas de acordo com Quinn et al. (2005) e Koneman et al. (2008), por meio das provas bioquímicas.

#### 4.1.2 MATERIAL

##### 4.1.2.1 Biomateriais (Limax e Quitosana)

Os Biomateriais foram desenvolvidos e produzidos com base na nanotecnologia e fornecidos pelo departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, sob supervisão do Prof. Dr. Francisco Ronaldo Valenzuela Diaz. Por se tratar de um produto em desenvolvimento e com pedido de patente, o processo de produção encontra-se ainda restrito ao departamento de engenharia da instituição.



Figura 7 - Biomaterial sendo preparado para infusão no útero da vaca. Seta preta, biomaterial (Ribeiro, B.L.M. 2018)

Após a produção e armazenamento dos materiais, eles foram infundidos no útero, utilizando uma seringa de 20 mL e uma pipeta de inseminação artificial de equinos estéril.

#### 4.2. EXPERIMENTO II

O experimento foi realizado na Embrapa Porto Velho- RO, onde, selecionou-se 10 vacas que passaram por mais de 3 protocolos de Inseminação Artificial (IA) e não

emprenharam, “Repeat Breeding” ou repetidoras de serviço. A seleção desses animais deu-se pelo histórico de falhas reprodutivas, além de toda avaliação microbiológica, citológica e principalmente histopatológica.

#### **4.2.1 Implantação das células tronco**

Após confirmar a suspeita da alteração endometrial pelo exame histopatológico, descartada causa infecciosa e/ou hormonal, os animais foram considerados aptos para recebimento das células tronco.

Foi realizado a coleta de células troncos de um doador e posterior crescimento, cultivo celular e estocagem em freezer -80°C.

Um total de  $1 \times 10^9$  células /mL foram diluídas em 0,5 mL de NaCl 0,9% e armazenadas em criotubo. As células foram distribuídas em 20 diferentes pontos (sítio de administração), totalizando volume injetável de 10 mL após nova diluição, espaçadas entre um centímetro, seguindo uma linha horizontal da extremidade de um corno uterino.

O experimento foi dividido em dois momentos, Dia zero e Dia 30.

**Dia 0 (D0)** – Coleta do fragmento uterino por meio da biópsia endometrial, microbiológico e citológico.

Após análise do material no laboratório, constatando degeneração tecidual pelo histopatológico, foi realizado a implantação das células tronco nos animais. Reavaliando o animal após 30 dias à infusão celular.

**Dia 30 (D30)** – Coleta do fragmento uterino 30 dias após a implantação endometrial de células tronco mesenquimais, microbiológico e citológico.

## 4.2.2 Exame Ginecológico

### 4.2.2.1 Avaliação Ginecológica

A avaliação ginecológica dos animais se deu conforme explicado no experimento I, baseada no exame clínico específico estabelecido por Grunert, Birgel e Vale (2005).

### 4.2.2.2 Ultrassonografia

O estudo ultrassonográfico foi realizado com o equipamento Mindray® com probe linear (8-5 MHz), como proposto e Heppelmann, Krüger e Leidl (2013).

Na avaliação ultrassonográfica com corte longitudinal, determinou-se os diâmetros de cornos, presença de conteúdo no lúmen uterino, além das estruturas ovarianas.

### 4.2.2.3 Ultrassonografia Doppler cores- Uterino

A descrição da técnica foi a mesma do experimento I. Avaliação da vascularização do parênquima uterino, utilizou-se a escala colorimétrica estabelecida para padrões reprodutivos descrito por Ginther (2007).

Os procedimentos envolveram a avaliação subjetiva da vascularização do parênquima uterino. Mesométrio e endométrio (0 - sem vascularização a 4 - extremamente vascularizado) conforme o descrito por Ginther (2007) e Ribeiro (2016).

### 4.2.2.4 Citologia Uterina

Após a higienização da vulva com papel e álcool 70%, com o objetivo de diminuir a contaminação da amostra, foi introduzido um aplicador de inseminação artificial modificado para fixação da escova ginecológica descartável de uso humano. Este aplicador foi introduzido no útero por via transcervical sendo a escova exteriorizada e friccionada por movimentos de rotação sobre endométrio (Cytobrush). Com o intento de evitar contaminação com a mucosa vaginal e cervical o aplicador estava protegido por uma bainha francesa utilizada na inseminação artificial. Para fixação celular a lamina foi tratada, em solução a base de etanol. O esfregaço foi então com kit Panótica®.

A avaliação da citologia uterina foi realizada por meio da contagem com diferenciação de 200 células, conforme descrito no experimento I. Considerando animais sem infecção que apresentassem contagem de neutrófilos inferior a 10% preconizado por Kasimanickam et al. (2004).

#### **4.2.2.5 Exame Microbiológico**

As amostras para exame microbiológico foram obtidas pelo mesmo processo de coleta para citologia. A haste da escova ginecológica foi cortada, para a imersão da escova no meio de transporte Stuart (HENSO®) e colocado em isopor com gelo descartável para conservação. Todo material foi processado no laboratório de microbiologia da Universidade de São Paulo-São Paulo.

#### **4.2.2.6 Exame Histopatológico**

A biópsia uterina foi realizada com o uso de uma pinça uterina da marca Hauptner modelo Yeoman de aço inoxidável com 65 cm de comprimento, esterilizada com uso de (CB30TA®) e álcool 70%, tendo sido previamente lavada com solução antisséptica a base de Iodopovidina.

A pinça foi introduzida no útero pela vagina e, ao passar a cérvix, no corpo do útero região do ligamento intercornual, foi retirado o fragmento uterino, com aproximadamente 5 mm de comprimento 2 mm de largura e 2 mm de espessura. Os fragmentos foram fixados em formol 10% e acondicionados em cassetes plásticos para posterior processamento.

O processamento, leitura das lâminas e interpretação das estruturas foram realizadas de acordo com Meira et al. (2012). As amostras de biópsia avaliadas, tratam-se de vacas que não apresentavam nenhum tipo de catarro genital e consideradas “Repeat Breeding” (Figura 8).

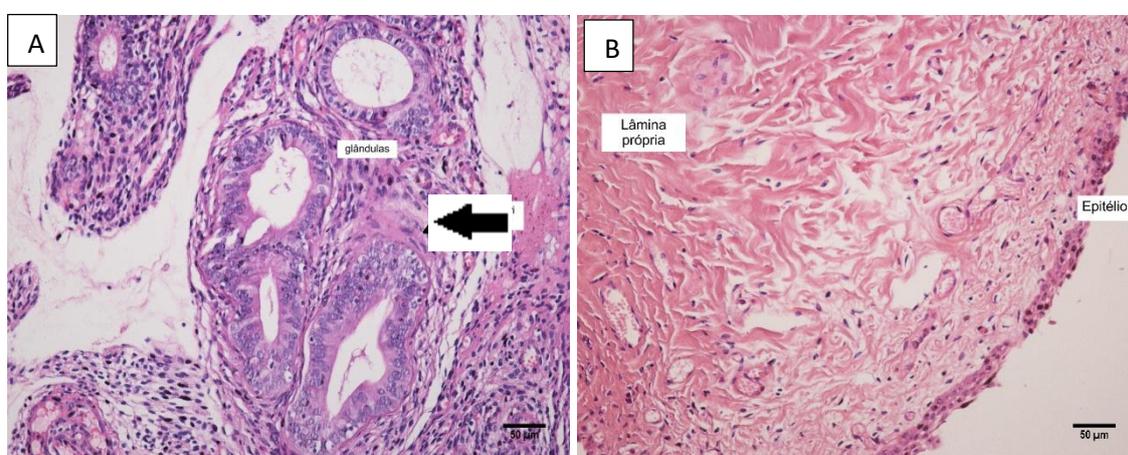


Figura 8 - (A) Tecido endometrial glandular de vacas “Repeat Breeding” seta preta indica fibrina ao redor da glândula; (B) Tecido conjuntivo no parênquima uterino de vacas “Repeat Breeding” (Ribeiro, B.L.M. 2018).

#### 4.2.3 MATERIAIS

##### 4.2.3.1 Células Tronco

A coleta e o cultivo das células tronco ocorreram a partir da coleta de aproximadamente 15 mL da medula óssea de um bovino. Essa amostra foi armazenada em tubo de 50 mL estéril contendo solução salina específica para cultivo celular (HBSS plus 2%) com penicilina e estreptomicina.

Para a coleta de medula óssea, o animal foi sedado com xilazina na dose de 0,02 mg/kg pela via intravenosa, seguida de tricotomia na região lombosacral, para coleta na região da crista ilíaca e processo transverso da vertebra lombar. Após identificação, foi realizado bloqueio anestésico com lidocaína sem vasoconstritor no tecido subcutâneo, seguido de antissepsia no local com clorexidina degermante a 2% e clorexidina alcoólica. Em seguida, a punção foi realizada por meio de agulha modelo Komiyashiki de calibre 8 gauge e 15 cm de comprimento, no sentido dorsoventral perpendicular à pele. (Figura 9)

Após introdução da agulha, foi aspirado conteúdo medular com auxílio de seringa de 20 mL contendo 1 mL de heparina. As amostras foram mantidas em isopor com gelo triturado para preservação e encaminhadas até o laboratório de cultivo celular do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/USP, para o processamento laboratorial de tripsinização, crescimento e congelamento celular, sob supervisão da Prof. Dra. Raquel Yvonne Baccarin.



Figura 9 - (A) Coleta de células tronco, intramedular região lombosacra; (B) Cultivo de células tronco. Aumento 100x. (Ribeiro, B.L.M. 2018; FÜLBER, J. 2018)

Após a produção e armazenamento das células tronco, elas foram transportadas num período de 24 h em Dry Shipper,(Thermo®) de São Paulo para Porto- Velho, Rondônia. Esse transporte manteve à temperatura abaixo de -150°C, fundamental para conservação e inativação do metabolismo celular.

#### 4.2.3.2 Infusão celular

Os criotubos foram descongelados em banho maria à 36° C, sendo posteriormente, centrifugados a 1200 rpm / 10 minutos. Após esse processo, foi desprezado o sobrenadante, solução de conservação celular, preservando o *pellet* de células tronco.

Foram instilados 20 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) nos tubos para desfazer o *pellet*, diluindo as células, proporcionando a realização da infusão de forma transcervical no útero das vacas (Figura 10).



Figura 10 - (A) *Pellet* de célula tronco;(B) infusão intrauterina das células tronco.  
Legenda: (A) seta vermelha pellet de células tronco (Ribeiro, B. L.M 2019)

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística parcial foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 8<sup>®</sup>. As premissas estatísticas da análise paramétrica foram verificadas pelo teste de Shapiro – Wilk e Batlett, em ambos a hipótese nula foi rejeitada, sendo assim utilizou-se diretrizes da análise paramétrica para inferir de forma mais precisa sobre os resultados.

Afim de se comprovar diferença entre os grupos tratamentos fez-se uma análise de variância ANOVA, reafirmada pelo T-test 2way. Para todos os testes realizados foi adotado o nível de significância de 5%.

## 6. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em formato descritivo

### 6.1.EXPERIMENTO I

Foram examinados 37 animais, sendo separados em quatro grupos, assistidos em três tempos com intervalo de sete dias. (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação de animais tratados e curados de acordo com o tempo e o tipo de tratamento

Tratamentos	Nº animais	Dia 0	Dia 7	Dia 14
Limax	10	10	40% (4/10)	100% (10/10)
Limax+Quitosana	12	12	25% (3/12)	66% (8/12)
Quitosana	6	6	16% (1/6)	50% (3/6)
Controle	9	9	0,0% (0/9)	0,0% (0/9)

Fonte: (RIBEIRO, B.L.M., 2019).

#### 6.1.2 Efeito do tratamento Limax sobre as variáveis de ECC, medidas ultrassonográficas e exame ginecológico

A primeira análise realizada foi identificar o efeito dos tratamentos em cada variável estudada com relação ao tempo.

Efeito do tratamento Limax nas variáveis ECC, catarro genital, cérvix, cornos uterinos, Doppler cores e citologia ao logo de três avaliações com intervalo de 7 dias entre elas (Tabela 2).

Tabela 2- Valores médios e desvio-padrão das variáveis Escore de condição Corporal (ECC), catarro genital, cérvix, corno uterino esquerdo, corno uterino direito, Doppler cores e citologia endometrial em 10 animais submetidos ao tratamento Limax, avaliado em três diferentes tempos.

Tabela 2- Valores médios e desvio-padrão das variáveis Escore de Condição Corporal (ECC), catarro genital, cérvix, corno uterino esquerdo, corno uterino direito, Doppler cores e citologia endometrial em 10 animais submetidos ao tratamento Limax, avaliado em três diferentes tempos

	Tratamento Limax		
	Dia 0 Média ±DP	Dia 7 Média ±DP	Dia 14 Média ±DP
ECC	3,25±0,39	3,00 ±0,45	3,13 ±0,54
Catarro genital	2,00±0,74	1,00 ±0,79*	0,00 ±0,71 <sup>#†</sup>
Cérvix	2,83±0,39	2,65 ±0,45	2,68 ±0,33 <sup>#</sup>
Corno uterino esquerdo	2,24±0,80	2,05 ±0,59	1,94 ±0,60 <sup>#</sup>
Corno uterino direito	2,48±0,59	2,04 ±0,63*	2,06 ±0,42 <sup>#</sup>
Doppler	3,00±1,43	1,50 ±0,97*	0,50 ±0,95 <sup>#†</sup>
Citologia	25,00±18,41	11,50±6,72*	5,00 ±3,53 <sup>#†</sup>

Legenda: \* Diferença entre o Dia 0 e Dia 7 pelo teste T de Student pareado (P<0,05), na mesma linha. # Diferença entre Dia 0 e Dia 14 pelo teste T de Student pareado (P<0,05), na mesma linha. † Diferença entre o Dia 7 e Dia 14 pelo teste T de Student pareado (P<0,05), na mesma linha (Ribeiro, B.L.M. 2018).

Ao avaliar o tratamento Limax, não foi constatada diferença ao longo do tempo na variável escore de condição corporal (ECC). Entretanto, ao analisar as variáveis ultrassonográficas, tamanho cervical e diâmetro do corno uterino esquerdo, notou-se diferença entre os dias zero com o dia 14.

Diferentemente do observado na medida do corno uterino direito no qual a diferença é também observada entre os dias zero com o sete. Medidas de contagem de neutrófilos (citologia uterina) e catarro genital diferiram em todos os tempos.

### 6.1.3 Efeito do tratamento Limax+Quitosana sobre as variáveis de ECC, medidas ultrassonográficas e exame ginecológico

Efeito do tratamento Limax + Quitosana nas variáveis ECC, catarro genital, cérvix, cornos uterinos, Doppler cores e citologia ao logo de três avaliações com intervalo de 7 dias entre elas (Tabela 3).

Tabela 3-Valores médios e desvio-padrão das variáveis Escore de condição Corporal (ECC), catarro genital, cérvix, corno uterino esquerdo, corno uterino direito, Doppler cores e citologia endometrial em 12 animais submetidos ao tratamento Limax com quitosana, avaliados em três diferentes tempos

	Tratamento Limax+Quitosana		
	Dia 0 Média ±DP	Dia 7 Média ±DP	Dia 14 Média ±DP
ECC	2,75±0,37	2,75 ±0,38	2,75 ±0,33
Catarro genital	2,00±0,85	1,00 ±1,00*	0,50±1,03 #†
Cérvix	2,81±0,78	2,79 ±1,07	2,67 ±0,93†
Corno uterino esquerdo	2,59±1,75	2,36 ±1,07	2,46 ±1,32
Corno uterino direito	2,32±1,36	2,27 ±1,15	2,32 ±1,10
Doppler	2,50±1,17	1,00 ±1,16*	1,0 ±1,23 #
Citologia	27,00±18,54	19,00±18,96*	9,00 ±19,24#†

Legenda: \* Diferença entre Dia 0 e Dia 7 pelo teste T de Student pareado (P<0,05), na mesma linha. # Diferença entre Dia 0 e Dia 14 pelo teste T de Student pareado (P<0,05), na mesma linha. † Diferença entre Dia 7 e Dia 14 pelo teste T de Student pareado (P<0,05), na mesma linha.

Ao avaliar o tratamento Limax+ quitosana, não foi constatada diferença ao longo do tempo na variável escore de condição corporal (ECC) e nas medidas dos cornos uterinos.

Entretanto, ao analisar as variáveis ultrassonográficas, tamanho cervical, vascularização tecidual pelo Doppler cores, notou-se diferença entre os dias sete com dia 14 para cérvix e do dia zero com dia sete e do dia zero com 14 para o Doppler.

Medidas de contagem de neutrófilos (citologia uterina) e catarro genital diferiram em todos os tempos.

#### 6.1.4 Efeito do tratamento Quitosana sobre as variáveis de ECC, medidas ultrassonográficas e exame ginecológico

Efeito do tratamento Quitosana nas variáveis ECC, catarro genital, cérvix, cornos uterinos, Doppler cores e citologia ao logo de três avaliações com intervalo de 7 dias entre elas (Tabela 4).

Tabela 4-Valores médios e desvio-padrão das variáveis Escore de Condição Corporal (ECC), catarro genital, cérvix, corno uterino esquerdo, corno uterino direito, Doppler cores e citologia endometrial em seis animais submetidos ao tratamento quitosana, avaliado em três diferentes tempos

	Tratamento Quitosana		
	Dia 0 Média ±DP	Dia 7 Média ±DP	Dia 14 Média±DP
ECC	2,88±0,65	2,63 ±0,55	2,63 ±0,65
Catarro genital	2,00±0,75	2,00 ±1,03 <sup>#</sup>	1,00±0,89 <sup>†</sup>
Cérvix	3,00±0,53	2,66 ±0,38	2,84 ±0,40
Corno uterino esquerdo	2,16±0,27	2,08 ±0,80	2,06 ±0,45
Corno uterino direito	1,91±0,35	1,90 ±0,37	1,87 ±0,32
Doppler	1,50±1,21	1,00 ±1,17	0,50 ±1,17
Citologia	16,50±8,60	12,50±3,39	10,0 ±2,88

Legenda: \* Diferença entre Dia 0 e Dia 7 pelo teste T de Student pareado ( $P<0,05$ ), na mesma linha. # Diferença entre Dia 0 e Dia 14 pelo teste T de Student pareado ( $P<0,05$ ), na mesma linha. † Diferença entre Dia 7 e Dia 14 pelo teste T de Student pareado ( $P<0,05$ ), na mesma linha (Ribeiro, B.L.M. 2018).

O grupo tratamento quitosana apresentou diferença ao analisar o catarro genital nos dias zero e 14 e dias 7 com 14. As demais variáveis não apresentaram diferença estatística.

#### 6.1.4 Efeito do tratamento controle sobre as variáveis de ECC, medidas ultrassonográficas e exame ginecológico

Efeito do tratamento controle nas variáveis ECC, catarro genital, cérvix, cornos uterinos, Doppler cores e citologia ao longo de três avaliações com intervalo de 7 dias entre elas (Tabela 5).

Tabela 5-Valores médios e desvio-padrão das variáveis Escore de Condição Corporal (ECC), catarro genital, cérvix, corno uterino esquerdo, corno uterino direito, Doppler cores e citologia endometrial em nove animais submetidos ao tratamento controle, avaliado em três diferentes tempos

	Controle		
	Dia 0 Média ±DP	Dia 7 Média ±DP	Dia 14 Média ±DP
ECC	3,00±0,41	3,00 ±0,38	2,75 ±0,45
Catarro genital	2,00±0,71	3,00 ±0,73	2,00±1,05
Cérvix	2,99±1,09	2,86 ±1,14	2,70 ±1,19
Corno uterino esquerdo	2,04±0,46	2,23 ±0,60	2,31 ±0,57
Corno uterino direito	2,08±0,56	2,00 ±0,66	2,15±0,68
Doppler	4,00±0,73	3,00±0,83*	2,00 ±1,30 <sup>#†</sup>
Citologia	30,00±25,65	28,00±22,17	25,00 ±19,02

Legenda: \* Diferença entre Dia 0 e Dia 7 pelo teste T de Student pareado ( $P<0,05$ ), na mesma linha. # Diferença entre Dia 0 e Dia 14 pelo teste T de Student pareado ( $P<0,05$ ), na mesma linha. † Diferença entre Dia 7 e Dia 14 pelo teste T de Student pareado ( $P<0,05$ ), na mesma linha (Ribeiro, B.L.M. 2018).

O grupo tratamento controle apresentou diferença ao analisar vascularização do parênquima uterino como Doppler cores em todos os momentos; dia zero com dia sete, dia zero com dia 14 e dois com três (dia sete com dia 14). As demais variáveis não apresentaram diferença estatística.

## 6.2. COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS E INTERFERENCIA SOBRE AS VARIÁVEIS ECC, MEDIDAS ULTRASSONOGRÁFICAS E GINECOLÓGICAS

Após o entendimento do efeito de cada tratamento em relação as variáveis estudadas, foi analisada a comparação entre os tratamentos.

### 6.2.1 Efeito dos tratamentos comparado com grupo controle sobre a variável escore de condição corporal (ECC)

Comparação do tratamento Limax, Limax+Quitosana e Quitosana com o grupo controle sobre a variável ECC, ao longo do tempo (Figura 11).

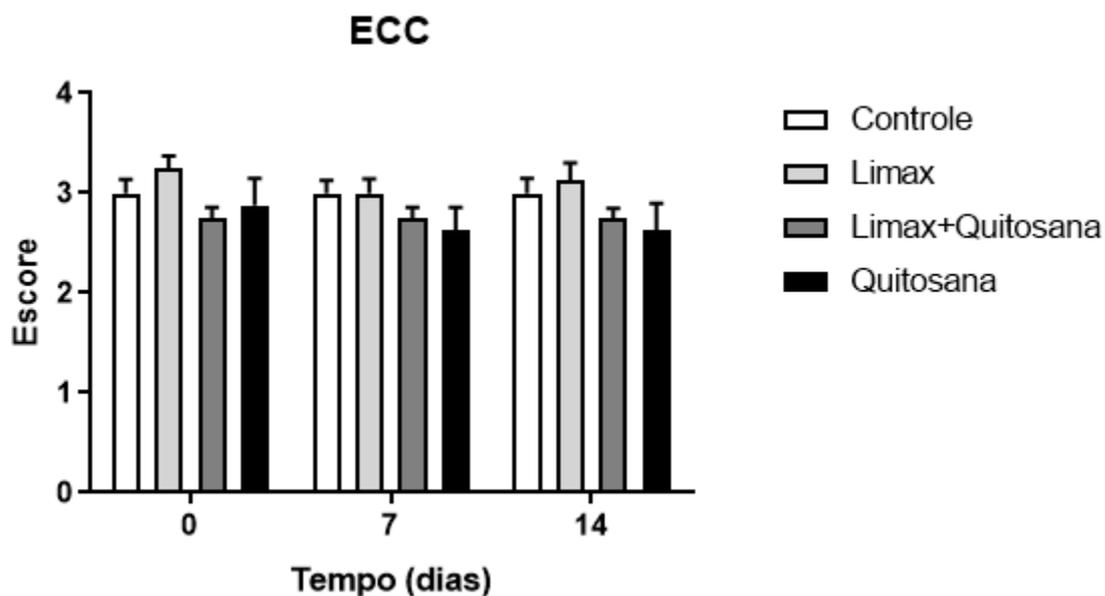


Figura 11 - Valores médios e erros-padrão da medida de ECC comparado os tratamentos com o controle ao longo do tempo. Significância ( $p < 0,05$ ), teste 2 way Anova (RIBEIRO, B.L.M. 2019)

Ao avaliar a variável Escore de condição corporal (ECC) não houve diferença estatística entre os grupos estudados ao longo do tempo.

### 6.2.2 Efeito dos tratamentos comparado com grupo controle sobre a variável - Catarro Genital

Comparação do tratamento Limax, Limax+Quitosana e Quitosana com o grupo controle sobre a variável catarro genital, ao longo do tempo (Figura 12).

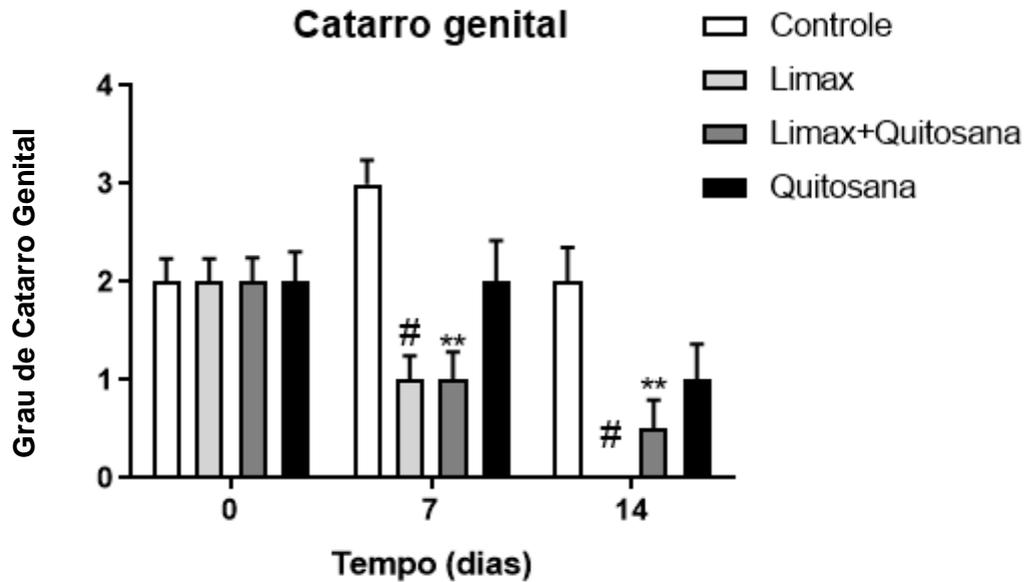


Figura 12 - Valores médios e erros-padrão do catarro genital comparando os tratamentos com o controle ao longo do tempo. Legenda: Significância # ( $p < 0,001$ ) \*\*( $p < 0,01$ ) \* ( $p < 0,05$ ) teste 2 way Anova (RIBEIRO, B.L.M. 2019)

Não foi observada diferença, pelo teste 2 way Anova, entre os tratamentos no dia zero sobre a variável catarro genital. Porém, ao comparar o grupo controle com o grupo Limax observa-se diferença ( $p < 0,001$ ) nos dias sete e 14. Diferença também é notada no grupo Limax +Quitosana ( $p < 0,01$ ) nos dias sete e 14, quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença entre os grupos Quitosana e o controle ao longo do tempo.

### 6.2.3 Efeito dos tratamentos comparado com grupo controle sobre a variável medidas ultrassonográficas –cérvis

Comparação do tratamento Limax, Limax+Quitosana e Quitosana com o grupo controle sobre a variável ultrassonográfica cérvis ao longo do tempo (Figura 13).

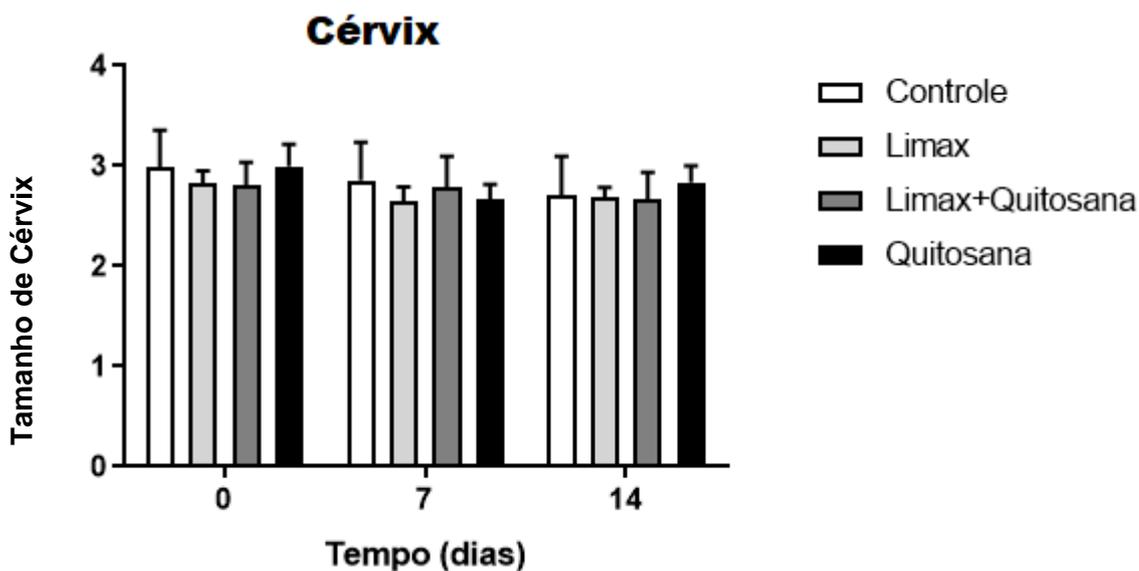


Figura 13 - Valores médios e erros-padrão da medida de cérvix comparado os tratamentos com o controle ao longo do tempo. Significância ( $p < 0,05$ ), teste 2 way Anova (RIBEIRO, B.L.M. 2019)

Ao avaliar a variável medida de cérvix não houve diferença entre os grupos estudados, ao longo do tempo.

#### 6.2.4 Efeito dos tratamentos comparado com grupo controle sobre a variável medidas ultrassonográficas –cornos uterinos

Comparação do tratamento Limax, Limax+Quitosana e Quitosana com o grupo controle sobre a variável ultrassonográfica cornos uterinos ao longo do tempo (Figura 14).

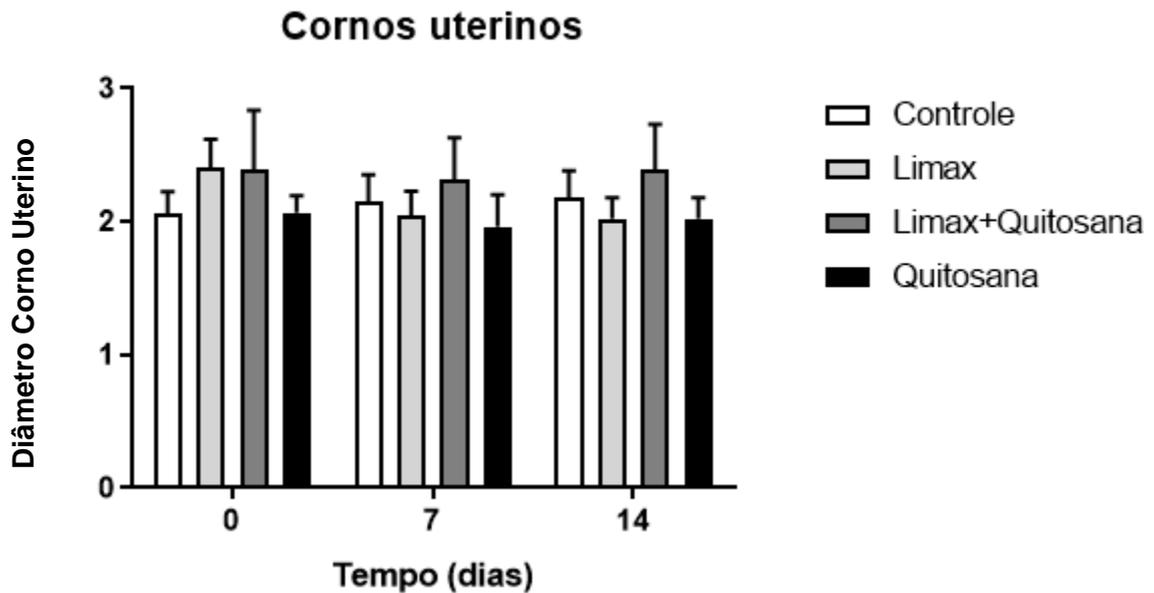


Figura 14 - Valores médios e erros-padrão da medida de cornos uterinos comparado os tratamentos com o controle ao longo do tempo. Significância ( $p < 0,05$ ), teste 2 way Anova (RIBEIRO, B.L.M. 2019)

Ao avaliar a variável medida de cornos uterinos, não houve diferença entre os grupos estudados ao longo do tempo.

### 6.2.5 Efeito dos tratamentos comparado com grupo controle sobre a variável medidas ultrassonográficas –vascularização uterina – Doppler cores

Comparação do tratamento Limax, Limax+Quitosana e Quitosana com o grupo controle sobre a variável ultrassonográfica Doppler cores ao longo do tempo (Figura 15).

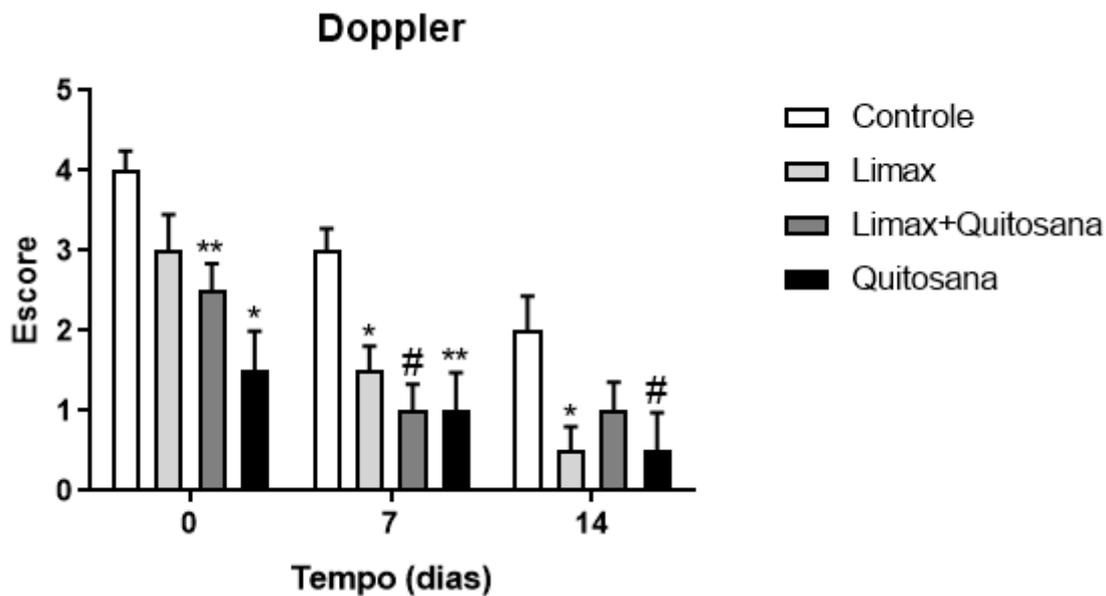


Figura 15 - Valores médios e erros-padrão do Doppler comparado os tratamentos com o controle ao longo do tempo. Legenda: Significância # ( $p < 0,001$ ) \*\*( $p < 0,01$ ) \* ( $p < 0,05$ ) teste 2way Anova (RIBEIRO, B.L.M. 2019)

Ao analisar grupo controle com o grupo Limax obteve-se diferença ( $p < 0,05$ ) nos dias sete e 14.

Houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre o grupo controle com o grupo Limax+Quitosana no dia sete. No dia zero apresentou diferença ( $p < 0,01$ ) na comparação desses dois grupos.

A comparação controle com Quitosana apresentou diferença em todos os momentos dia zero ( $p < 0,05$ ) dia sete ( $p < 0,01$ ) e dia 14 ( $p < 0,001$ ).

### 6.2.6 Efeito dos tratamentos comparado com grupo controle sobre a variável citologia

Comparação do tratamento Limax, Limax+Quitosana e Quitosana com o grupo controle sobre a variável citologia ao longo do tempo (Figura 16).

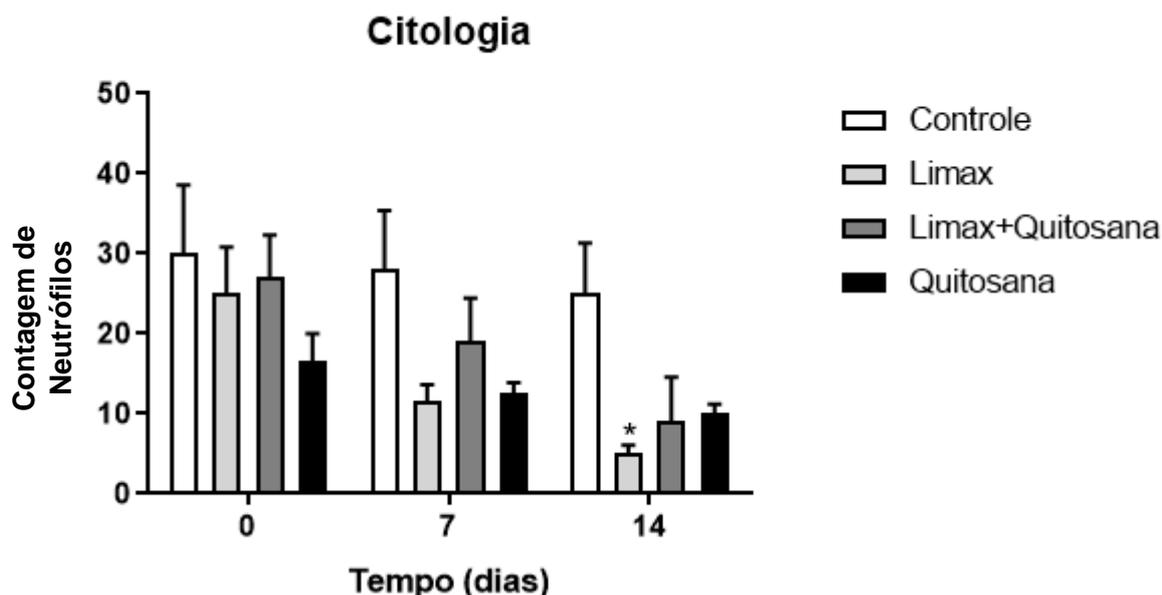


Figura 16 - Valores médios e erros-padrão da citologia, comparando os tratamentos com o controle ao longo do tempo. Legenda: Significância # ( $p < 0,001$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ) \* ( $p < 0,05$ ) teste 2way Anova (RIBEIRO, B.L.M. 2019)

Observou-se diferença significativa, entre o grupo controle com Limax no dia 14 ( $p < 0,05$ ).

### 6.2.7 Micro-organismos encontrados nos diferentes tratamentos

Porcentagem de micro-organismos isolados nos diferentes grupos estudados (Tabela 6).

Tabela 6 - Relação de micro-organismos isolados nos diferentes grupos

Tratamentos	Micro-organismos					
	<i>T. pyogenes</i> n (%)	<i>S. intermedius</i> n (%)	<i>S. aureus</i> n (%)	<i>Streptococcus</i> <i>spp.</i> n (%)	<i>Bacilos</i> n (%)	<i>E.coli</i> n (%)
Limax	(4/10) 40%	(6/10) 60%	(4/10) 40%	(2/10) 20%	(7/10) 70%	(5/10) 50%
Limax+ Quitosana	(2/12) 17%	(6/12) 50%	(8/12) 67%	(1/12) 17%	(8/12) 67%	(5/12) 50%
Quitosana	(1/6) 17%	(5/6) 83%	(5/6) 83%	(1/6) 17%	(4/6) 67%	(4/6) 67%
Controle	(2/9) 22%	(8/9) 89%	(6/9) 67%	(1/9) 11%	(6/9) 67%	(4/9) 44%

Legenda: *T. pyogenes* = *Trueperella pyogenes*; *S. intermedius* = *Staphylococcus intermedius*; *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*; *E. coli* = *Escherichia coli*. Fonte: (RIBEIRO, B.L.M., 2019).

Relação quantitativa de micro-organismos encontrados (Figura17).

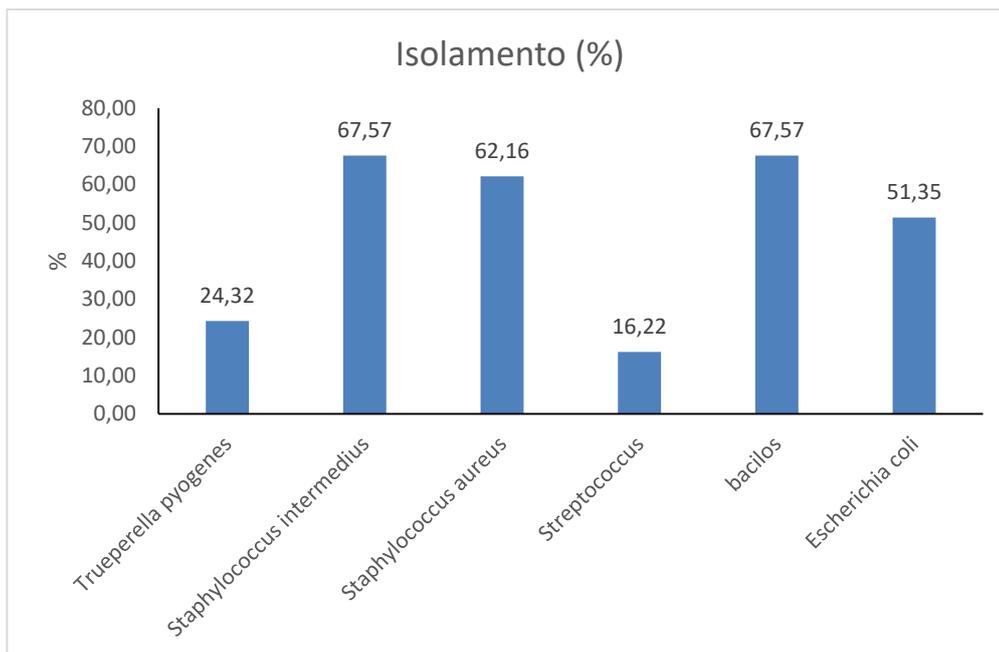


Figura 17 - Proporção de animais positivos para isolamentos por micro-organismo (RIBEIRO, B.L.M. 2019)

### 6.3.EXPERIMENTO II

Após a avaliação de 15 bovinos fêmeas, foram selecionados nove sendo quatro novilhas e cinco vacas, que apresentavam média de seis inseminações artificiais respeitando o cio natural e induzidas com protocolos hormonais, esses animais foram classificados como repetidores de serviço ou “Repeat Breeding”. Os animais da raça girolando locadas na Embrapa Porto Velho –Rondônia, apresentavam controle sanitário e manejo nutricional bem estabelecidos. Foi realizada toda avaliação ginecológica e coleta de material para identificar a provável causa dessa falha reprodutiva. Foi realizada a coleta de material, medidas ultrassonográficas, microbiológico, citológico e histopatológico.

Os resultados do microbiológico identificaram que não havia alta carga bacteriana, além de ser identificado apenas bacilos, não cresceram em meios específicos o *Fusobacterium necrophorum* e a *Trueperella pyogenes*, descartando que a provável causa de falha reprodutiva fosse alguma infecção bacteriana.

Na Citologia todos apresentaram porcentagem abaixo de 10% contagem de neutrófilos caracterizando por Kasimanickam et al. (2004).

Tabela 7 - Valores médios e desvio-padrão das variáveis Escore de Condição Corporal (ECC), corno uterino esquerdo, corno uterino direito, Doppler cores e citologia endometrial em 9 animais submetidos ao tratamento com células tronco, avaliado em dois diferentes tempos com intervalo de 30 dias

	Dia 0	Dia 30
	Média ±DP	Média ±DP
ECC	4,0±0,27	3,75±0,28
Corno uterino esquerdo	1,73±0,31	1,89±0,23*
Corno uterino direito	1,66±0,29	2,18±0,35*
Doppler	1,00±1,33	2,0±0,71
Citologia	2,00±6,00	0,0±0,44

Legenda: \* Diferença significativa entre os momentos Dia 0 e Dia 30 pelo teste T de Student pareado ( $P < 0,05$ ), na mesma linha. Fonte: RIBEIRO, B.L.M., 2019.

Os dados da tabela sete indicam uma diferença nas dimensões dos cornos uterinos direito e esquerdo havendo um aumento no diâmetro de ambos após o tratamento com as células tronco.

Análise das lâminas de biópsia uterina, contendo características observadas entre as amostras (Tabela 8).

Tabela 8 - Características observadas no histopatológico, antes da infusão da terapia celular.

vacas	Observações
38	Projeções revestidas por epitélio endometrial colunar com citoplasma levemente vacuolizado. Fibrose densa e difusa.
39	Endométrio em fase secretora com secreção no lúmen, algumas dilatadas e com células inflamatórias. Presença de leucócitos com granulação eosinofílica. Epitélio endometrial está claro e levemente vacuolizado
49	Epitélio colunar a cuboide com citoplasma levemente vacuolizado. Fibrose densa e difusa.
50	Projeções revestidas por epitélio endometrial colunar com citoplasma levemente vacuolizado. Fibrose densa e difusa.
71	Epitélio colunar com vacuolização leve no citoplasma, glândulas revestidas por epitélio similar. Edema, vasos dilatados e congestos, focos de fibrose.
73	Amostra insuficiente para total descrição.
83	Fragmentos exibem fibrose, sendo em um fragmento frouxa e nos demais densa e difusa.
100	Somente fibrose nos fragmentos
104	Epitélio com citoplasma levemente vacuolizado; há raros neutrófilos, focos de vasos dilatados e congestos, edema superficial e profundo; fibrose

Fonte: (RIBEIRO, B.L.M., 2018).

A tabela 8 indica alterações observadas no histopatológico, em sua maioria há lesão de fibrose no endométrio uterino.

Os nove animais estudados após a última coleta (Dia 30), foi administrado 2mL de prostaglandina (PGF2a), via intramuscular, com o objetivo de lisar o corpo lúteo e esses animais apresentarem cio. As vacas do estudo oito foram inseminadas, porém não apresentaram gestação positiva.

Não foi possível realizar o exame microbiológico das vacas no momento dia 30, pois as amostras não estavam viáveis para análise, pois excederam mais de cinco dias no meio de cultura Stuart, podendo ter contaminação.

Os resultados do histopatológico após o dia 30 não ficaram prontos até a compilação dessa tese.

## **7. DISCUSSÃO**

Este estudo teve como finalidade avaliar e comparar a eficácia de diferentes tratamentos para enfermidades uterinas, em especial a endometrite e em vacas repetidoras de serviço (Repeat Breeding). Para tanto, foram tomadas abordagens inéditas nesse tipo de ensaio clínico, na busca constante por terapias alternativas ao uso de antibióticos, destacando a importância na redução do uso indiscriminado de antibioticoterapia, evitando assim o surgimento de bactérias resistentes e período de carência no leite ou na carne.

### **7.1. EXPERIMENTO I:**

Conforme proposto nesse primeiro estudo, foram estudadas vacas diagnosticadas com endometrite, avaliadas no período de 20 a 40 dias pós-parto. Conforme destacado por Sheldon et al. (2006), a endometrite ocorre a partir do 21º dia pós-parto e se trata de uma inflamação uterina sem sinais sistêmicos de doença, porém ela se destaca por estar relacionada ao desempenho reprodutivo negativo.

Com o intuito de melhorar a precocidade no diagnóstico de endometrite, alguns pesquisadores utilizam avaliação subjetiva visual e tátil referente à quantidade de gordura subcutânea no animal conhecido como escore de condição corporal (ECC), que possui variação de zero (muito magra) a cinco (extremamente gorda) (EDMONSON et al., 1989).

Para Domecq et al. (1997), a diminuição mais pronunciada no ECC entre a 4ª e 8ª semanas após o parto seria um fator predisponente para a instalação da endometrite. Entretanto, o resultado observado neste estudo não mostrou diferença do ECC entre os grupos e nem com relação ao tempo. Sabe-se que a utilização de ECC é ferramenta de controle do rebanho, que permite a análise da condição de reserva energética dos animais e do *status* nutricional do rebanho (HOEDEMAKER; PRANGE; GUNDELACH, 2009). Portanto, variações com baixo ECC no peri-parto são associadas a diminuição da fertilidade e um aumento à predisposição às doenças como metrite, endometrite, doenças podais, deslocamento de abomaso e doenças metabólicas (KIM; SUH, 2003; HOEDEMAKER; PRANGE; GUNDELACH, 2009).

Ao realizar a avaliação ultrassonográfica linear e com Doppler entre animais com endometrite, foi observada diferença entre os tratamentos e as medidas de cérvix e cornos uterinos. Os tratamentos Limax, Limax+ Quitosana demonstram diferença entre os tempos, ou seja, o diâmetro de cérvix e cornos uterinos diminuíram comparados do dia zero ou ao dia sete. Entretanto, o tratamento Quitosana e controle não apresentaram diferença entre os tempos com base nas medidas ultrassonográficas. Além disso, ao analisar os resultados entre os grupos Limax e Limax+quitosana, observamos que o melhor efeito comparado a redução dessas medidas foi com o grupo Limax. Sugere-se que a Quitosana pode ter influenciado nesse resultado, onde talvez a interação dessas substâncias possam continuar por mais tempo interagindo com a mucosa endometrial, prolongado um diâmetro maior dessas estruturas. Contudo, os tratamentos Limax e Limax+ Quitosana demonstraram efeito positivo comparados ao controle nessa involução uterina, havendo diferença entre o tamanho de cérvix e do útero que eram maiores em animais com endometrite. Este resultado está de acordo com o conhecimento sobre a involução normal uterina e da cérvix, pois após o parto o útero encontra-se muito aumentados, pesando aproximadamente de 8 a 10 kg. Em geral, uma involução macroscópica do útero ocorre em aproximadamente 3 a 5 semanas pós-parto, período em que o útero deverá pesar aproximadamente 0,9 kg e o diâmetro do corno uterino pré-

gravídico deverá medir menos que 5 cm (GIER; MARION, 1968). A involução da cérvix por sua vez ocorre mais lentamente, completando o processo por volta das 4 a 6 semanas pós-parto (MORROW et al., 1966).

O estabelecimento da prenhez depois do parto depende do retorno anatômico e funcional do trato genital a um estado semelhante ao anterior à gestação (MATEUS et al., 2002). Slama, Vaillancourt e Goff (1991) e Mateus et al. (2002) provaram que um quadro de infecção uterina proporciona involução retardada, conforme observado no grupo controle e Quitosana, os quais não apresentaram diferença ao longo do tempo. Por esta razão, Wehrend et al. (2003) ressaltaram a importância da avaliação da involução uterina e cervical para auxiliar na diferenciação entre manifestações patológicas e fisiológicas. Os bovinos com endometrite avaliados neste trabalho apresentaram diâmetro de cérvix e cornos uterinos maior, corroborando com LeBlanc et al. (2002a), que caracterizaram vacas com endometrite clínica quando apresentaram diâmetro de cérvix aumentado por palpação transretal após o 20º dia pós-parto, ou com a presença de secreção mucopurulenta ou purulenta observada por vaginoscopia depois do 26º dia pós-parto.

A ultrassonografia Doppler é empregada na medicina desde os anos 90 com intuito de investigar distúrbios hemodinâmicos no útero e ovários durante o ciclo menstrual em mulheres inférteis (STEER et al., 1994) além de possíveis causas de perda embrionária (FERREIRA et al., 2007). Com isso, a medicina veterinária, passou a utilizar essa ferramenta, com a finalidade de melhorar a eficiência reprodutiva nos animais (BOLLWEIN et al., 2000). A vascularização uterina e ovariana são bem utilizadas na área de reprodução animal, pois auxiliam no conhecimento para determinar o melhor momento de realizar uma inseminação artificial e precocidade em determinar prenhez (BOLLWEIN; HEPPELMANN, 2016). Esses estudos avaliaram a velocidade de fluxo sanguíneo uterino e ovariano durante o ciclo estral e gestação nos animais. O modo Doppler cores permite a estimativa subjetiva do grau de vascularização do tecido avaliado, fornecendo imagens coloridas do fluxo sanguíneo (GINTHER; MATHEW, 2004). Neste trabalho foi feita uma adaptação do modelo proposto por Ginther (2007) para avaliação de alterações hemodinâmicas uterinas ligadas a endometrite (RIBEIRO, 2016). Durante o experimento, o modo Doppler mostrou grande variação entre os grupos e os momentos estudados, não havendo consonância entre o efeito dos tratamentos e o tempo com relação à vascularização do parênquima uterino. Visto que o grupo controle apresentou diferença em todos os momentos, torna-se precipitada a comparação de

alteração vascular com endometrite, já que essa alteração na vascularização pode sofrer influência do ciclo hormonal (GINTHER, 2007). Entretanto, Ribeiro (2016) verificou que mesmo apresentando variação vascular entre os grupos endometrite e animais saudáveis, foi observado uma correlação entre o grau de vascularização quatro com a presença de *Trueperella pyogenes*, micro-organismo importante na endometrite.

Outra variável estudada com respeito ao exame ginecológico, se deu pela avaliação e classificação do catarro genital (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005). Esse processo se deu por vaginoscopia e Metricheck, dos quais não tiveram diferença entre eles na classificação do escore do catarro genital (DUBUC et al., 2010). Foi observado que houve diferença estatística comparando os tratamentos com o grau de catarro. O grupo Limax mostrou diferença sete dias após a infusão e essa diferença persistiu até a última avaliação. Resultado também observado no grupo Limax+Quitosana, porém, diferente do encontrado no grupo Quitosana, no qual a diferença só foi observada ao comparar o dia zero com dia 14 e dia sete com dia 14, indicando que esse tratamento apresentou uma melhora após sete dias da administração. O grupo controle não apresentou melhora no catarro durante o tempo, comprovando a importância do tratamento na melhora do grau do catarro. A análise do catarro genital pela vaginoscopia não deve ser utilizada isoladamente como teste ouro para diagnóstico de endometrite, pois não permite diferenciar se a secreção é proveniente da cérvix ou útero (LEBLANC et al., 2002a). Entretanto, Barlund et al. (2008) encontraram especificidade de 95% e sensibilidade de 53,9% tendo como padrão a citologia endometrial.

Ao pensar num teste de padrão ouro para enfermidades uterinas menos invasiva e com alta confiabilidade, Gilbert et al. (2005) e Kasimanickam et al. (2004) defendem a citologia uterina, ressaltando como diagnóstico, prático e eficiente para avaliação de processos infecciosos uterinos, visto que, ao contar a quantidade de neutrófilos, pode-se classificar como havendo um processo infeccioso intrauterino. Nesse estudo foi identificada diferença estatística no grupo Limax e Limax Quitosana ao longo do tempo, quanto à redução de neutrófilos contados na citologia, resultado que não se repete nos grupos Quitosana nem o controle, indicando assim uma melhora nos tratamentos com o Limax e ou Limax+ Quitosana. O grupo Quitosana não apresentou diferença estatística, assemelhando-se ao controle, corroborando com Daetz et al., (2016), que utilizaram Quitosana para tratamento de enfermidades uterinas, em especial a metrite, mas não obtiveram resultado de cura. Outro fator de destaque, que ao comparar o efeito da

citologia entre os tratamentos, o grupo Limax foi o único que mostrou diferença significativa na última avaliação (dia 14), mostrando o efeito positivo desse produto na redução de neutrófilos no endométrio. Acredita-se que o fato de não observar maior frequência na diminuição desses neutrófilos nos outros grupos comparados ao grupo controle, se dá, por algum processo inicial irritativo na mucosa, promovendo maior aporte de células inflamatórias e conseqüentemente, a cura posterior. Entretanto, como a Quitosana não apresentou efeito positivo para cura, ela pode ter influenciado no resultado do grupo Limax+Quitosana, prolongando o processo de cura do animal.

Ao analisar os patógenos presentes no útero, Santos, Gilbert e Bicalho (2011) identificaram a microbiota uterina em animais saudáveis. Desta forma, tornou-se possível associar a presença de patógenos específicos com a doença. Dentre os agentes causadores de infecção uterina destacam-se: *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* e *Bacteroides* spp. (SHELDON; DOBSON, 2004; BICALHO et al., 2010; JEON et al., 2015). Acredita-se que a *Trueperella pyogenes* atue em sinergismos com *Fusobacterium necrophorum*, aumentando a severidade das doenças uterinas (OLSON et al., 1984; WILLIAMS et al., 2005; SHELDON et al., 2006). Bicalho et al. (2012) afirmam que a *Trueperella pyogenes* é reconhecida como um importante agente patogênico associado à endometrite, devido à sua persistência, permanência no útero contaminado. Machado et al. (2012), comprovaram utilizando metagenoma, alta relação de *Trueperella pyogenes* com endometrite.

Neste estudo, o exame microbiológico foi utilizado com o objetivo de identificar quais agentes microbianos estavam envolvidos na manifestação clínica da endometrite. Foram isoladas bactérias do gênero *Bacillus* spp.; *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus* es spp. (De Boer et al., 2015).

Apesar da endometrite ser uma enfermidade com cura espontânea, Dubuc et al. (2011), e que tem uma cura mais rápida ao utilizar antibióticos, novas ferramentas a base de nanotecnologia estão disponíveis a fim de melhorar esses índices, pois essa enfermidade influencia negativamente no índice reprodutivo, gerando ônus econômico nas propriedades (ABHISHEK et al., 2018). Com objetivo de reduzir isso, faz-se importante o uso de novas ferramentas que possam auxiliar numa melhor precisão de tratamento, sem que tenha descarte de leite e que seja efetivo na cura da enfermidade, melhorando os índices reprodutivos dos animais de produção.

Com base nesses resultados, conclui-se que estamos diante de um novo produto que mostrou eficácia para o tratamento de endometrite. O uso da nanotecnologia, biomateriais abrange um apelo mundial para evitar o uso indiscriminado de antibióticos, devido ao surgimento de bactérias resistentes, além de não haver resíduo no leite ou na carne evitando efeitos deletérios a saúde humana e animal.

## 7.2.EXPERIMENTO II

Os resultados do experimento II demonstraram outra vertente para se compreender as causas de infertilidade numa propriedade rural, as chamadas vacas repetidoras de serviço ou “Repeat Breeding”. São inúmeras as causas de infertilidade, como doenças metabólicas (MENDONÇA JÚNIOR et al., 2011), falha no controle sanitário (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006), doenças puerperais com retenção de placenta, metrite (MACHADO, 2012; ALVAREZ, 2009) e falhas hormonais (SARTORI; MOLLO, 2007). Esse estudo proporcionou observar que além desses fatores, há o fato do útero estar inapropriado para receber e fixar o embrião, pois existem modificações estruturais na mucosa, que passa a ter muita fibrina, inviabilizando o processo reprodutivo (ABHISHEK et al., 2018). Sabe-se que essa substituição do endométrio por tecido fibroso está associada a animais mais velhos (SNIDER et al., 2011; WALLCHILI, 1990).

Diversos estudos são realizados a fim de compreender e corrigir os efeitos nutricionais e hormonais nas vacas, objetivando melhora no desempenho reprodutivo (SARTORI; MOLLO, 2007). Entretanto é prática, ao excluir as causas nutricionais, sanitárias e hormonais, descartar vacas que não emprenham mesmo após diversas tentativas, pois envolvem prejuízo econômico (MELLO, 2014).

Em algumas situações em que as vacas apresentam a causa de infertilidade conhecida, como a presença de agentes infecciosos, adota-se alguns procedimentos terapêuticos muito estudados no passado, na tentativa de melhorar as condições uterinas. Dentre as substâncias utilizadas aparecem infusão intrauterina com Lugol (CARVALHO et al., 1982) e cloridrato de tetraciclina (GRUNERT, BIRGEL; VALE, 2005; GOSHEN; SHPIGEL, 2006), e administração hormonal (GALVÃO et al., 2009). Porém, outros pesquisadores observaram em éguas a presença de efeitos deletérios ao endométrio, ou seja, inflamação intensa com aderência e fibrose (ARRUDA et al., 2003).

Nesse contexto, essa intensa fibrose no endométrio já foi relatada em outras espécies, onde em éguas com queixa de infertilidade foi encontrado um elevado percentual de fibrose no útero (SNIDER et al., 2011), corroborando com o que foi observado neste experimento realizado em vacas. Entretanto, Wallchili, (1990), observou alta incidência de fibrose uterina em éguas com idade superior à 11 anos, diferente do que foi observado nesse estudo, onde haviam seis novilhas com idade inferior à 18 meses.

O exame ginecológico, constituído por palpação retal, avaliação ultrassonográfica, citologia e vaginoscopia (GRUNERT, BIRGEL, VALE 2005), não permite avaliar o grau de lesão tecidual, ou seja, processos degenerativos de fibrose, que o histopatológico fornece (DEBOIS; MANSPEAKER, 1986). A biópsia uterina, mesmo sendo um método invasivo, consiste na avaliação histológica do endométrio, permitindo dar prognóstico sobre o potencial reprodutivo da fêmea, bem como orientar o tratamento e o manejo reprodutivo. Além disso, possibilita caracterizar variações histológicas do endométrio decorrentes das atividades hormonais (BONNETT, et al., 1991).

A degeneração endometrial caracteriza-se por proliferação de tecido conjuntivo ao redor das glândulas (VASSENA et al., 2015), corroborando com o visto nesse estudo, onde o tecido conjuntivo denso observado ao redor das glândulas pode dificultar a sua função.

Ao analisar os dados antes e depois da terapia celular, observou-se uma diferença no diâmetro uterino tanto no corno direito como no esquerdo, onde podem ser consideradas algumas hipóteses para a ocorrência desses eventos. A primeira delas trata-se a interferência hormonal, pois é sabido que há alteração uterina fisiológica quanto a fase reprodutiva (GIER; MARION, 1986). A segunda hipótese relaciona-se com a involução tardia do útero. Slama et al. (1991) provaram que um quadro de infecção uterina predispõe a aumento do diâmetro uterino e a involução lenta no puerpério. Mateus et al. (2002) afirmaram que a involução uterina tardia prejudica o retorno desse animal para reprodução. No entanto, essa hipótese está descartada nesse estudo, pois os animais na segunda avaliação citológica, 30 dias após ao tratamento, não apresentavam características de alguma enfermidade uterina.

Outra hipótese relacionada ao aumento do diâmetro uterino, ocorre em decorrência ao que Gutierrez et al. (2009) observaram ao utilizar células tronco em fibrose pulmonar, um aumento de processo inflamatório, seguido do reparo tecidual alveolar, em função da minimização da fibrose no local.

Como critério de seleção dos animais para esse experimento, os mesmos não apresentavam alteração no ciclo estral, visto que foram submetidos a protocolos de inseminação artificial. Ao realizar a avaliação ultrassonográfica, os animais apresentavam estruturas fundamentais no conhecimento do ciclo estral, como por exemplo presença de corpo lúteo (CL) vascularizado (BARBOSA, 2012; GINTHER, 2005).

Alterações no endométrio podem interferir no funcionamento ovariano, prejudicando a ciclicidade desses animais (KINDAHL et al.,1992). Entretanto, Liu et al. (2008) observaram uma relação entre o tratamento com uso de células tronco mesenquimais com a funcionalidade ovariana. Em nosso estudo não foi observado nenhum prejuízo nessa relação, visto que os animais foram inseminados ao término do estudo, quando apresentaram cio. Infelizmente, o resultado dessa inseminação não obteve gestação positiva.

Apesar da reconhecida capacidade regenerativa das células tronco mesenquimais já citada na literatura, em relação ao reparo dos tecidos, não há relatos do seu uso em vacas repetidoras de serviço. Essa terapia foi aplicada em éguas com endometrite, demonstrando resultados promissores para tratamento dessa enfermidade.

Foi observado por Ho et al. (2009) que as células tronco mesenquimais participam do processo de crescimento, remodelação e cicatrização tecidual. Vanessa et al. (2015) constataram que o uso das células tronco mesenquimais promovem aumento do número de células progenitoras, que normalmente estão presentes no tecido afetado, aumentando assim seu potencial de regeneração (CHAN, VILELLA, DEY, SIMON, 2013).

Infelizmente não puderam ser constatadas essas observações, pois não foi possível a realização do exame histopatológico das amostras coletadas ao final do estudo. O material ainda encontra-se em processamento para futura análise, sendo posteriormente incluído na publicação do artigo referente à esse estudo.

## **8. CONCLUSÕES**

Com a análise dos resultados obtidos nessa pesquisa foi possível concluir que:

- São resultados promissores o uso de Limax e ou associado a quitosana para tratamento de endometrite, pois são biomateriais e não apresentam resíduo
- A terapia celular, com células tronco é inovadora e por isso mais estudos devem ser realizados com muito critérios.

## 9. REFERÊNCIAS

ABHISHEK K., BALAMURUGAN B., AJAZ A., RAMAMOORTHY M.; DESH, D.; Therapeutic approach to bovine reproductive disorders: Recent advances and future prospects; **Journal of Entomology and Zoology Studies**; 6(4): 480-484, 2018.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL – ABDI. Nanotecnologia na área da saúde: mercado, segurança e regulação, 2013. Disponível em: <http://www.abdi.com.br/Paginas/estudo>. Acesso em 26 março. 2019.

ALBIHN, A. Standing oestrus, ovarian function and early pregnancy in virgin and repeat Breeding heifers. **J. Vet. Med. A**, v.38, p.212-221, 1991.

ALE, C.E et al. Microencapsulation of Bovine Vaginal Lactobacilli in Alginate Using Emulsion-gelation: Freeze-drying, Storage and Antimicrobial Activity. **J. Bioprocess Biotech**, v. 5, p.262. 2015.

ALI, A.; ABDEL-RAZEK, A.Kh; DERAR, R.; SEHATA, S.H. Forms of reproductive disorder in cattle and buffaloes in middle Egypt. **Reprod Domest Anim**; 44: 580-586;2009.

ALVAREZ, R.H. **Problemas reprodutivos no pós-parto de vacas leiteiras**. 2009.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends. Food Sci. Tech.**, v. 18, p. 240 – 251. 2007.

ARRUDA, R.P.; SOUZA, L.W.O.; CELEGHINI, E.C.C.; SOUZA, F.A.C. Tratamento das endometrites em éguas. **Anais do I SIMEQ**, Curitiba-PR, p. 03-13, 2003.

AZAWI, O.I; ALI, A.J.; LAZIM, E.H. Pathological and anatomical abnormalities affecting buffalo cows reproductive tracts in Mosul. **Iraqi J Vet Sci**; 22: 59-67; 2008.

AYALON, N. A review of embryonic mortality in cattle. **J. Reprod. Fert.**, 54, 483-493;1978.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Ed. Manole, 629 p.1991.

BARANSKI, W.; PODHALICZ-DZIEGIELEWSKA, M.; ZDUNCZYK, S.; JANOWSKI, T. The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds. **Theriogenology**, v. 78, p. 1939-1947, 2012.

BARBOSA, C. C.; SILVA, L. D. M. Ultrassonografia Doppler para avaliação reprodutiva de fêmeas. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 36, n.4, p. 220-224, 2012.

BARLUND, C. S.; CARRUTHERS, T. D.; WALDNER, C. L.; PALMER, C. W. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 6, p. 714-723, 2008.

BHUPINDER, S. S. Nanoprobes and Their Applications in Veterinary Medicine and Animal Health; **Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 2011

BICALHO, M. L. S.; MACHADO, V. S.; OIKONOMOU, G.; GILBERT, R. O.; BICALHO, R. C. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. **Vet Microbiol**, v. 157, n. 1–2, p. 125-131, 2012.

BICALHO, M. L. S.; LIMA, F. S.; MACHADO, V. S.; JR, E. B. M.; GANDA, E. K.; FODITSCH, C.; BICALHO, R. C.; GILBERT, R. O. Theriogenology Associations among *Trueperella pyogenes*, endometritis diagnosis , and pregnancy outcomes in dairy cows. **Theriogenology**, v. 85, n. 2, p. 267–274, 2016.

BICALHO, R.C.; MACHADO, V.S.; BICALHO, M.L.; GILBERT, R.O.; TEIXEIRA, A.G.; CAIXETA, L.S. Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. **J Dairy Sci**, v.93, p. 5818–30, 2010.

BICALHO, M. L.; MACHADO, V.S.; OIKONOMOU, G.; GILBERT, R.O.; BICALHO, R.C. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *fuso- bacterium necrophorum*, and *arcanobacterium pyogenes* and uter- ine diseases of dairy cows. **Vet Microbiol**, v.157, p. 125–31, 2012.

BOLLWEIN, H.; MEYER, H.H.; MAIERL, J.; WEBER, F.; BAUMGARTNER, U.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 53, n.8, p.1541–1552, 2000.

BOLLWEIN, H.; HEPPELMANN, M.; L.; JOHANNES. Ultrasonographic Doppler use for female reproduction management. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 32, n. 1, p. 149-164, 2016.

BOLLWEIN, H.; BAUMGARTNER, U.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2053-2061, 2002.

BOLLWEIN, H.; LUTTGENAU, J.; HERZOG, K. Bovine luteal blood flow: Basic mechanism and clinical relevance. **Reprod, Fertil, Dev**, v. 25, n. 1, p. 71–79, 2013.

BONNETT B.N.; MARTIN S.W.; GANNON V.P.; MILLER R.B.;ETHERINGTON,W.G. Endometrial biopsy in Holstein Friesian dairy cow II. Correlations between histological criteria. **Canadian Journal of Veterinary Reseach**, v.55,p.162-167,1991

BURK J.; RIBITSCH I.; GITTEL C.; JUELKE H.; KASPER C.; STASZYK C.; BREHM W. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. The **Veterinary Journal**, v. 195, p. 98-106, 2013.

CARVALHO, M. R.; FERREIRA, A. M; DE SÁ, W. F., CRUZ, G. M.. F. Eficiência comparativa dos tratamentos intrauterinos para endometrite bovina. **Pesquisa de gado de leite- CNPGL**, Coronel Pacheco, n. 5,p. 0976, 1982.

CHAMPAGNE C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Curr. Opin. Biotechnol**, v. 18, p. 184-190. 2007.

CHAN J, VILELLA F, DEY SK, SIMON C. Molecular Interplay in Successful Implantation. In: Sanders S (ed). Ten Critical Topics in Reproductive Medicine, Washington, DC,Science/AAA. 44-48,2013.

CHEN, F. H.; SONG L.; MAUCK R.L.; WAN-JU L.; TUAN R.S. Mesenchymal Stem Cells. In: LANZA R.; LANGER R.; VACANTI J. Principles of Tissue Engineering. 3. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, chap. 55, p. 823-843.2007.

CHEONG, S. H.; NYDAM, D. V.; GALVAO, K. N.; CROSIER, B. M.; RICCI, A. Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows. **Theriogenology**, v. 77, p. 858–864, 2012.

COPPO, J.A. Nanotecnología, medicina veterinaria y producción agropecuaria. **Revista Veterinaria**, Corrientes, v. 20, n. 1, p 61–71, 2009.

DAHLGREN, L.A. Fat- derived mesenchymal stem cells for equine tendon repair. *Regen. Med.* Vol. 4 (2), p. 14, 2009.

DE BOER, M.; BUDDLE, B.M.; HEUER, C.; HUSSEIN, H.; ZHENG, T.; LEBLANC, S.J.; et al. Associations between intrauterine bacterial infection, reproductive tract inflammation, and reproductive performance in pasture-based dairy cows. **Theriogenology**, v.83, p.1514–1524, 2015.

DEBOIS, C.H.W. E MANSPEAKER, J.E. ENDOMETRIAL BIOPSY OF THE BOVINE.P.424-426IN: MORROW, D. Current Therapy in Theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals. 2 ed. Philadelphia,PA., SAUNDERS, W.B.1986.

DAETZ, R.; CUNHA, F.; BITTAR, J. H. ; RISCO, C. A.; MAGALHAES, F.; MAEDA, Y.; SANTOS, J. E. P.; JEONG, K. C., Clinical response after chitosan microparticle administration and preliminary assessment of efficacy in preventing metritis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** Vol. 99 n. 11, 2016

DOMECQ, J. J.; SKIDMORE, A. L.; LLOYD, J. W.; KANEENE, J.B. Relationship between body condition scores and milk yield in a large dairy herd of high yielding Holstein cows. **J Dairy Sci**, v. 80, n.1,p. 101-12, 1997.

DUBUC, J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; LEBLANC, S. J. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 93, n. 11, p. 5225-5233, 2010.

DUBUC, J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; LEBLANC, S. J. Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 94, n. 3, p. 1339-1346, 2011.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. **J Dairy Sci**, v. 72, n. 1, p. 68-78, 1989.

ELKJAER, K.; ANCKER, M. L.; GUSTAFSSON, H.; FRIGGENS, N. C.; WALDMANN, A.; MOLBAK, L.; CALLESEN, H. Uterine bacterial flora in postpartum Danish Holstein dairy cows

determined using DNA-based fingerprinting: Correlation to uterine condition and calving management. **AnimReprodScienc**, v.138, n. 1, p. 39-48, 2013.

FERREIRA, J. C.; MEIRA, C. Aplicação da ultrassonografia colorida Doppler em programas de transferência de embriões equinos. **Ciênc Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, 2011.

FERREIRA, A. M.; PIRES, C. R.; MORON, A. F.; ARAUJO JUNIOR, E.; TRAINA, E.; MATTAR, R. Doppler assessment of uterine blood flow in recurrent pregnancy loss. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 98, n. 2, p. 115-119, 2007.

FÖLDI, J.; KULCSÁR, M.; PÉCSI, A.; HUYGHE, B.; DE SA, C.; LOHUIS, J. A. C. M.; v.COX, P.; HUSZENICZA, G. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. **Anim Reprod Scienc**, v. 96, n. 3–4, p. 265-281, 2006.

FORTIER, L. A.; SMITH, R. K. Evidence for Stem Cells in Cartilage Regeneration. **AAEP Proceedings**, v. 53, 2007.

GALVÃO, K. N.; FRAJBLAT, M.; BRITTIN, S. B.; BUTLER, W. R.; GUARD, C. L.; GILBERT, R. O. Effect of prostaglandin F2alpha on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 92, n. 10, p. 4906-4913, 2009.

GARGETT, C.E. Stem cells in gynaecology. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 44, p. 380–386. 2004.

GATTEGNO-HO, D.; ARGYLE, S.A.; ARGYLE, D.J.; Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. **The Veterinary Journal**, v.191, p. 19-27, 22,2012.

GIER, H. T.; MARION, G. B. Uterus of the cow after parturition: involutinal changes. **Am J Vet Res**, v. 29, n. 1, p. 83-96, 1968.

GILBERT, R. O.; SHIN, S. T.; GUARD, C. L.; ERB, H. N.; FRAJBLAT, M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, v. 64, n. 9, p. 1879-1888, 2005.

GILEAD, D. In: Chapert 10. SCOTT, G.; GILEAD, D. **Degradable Polymers: Principles and Applications**. Chapman & Hall (Kluwer Acad. Pub.).1995.

GINTHER, O. J.; MATHEW, D. U. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **J Equine Vet Sci**, v. 24, n. 12, p. 516-526, 2004.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Color-Doppler ultrasonography**. Cross Plains,WI: Equiservices Publishing, v.4. 258 p. 2007.

GOMES, R.K.; DAMAZIO, MARLENE, G. **Cosmetologia: descomplicandoos principais ativos**.3 ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2009.

GONZALEZ, H. E.; CROWELL, W.A.;CAUDLE,A.B.; THOMPSON, F.N. Morphometric studies of the bovine uterus: microscopic lesions and retrospective reproductive history. **American veterinary reseach**, v.46,n.12,p.2588-2595,1985.

GOOSEN, M. E. A – “**Applications of chitin and chitosan**”, Technomic Publishing Company, Lancaster (1996).

GOSHEN, T.; SHPINGEL, N.Y. Evaluation of intrauterine antibiotic treatment of clinical metritis and retained fetal membranes in dairy cows. **Theioogenology**, v. 66,n.9,p.2210-2218,2006.

GRÖHN, Y. T.; RAJALA-SCHULTZ, P. J. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, n., p. 605-614, 2000.

GRUMMER, R.R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 2820-2833, 1995.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, W. G. **Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia**. São Paulo: Varela. 551 p.2005.

GUTIERREZ-MARON, T.; ARAUJO I.; MORALES, M. M.; GARCIA, C.S.N.B.; ROCCO, R.M. Terapia com CélulasTronco na síndrome do desconforto respiratórioagudo. **Rev.Bras. Ter. Intensive**. v.21, p.51-57, 2009.

GUTIERREZ-NIBEYRO, S.D. Commercial cell-based therapies for musculoskeletal injuries in horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 27, p. 363-371, 2011.

HAFEZ B, HAFEZ E.S.E.. Reprodução animal. 7ed. Barueri, Manole, 513p, 2004.

HAYDEL, S.E; REMENIH C.M.; WILLIAMS, L.B. Broad-spectrum in vitro antibacterial activities of clay minerals against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant bacterial pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**; 61:353–361; 2008.

HEPPELMANN, M.; KRÜGER, L.; LEIDL, H. B. Science Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during the first two weeks after parturition in Simmenthal heifers. **JVetSci**, v. 14, n. 3, p. 323-327, 2013.

HEUWIESER, W.; TENHAGEN, B. A.; TISCHER, M.; LUHR, J.; BLUM, H. Effect of three programmes for the treatment of endometritis on the reproductive performance of a dairy herd. **Vet Rec**, v. 146, n. 12, p. 338-341, 2000.

HO MH, HEYDARKHAN S, VERNET D, KOVANECZ I, FERRINI MG, BHATIA NN. Stimulating vaginal repair in rats through skeletal muscle-derived stem cells seeded on small intestinal submucosal scaffolds. *Obstetrics & Gynecology*; 114:300-309,2009.

HOEDEMAKER, M.; PRANGE, D.; GUNDELACH, Y. Body condition change ante- and postpartum, health and reproductive performance in German Holstein cows. **Reprod Domest Anim**, v. 44, n. 2, p. 167-173, 2009.

HORTA, A. E. M. Fisiologia do puerpério na vaca. In: JORNADAS INTERNACIONALES DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 8., 1995, Santander. **Anais...** Santander: AERA. p.73-84.1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFICA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Sistema IBGE de recuperação automática - SIDRA**.Rio de Janeiro: IBGE, 2018.

JEON, S. J., A. VIEIRA-NETO, M. GOBIKRUSHANTH, R. DAETZ, R. D. MINGOTI, A. C. PARIZE, S. L. DE FREITAS, A. N. DA COSTA, R. C. BICALHO, S. LIMA, K. C. JEONG, AND K. N. GALVAO. Uterine microbiota progression from calving until establishment of metritis in dairy cows. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:6324–6332, 2015.

JUNQUEIRA, J.R.C.; ALFIERI, A.A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semina: Ciências Agrárias*, v.27, n.2, p.289-298, 2006.

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A.; GARTLEY, C. J.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection

of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 9-23, 2004.

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A.; GARTLEY, C. J.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. The effect of a single administration of cephapirin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 818-830, 2005.

KIM, I. H.; SUH, G. H. Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1445-1456, 2003.

KINDAHL, H.; ODENSVIK, K.; AIUMLAMAI, S.; FREDRIKSSON, G. Utero-ovarian relationships during the bovine postpartum period. **Anim ReproSci**, v. 28, n. 1, p. 363-369, 1992.

KOCH T.G., BERG L.C. & BETTS D.H. Current and future regenerative medicine: principles, concepts and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can. Vet. J.* 50:155-165. 2009

KOERNER J.; NESIC D.; ROMERO J.D.; BREHM W.; MAINIL-VARLET P.; GROGAN S.P. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, p. 1613- 1619, 2006.

KONEMAN, E.; WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P. **Diagnóstico microbiológico**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1465, 2008.

LANGE-CONSIGLIO, A.; CORRADETTI B.; MEUCCI A.; PEREGO R.; BIZZARO D.; CREMONESI F. Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: in vitro proliferative and multilineage potential assessment. *Equine Veterinary Journal*, 2013.

LEBLANC, S. Economics of Improving Reproductive Performance in Dairy Herds. **WCDS Advances in Dairy Technology**, v. 19, p. 201-214, 2007.

LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; KEEFE, G. P.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 85, n. 9, p. 2223-2236, 2002a.

LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; KEEFE, G. P.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in. **J Dairy Sci**, v. 85, n. 9, p. 2237-2249, 2002b.

LEBLANC, S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **JReprod Devel**, v. 56, p. 29–35, 2010.

LEUNG, V.Y.L; CHAN, D.; CHEUNG, K.M.C. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. **European Spine Journal**, v. 15, n. 3, p. 406-413, 2006.

LIU W,X, HE Y, XIE C,. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. **Cytotherapy**, v.10, p.353-63, 2008.

LOPES, P. F.; REIS, R. P.; YAMAGUCHI, L. C. T. Custos e escala de produção na pecuária leiteira: estudo nos principais estados produtores do Brasil. **Rev. Econ. Sociol. Rural**, v. 45, p. 567-590. 2007.

LUO, S.; NETRAVALI, A. N. A study os physical and mechanical properties of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) during composting. **Polymer Degradation and Stability**, v. 80, p. 59-66. 2003.

MACHADO, M. C. P. et al. Estudo do comportamento e caracterização de argilas bentoníticas após processo de liofilização. **Cerâmica [online]**. v.64, n.370, p.207- 213, 2018.

MACHADO, V. S.; OIKONOMOU, G.; BICALHO, M. L. S.; KNAUER, W. A.; GILBERT, R.; BICALHO, R. C. Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomicpyrosequencing of the 16S rRNA gene. **Vet Microbiol**, v. 159, n. 3, p. 460-469, 2012b.

MACHADO, V.S.; KNAUER, W.A.; BICALHO, M.L.; OIKONOMOU, G.; GILBERT, R.O.; BICALHO, R.C. A novel diagnostic technique to determine uterine health of Holstein cows at 35 days postpartum. **J Dairy Sci**, v.95:1349–57, 2012a.

MADOZ, L. V.; GIULIODORI, M. J.; MIGLIORISI, A. L.; JAUREGUIBERRY, M.; DE LA SOTA, R. L. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 97, n. 1, p. 195-201, 2014.

MARQUES JÚNIOR, A. P. Fisiologia do puerpério na vaca. **Rev Bras Reprod Anim**, n.4, p.58-69, 1993.

MARUYAMA, T.; ONO, M.; YOSHIMURA, Y. Somatic stem cells in the myometrium and in myomas. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 31, p. 77–81. 2013.

MATEUS, L.; DA COSTA, L. L.; BERNARDO, F.; SILVA, J. R. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. **Reprod Domest Anim**, v. 37, n. 1, p. 31-35, 2002.

MEIRA JR., E. B. S.; HENRIQUES, L. C. S.; SÁ, L. R. M.; GREGORY, L. Comparison of ultrasonography and histopathology for the diagnosis of endometritis in Holstein-Friesian cows. **J Dairy Sci**, v. 95, n. 12, p. 6969-6973, 2012.

MEIRA JR., E. B. S. **Estudo comparativo entre tratamentos para as endometrites dos graus II e III em bovinos**. 2014. 102 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo 2014.

MELLO, R. R. C. Perdas reprodutivas em fêmeas bovinas. **Agropecuária científica no semiárido**, v. 10, n. 4, p. 7-23, 2014.

MENDONÇA JÚNIOR, A.F.; BRAGA, A.P.B.; RODRIGUES, A.P.M.S. et al. Minerais: Importância do uso na dieta de ruminantes. *Revista Agropecuária Científica no Semiárido*, v.07, n.01, p.1-13, 2011.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; HAYASHI, K.-G.; KAMADA, D.; AWASHIMA, C.; KANEKO, E.; ACOSTA, T. J.; MATSUI, M. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: New observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. **J Reprod Devel** v. 52, n. 1, p. 153–60, 2006.

MONTEIRO, C. M.R.; FARIAS, E.C.; PERRI, S.H.V.; SOUZA, W.M. Estudo das características histológicas do útero e tubas uterinas de vacas e novilhas da raça Nelore (*Bos primigenus indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.45-54, 2003

MONTEIRO, B.S. et al. Terapia celular em reparação óssea - aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.11, s2, p. 95-100, 2008.

MORROW, D. A.; ROBERTS, S. J.; MCENTEE, K.; GRAY, H. G. Postpartum ovarian activity and uterine involution in dairy cattle. **J Am Vet Med Assoc**, v. 149, n., p. 1596-1609, 1966.

MCDOUGALL, S., R. MACAULAY, AND C. COMPTON. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 99:9–23. 2007

NARDUCCI, D. An introduction to nanotechnologies: Whats in it for us. **Vet Res. Commun**, v.31, p.131-137, 2007.

OLSON, J. D.; BRETZALAFF, K. N.; MORTIMER, R. G.; BALL, L. The metritis-pyometra complex. In: MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology**. Philadelphia: Saunders, p.227-236, 1986.

OLSON, J.D.; BALL, L.; MORTIMER, R.G.; FARIN, P.W.; ADNEY, W.S.; HUFFMAN, E.M. Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with pyometra and retained fetal membranes. **Am J Vet Res**, v.45, p. 2251–2255, 1984.

ONO, M. et al. **Role of stem cells in human uterine leiomyoma growth**. PLoS ONE 7 e36935. (doi:10.1371/journal.pone.0036935), 2012.

ORAL, H.; SOZMEN, M.; SERIN, G.; KAYA, S. Comparison of the cytobrush technique, vaginoscopy and transrectal ultrasonography methods for the diagnosis of postpartum endometritis in cows. **J Anim Vet Adv**, v. 8, n. 7, p. 1252-1255, 2009.

PATEL, S.B.; HADIYA, K.K.; CHAVAN, D.B. Incidence of reproductive disorders in cattle and buffaloes in Kaira district of Gujrat. **Indian J Field Vet**; 3: 15-17. 2007.

PENG, Y.; WANG, Y.; HANG, S.; ZHU, W. Microbial diversity in uterus of healthy and metritic postpartum Holstein dairy cows. **Folia Microbiol**, v. 58, n. 6, p. 593-600, 2013.

PLETICHA, S.; DRILLICH, M.; HEUWIESER, W. Evaluation of the Metricheck device and the gloved hand for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows. **Dairy Sci**, v. 92, n. 11, p. 5429–5435, 2009.

PUROHIT, G.N. Recent development of in the diagnosis and therapy of “Repeat Breeding” cows and buffaloes. **CAB Rev Perspect Agricul Vet Sci Nutr Natur Res**. v.3, n.62, p. 1-33, 2008.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artemed Editora S.A,512 p.2005.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. **Veterinary medicine: a testbook of diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 9. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007.

RAGHAVAN, D. "Characterization of biodegradable plastics". **Polym.-Plast. Technol.**, 34:41, 1995.

RIBEIRO, B. L. M. **Avaliação do útero bovino com endometrite utilizando a técnica de ultrassonografia Doppler**. 2016. 72f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016.

RIBEIRO, E. S.; GALVAO, K. N.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Economic aspects of applying reproductive technologies to dairy herds. **Anim. Reprod.**, v. 9, p. 370–387, 2012.

RIBEIRO, E. S.; LIMA, F. S.; GRECO, L. F.; BISINOTTO, R. S.; MONTEIRO, A. P. A.; FAVORETO, M.; AYRES, H.; MARSOLA, R. S.; MARTINEZ, N.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy. **Folia Microbiol**, v. 96, n. 9, p. 5682-5697, 2013.

ROCHE, J.F. Reproductive wastage following artificial insemination. **Vet. Rec.**; 109, 401-404; 1981

RODRIGUEZ, I. G.; GONZALES, H.E.; GALLEGO,M.I.M. Correlation de la morfologia endometrial com aislamentos bacteriológicos em vacas infértiles de la sabana de Bogota. **Revista ICA**, v. 26, p.275-286, 1991.

RUMAYOR, V. G.; IGLESIAS, E. G.; GALÁN, O. R.; CABEZAS, L. G. **Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria**. Madri: Elecé Industria Gráfica, 113p. 2005.

SAH, S.K., NAKÃO, T. Characteristics of “Repeat Breeding” buffaloes in Nepal. **J Reprod Dev**; 52: 335-341; 2006.

SANTOS, J. E. P.; BISINOTTO, R. S.; RIBEIRO, E. S.; LIMA, F. S.; GRECO, L. F.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. **Soc. Reprod. Fertil.** v. 67, p. 387–403, 2010.

SANTOS, T. M.; GILBERT, R. O.; BICALHO, R. C. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 94, n. 1, p. 291-302, 2011.

SANTOS, T. M.; BICALHO, R. C. Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. **PLoS One**, v.7, n. 12, p. 1-10, 2012.

SAR, G.C.; MOHANTY, S.K.; RAY, S.K.H.; MOHANTY, D.N. Endometrial biopsy in infertile cows. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.66,,n.11, p.1100-1105,1996.

SARTORI, R.; MOLLO, M. R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da vaca. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 197-204, 2007.

SCHWINDT TT, BARNABÉ GF, MELLO LEAM. Proliferar ou diferenciar?: Perspectivas de destino das células-tronco. **J Bras Neuro.** ; 16(1): 13-1,2005.

SCOTT, N. R. Nanoscience in Veterinary Medicine. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 31, (supl. 1), p. 139-144, 2007.

SCOTT, N.; CHEN, H. **A National Planning Workshop**: Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. Washington,DC: v.29,2002.

SENEGAGLIA, A.C.; REBELATTO C.L.K.; SUSS P.H.; BROFMAN P.R.S. Expansão de células-tronco da medula óssea e do sangue de cordão umbilical humano. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n.1, p.9-14, 2009.

SHELDON, I. M. et al. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516-1530. 2006.

SHELDON, I. M. The postpartum uterus. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 20, n. 3, p. 569-591, 2004.

SHELDON, I. M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 295-306, 2004.

SHELDON, I. M.; LEWIS, G. S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R. O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516-1530, 2006.

SHELDON, I. M.; CRONIN, J.; GOETZE, L.; DONOFRIO, G.; SCHUBERTH, H. J. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. **Biol Reprod**, v. 81, n. 6, p. 1025-1032, 2009.

SLAMA, H., D. VAILLANCOURT, AND A. K. GOFF. Pathophysiology of the puerperal period: Relationship between prostaglandin E2 (PGE2) and uterine involution in the cow. **Theriogenology** 36:1071–1090,1991.

SNIDER, T.A.; SEPOY, C.; HOLYOAK, G.R. Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. **Theriogenology**;v.75, p.1567-1581, 2011

STEER, C. V.; TAN, S. L.; MASON, B. A.; CAMPBELL, S. Midluteal-phase vaginal color Doppler assessment of uterine artery impedance in a subfertile population. **Fertil Steril**, v. 61, n. 1, p. 53-58, 1994.

THAKUR, S.; SINGH, M. and VASISHTA, N.K. Study on etiology of “Repeat Breeding” in Himchal Pradesh. **Punjab Vet. J.**, v.4, p. 27-29, 2006.

THOMÉ, H. E.; OLIVEIRA, B. M. M.; ARRUDA, R. P.; GUIMARÃES, C. F.; THOMÉ, A. C. S.; BALIEIRO, J. C. C.; FERNANDES, C. B.; CELEGHINI, E. C. C. Métodos de diagnóstico da resposta inflamatória uterina em vacas. **Rev. Acad. Ciênc. Agrár. Ambient.**, v. 11, n. 1, p. 11-16, 2013.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu Editora. 706 p.2008.

Vassena R, Eguizabal C, Heindryckx B, Sermon K, Simon C, van Pelt AM et al. Stem cells in reproductive medicine: ready for the patient? *Human Reproduction*. 30(9):2014-2021.2015

VIDAL, M.A.; WALKER N.J.; NAPOLI E.; BORJESSON D.L. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. **Stem Cells and Development**, v. 21, n.2, p. 273-283, 2012.

WALLCHILI, R.O. Endometrial biopsy in mares under nonuniform breeding management conditions: Prognostic value and relationship with age. **Can Vet. J.**;v.31; p.379-384, 1990.

WEHREND, A.; FAILING, K.; BOSTEDT, H. Cervimetry and ultrasonographic observations of the cervix regression in dairy cows during the first 10 days post partum. **J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med**, v. 50, n. 9, p. 470-473, 2003.

WILLIAMS, L.B., HOLLAND, M.; EBERL, D.D.; BRUNET, T.; COURRSOU, L.Bd. Killer Clays! Natural antibacterial clay minerals. **Mineralogical Society Bulletin**; v. 139:3-8; 2004.

WILLIAMS, E. J.; FISCHER, D. P.; PFEIFFER, D. U.; ENGLAND, G. C.; NOAKES, D. E.; DOBSON, H.; SHELDON, I. M. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 102-117, 2005.