

Metodologia para obtenção de concepto bovino



ISSN 1981-2078

Março, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sudeste
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 19

Metodologia para obtenção de concepto bovino

Rui Machado
Mateus José Sudano
Rogério Taveira Barbosa
Marco Aurélio C. M. Bergamaschi
Mário Binelli

Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP
2009

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luis, km 234

Caixa Postal 339

Fone: (16) 3411-5600

Fax: (16) 3361-5754

Home page: <http://www.cppse.embrapa.br>

Endereço eletrônico: sac@cppse.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Ana Rita de Araujo Nogueira

Secretário-Executivo: Edison Beno Pott

Membros: Maria Cristina Campanelli Brito,

Milena Ambrósio Telles, Sônia Borges de Alencar

Revisão de texto: Edison Beno Pott

Normalização bibliográfica: Sônia Borges de Alencar

Editoração eletrônica: Maria Cristina Campanelli Brito

Foto(s) da capa: Agradecemos a gentileza de Mateus José Sudano em ceder as fotos usadas na capa e na Fig. 1 deste BP&D.

1ª edição on line (2009)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sudeste

Machado, Rui.

Metodologia para obtenção de concepto bovino [Recurso eletrônico] / Rui Machado et al. – Dados eletrônicos. – São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacaogratis/boletim-de-pesquisa-desenvolvimento/Boletim19.pdf/view.>>

22 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Pecuária Sudeste, 19; ISSN: 1980-6841).

1. Bovino 2. Produção animal. 3. Concepto. I. Machado, Rui. II. Sudano, Mateus José. III. Barbosa, Rogério Taveira. IV. Bergamaschi, Marco. Aurélio. C.M. V. Binelli, Mário. VI. Título. VII. Série.

CDD: 636.082

© Embrapa 2009

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	13
Conclusões	18
Referências	19

Metodologia para obtenção de concepto bovino

Rui Machado¹

Mateus José Sudano²

Rogério Taveira Barbosa¹

Marco Aurélio C.M. Bergamaschi¹

Mário Binelli³

Resumo

A mortalidade embrionária precoce é a maior causa de perdas reprodutivas em bovinos. Para aprofundar os conhecimentos sobre essa mortalidade é requerido o uso de ferramentas de estudo em diferentes áreas, tais como a embriologia (morfológica e funcional). Este estudo testou duas técnicas e validou uma delas para a obtenção de conceitos bovinos (embrião + membranas extra-embriônicas) aos 18 dias de gestação. Para tanto, num experimento piloto testaram-se dois métodos: transcervical e cirúrgico. Dez vacas e um reprodutor da raça Nelore (*Bos indicus*) foram acasalados. As coletas de concepto foram feitas 18 dias após cada cobertura. O método transcervical seguiu o procedimento padronizado para a coleta de embriões por lavagem uterina em sistema fechado com sonda de três vias (de Foley), porém de calibre maior (24 G) do que o rotineiramente utilizado. O método cirúrgico teve abordagem por incisão no flanco esquerdo, ventrolateralmente à tuberosidade coxal; após exteriorização do útero, cada corno uterino foi lavado com solução salina fosfatada e tamponada por meio de um cateter flexível acoplado a uma seringa. A exteriorização uterina foi difícil, mas a cicatrização ocorreu normalmente, com restabelecimento reprodutivo após 60 dias. Foram recuperados quatro conceitos pelo método transcervical e nenhum pelo método cirúrgico. Concluiu-se que o método de eleição para coletas em escala de conceitos com 18 dias é o transcervical. Em outro experimento foram usadas 71 vacas, das quais 38 foram submetidas ao método transcervical ($n = 64$ lavagens); nas demais foi feito diagnóstico de prenhez por ultra-som. A taxa de recuperação de conceitos (método transcervical) não diferiu ($P > 0,05$) da taxa de prenhez por ultrasonografia entre lavadas e não-lavadas, e as taxas de recuperação de conceitos após uma, duas ou três lavagens não diferiram ($P > 0,05$). Concluiu-se que a coleta pelo método transcervical produz números confiáveis de recuperação embrionária e não afeta o desempenho reprodutivo subsequente de vacas da raça Nelore.

¹ Méd. Vet., M. Sc., Dr., Embrapa Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luiz, km 234, 13560-970, São Carlos, SP.

² Méd. Vet., Mestrando em Fisiologia da Reprodução, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Distrito de Rubião Júnior, s/nº, 18.618-000, Botucatu, SP.

³ Eng. Agr., M. Sc., Ph. D., Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte, 225, 13635-900, Pirassununga, SP.

Methodology to collect the bovine conceptus

Abstract

Early embryo mortality is the major cause of reproductive losses in cattle. In order to increase the knowledge on that issue, utilization of research tools in different areas such as embryology is required. The present study validated a technique to obtain the bovine conceptus (embryo + extraembryonic membranes). A pilot experiment was devised to compare transcervical and surgical methods. Ten Nelore (*Bos indicus*) cows were mated to a Nelore bull and conceptus collection was proceeded 18 days after each service. Transcervical method followed the standard procedure for embryo collection, by way of uterine flushing in a closed system, with a three way Foley catheter, wider in diameter than the usually (24 G) employed. Surgical method was proceeded through an incision on the left flank in order to expose the uterus and to flush a saline phosphate buffered solution into each uterine horn by means of a flexible catheter coupled to a syringe. Uterine exposure was difficult to be accomplished. Cicatrization was normal and reproductive function was reestablished 60 days later. Four conceptuses were recovered with transcervical method and no conceptus was obtained with the surgical approach. In conclusion, the technique of choice for collecting large numbers of 18-days old conceptuses is the transcervical method. In another experiment, 71 Nelore cows were separated in two groups: 38 females were submitted to transcervical method (64 collections performed) and the remaining cows to ultrasound diagnosis of pregnancy. Recovery rate of conceptuses did not differ ($P > 0.05$) from ultrasound pregnancy rate. In addition, recovery rates did not differ ($P > 0.05$) after the first, the second or the third uterine flushing. It was concluded that collection through transcervical method gives reliable results on conceptus recovery and that it did not impair subsequent reproductive performance of Nelore cows.

Introdução

O componente mais importante da produtividade animal é a eficiência reprodutiva, que é o fator que individualmente mais influencia a lucratividade da exploração pecuária (NEUMANN e LUSBY, 1986). Portanto, o retorno econômico depende da obtenção de elevadas taxas de parição. Entretanto, em rebanhos de raças européias criados no hemisfério norte essas taxas após uma única inseminação artificial situam-se entre 50% e 55% em novilhas, entre 52% e 57% em vacas leiteiras e por volta de 53% em vacas de corte (DISKIN e SREENAN, 1980), a despeito de serem alcançadas taxas de fertilização de 96% a 100% (AYALON, 1978). No Brasil, há estimativas de taxas de prenhez próximas aos 50% em bovinos de corte (PEREIRA, 1999). Porém, ainda persiste a necessidade de informações científicas sobre a real taxa de parição, bem como sobre a frequência, o período de ocorrência e as causas das perdas embrionárias e das perdas fetais. Um dos motivos da carência de tais informações sobre o rebanho nacional decorre da inexistência de técnicas apropriadas para o estudo das funções uterinas em vacas, incluindo o reconhecimento materno e a manutenção da prenhez.

O objetivo do presente Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento foi avaliar duas técnicas, uma invasiva e outra não-invasiva, para coleta de conceptos bovinos e de fluidos para a análise do microambiente uterino, uma vez que estudos sobre a viabilidade dos conceptos e das condições do microambiente que os mantêm são fundamentais para entender e otimizar os processos de reconhecimento materno e de manutenção da prenhez.

Revisão de Literatura

Numa extensa revisão de Vanroose et al. (2000), concluiu-se que a maioria das perdas de prenhez em vacas ocorre nos primeiros dias após a fertilização e durante o processo de implantação, ou seja, na fase embrionária da prenhez, e essas perdas podem atingir de 20% a 40%. De fato, a perda da prenhez divide-se cronologicamente em morte embrionária – precoce ou tardia, e morte fetal. A mortalidade embrionária precoce se dá no período de manutenção do corpo lúteo, entre 15 e 17 dias após a ovulação, e a tardia se estende até a fase de diferenciação, aos 42 dias de prenhez (SANTOS et al., 2004). É importante ressaltar que as causas não-infecciosas respondem por

mais de 70% das perdas embrionárias (CHRISTIANSON, 1992), o que ilustra a importância dos distúrbios do reconhecimento materno e da luteólise na ocorrência da mortalidade embrionária. Nesse contexto, pode-se definir um período crítico no ciclo reprodutivo da vaca, cuja fisiologia deve ser ajustada de não prenhe para o estado de gestante. Esse período crítico situa-se entre os dias 15 e 17 após a ovulação e nele deve ocorrer o bloqueio da luteólise (BINELLI et al., 2001).

O completo mecanismo da luteólise ainda não é totalmente conhecido. Porém, Mann e Lamming (1995) verificaram que para ocorrer a supressão da liberação preestabelecida de pulsos luteolíticos da prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) pelo útero gestante, no período crítico, é requerida a presença de um concepto bem desenvolvido e capaz de sinalizar bioquimicamente sua existência para a unidade materna. Do contrário, as células epiteliais do endométrio seguem sua programação para ocorrência da luteólise, o ciclo ovulatório é mantido e a gestação é interrompida (BINELLI e THATCHER, 1999).

O interferon- τ , uma citocina produzida pelo embrião, é a principal molécula sinalizadora da presença do concepto no útero materno e é secretado pelas células mononucleares do trofotoderma, no estágio precoce de desenvolvimento embrionário (THATCHER et al., 2001). A secreção de suficiente quantidade de interferon- τ para que o reconhecimento materno da prenhez seja bem sucedido depende da secreção luteínica de progesterona, hormônio que regula a taxa de desenvolvimento embrionário (MANN et al., 1999) e mantém a gestação (THATCHER et al., 2001). De fato, Mann e Lamming (1995) relataram maior concentração de metabólito da $PGF_{2\alpha}$ nas vacas com concentração plasmática de progesterona mais baixa, o que as tornava mais predispostas às perdas embrionárias.

Há indicações científicas de que o processo da luteólise é acionado antes mesmo do período crítico. De fato, Banu et al. (2003) estudaram a proteína transportadora de prostaglandinas (PGT), uma enzima envolvida no transporte de prostaglandinas através das membranas, e verificaram que a expressão máxima do RNA mensageiro para a PGT e o aumento da própria PGT já ocorre no dia 13 e também no dia 18 do ciclo estral. No entanto, o embrião assegura sua sobrevivência pela produção de moléculas sinalizadoras da sua presença no útero desde o 10º dia do seu desenvolvimento (PETERS et al., 1992).

O reconhecimento da prenhez, a sobrevivência embrionária e a sobrevivência fetal também são influenciados por outros fatores, tais como o

estresse térmico, responsabilizado por perdas da prenhez de até 42,7% (CARTMILL et al., 2001); o estado nutricional da vaca, conforme relatado por López-Gatius et al. (2002) e Silke et al. (2002), que verificaram perdas significativas de prenhez quando houve diminuição do escore de condição corporal (ECC); e as doenças caracterizadas por hipertermia e aquelas com sede no ambiente uterino. No entanto, apesar da importância das doenças infecciosas, Christianson (1992) afirmou que 70% da mortalidade embrionária têm origem não-infecciosa. Na verdade, a eficiência reprodutiva, avaliada por qualquer índice (taxa de concepção ao primeiro serviço, taxa de prenhez, etc.) está sujeita a numerosas e diversificadas variáveis, o que dificulta a análise de apenas uma delas isoladamente. Efetivamente, Caraviello et al. (2006) analisaram o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras por meio de algoritmos e criaram uma “árvore” para estudar o efeito das diferentes decisões sobre o manejo e sobre a predição da probabilidade de uma vaca ficar prenhe até os 150 dias de lactação. Foram incluídas muitas variáveis de natureza distinta, observando-se interações entre elas. Foi destacado que a porcentagem de déficit no ECC dentro do rebanho é uma das variáveis explanatórias mais importantes que afetam o estado de prenhez até 150 dias de lactação.

Nesse contexto, é mister o desenvolvimento de ferramentas de estudo fisiológico para obter conhecimentos básicos que darão suporte à geração de tecnologias e de práticas de manejo capazes de reduzir a mortalidade embrionária bovina e conseqüentemente favorecer o estabelecimento e a manutenção da prenhez.

Material e Métodos

Os estudos foram desenvolvidos na Embrapa Pecuária Sudeste em São Carlos, na região central do Estado de São Paulo. O clima é tropical, do tipo CwA na classificação de Köppen, caracterizado por verão quente e inverno seco. Foram realizados os seguintes experimentos: Experimento 1 (piloto) – objetivou comparar a obtenção de conceptos (embrião + membranas extra-embrionárias) de 18 dias de idade por dois métodos: transcervical e cirúrgico – baseado numa modificação da técnica de Lima (2006); e Experimento 2 – objetivou validar o método transcervical de obtenção de conceptos no período crítico do reconhecimento materno da prenhez.

Experimento 1

Dez vacas cíclicas e um reprodutor da raça Nelore (*Bos indicus*) foram mantidos juntos para que ocorresse o acasalamento. O touro foi equipado com buçal marcador. As datas de cobertura foram anotadas e as coletas de concepto foram feitas 18 dias após cada cobertura.

O método cirúrgico baseou-se numa incisão de aproximadamente 15 cm realizada a 8 cm ventrolateralmente à tuberosidade coxal esquerda. Antes de se iniciar o procedimento cirúrgico, foi aplicada anestesia epidural baixa e local infiltrativa, tricotomia, lavagem e desinfecção local. Foram incisados a pele, os músculos oblíquos abdominais (externo e interno) e o transverso do abdome. O peritônio sofreu um pique para a introdução da mão, e para a localização e a exteriorização do útero. O conteúdo uterino foi coletado por meio de um cateter flexível (acoplado a uma seringa de 60 mL com solução salina fosfatada e tamponada) inserido no lume de cada corno uterino, de modo a permitir a lavagem. A recuperação, por gravidade e por massagem uterina, ocorreu em um béquer de 100 mL. Em seguida e sob estereomicroscópio (aumento de 80 vezes) foi efetuada a verificação da presença, a constatação da integridade e a mensuração do concepto. A sutura foi feita em quatro planos, tomando-se os cuidados de assepsia requeridos. No pós-operatório foram aplicados por via intramuscular uma dose de PGF_{2α} e antibióticos de amplo espectro.

O método transcervical foi baseado numa técnica descrita por Reichenbach et al. (2001) para a coleta de embriões de vacas superovuladas, mas modificada (Fig. 1) pelo uso de uma sonda de três vias (Foley catheter) com calibre maior, de 24 G (ARNOLD, D. R., McGill University Health Centre, Montreal, 2007 – comunicação pessoal). A sonda de Foley é um cateter de borracha que contém um balão inflável na sua extremidade distal. Para facilitar o trabalho e para minimizar o desconforto da vaca foi aplicada anestesia epidural caudal baixa com 5 mL a 7 mL de lidocaína a 2%. Houve lavagem dos cornos uterinos, com o animal em estação e com o serviço de um operador e de um auxiliar. Inicialmente o cateter foi introduzido e posicionado na porção final dos cornos uterinos (justaposta ao óstio cervical interno). Para introdução do cateter foi inserido um mandril de metal em seu lume para torná-lo rígido. Após posicionamento dessa sonda, o balão foi inflado com 10 mL a 12 mL de solução salina ou 10 mL a 20 mL de ar. Em seguida o mandril foi sacado e a lavagem uterina foi feita simultaneamente em ambos os cornos por meio de sessões consecutivas com fluxo de aproximadamente 50 mL a 60 mL de meio de coleta



1. Rebanho experimental.



2. Equipamento para coletas.



3. Introdução da sonda de coleta.



4. Lavagem uterina.



5. Coleta das estruturas por filtragem.



6. Busca por conceitos estereomicroscópio com aumento de até 80X).



7. Concepto (dia 18).

Fig 1. Coleta de conceitos (dia 18) pelo método transcervical.

Fotos: Matheus José Sudano.

por vez, até que se completassem em média 1000 mL por vaca. O meio de coleta usado foi a solução salina fosfatada e tamponada, preaquecida entre 25°C e 30°C. Portanto, a obtenção do lavado ocorreu em sistema fechado, do qual recolheu-se o meio de lavagem dos cornos uterinos por gravidade. O frasco que continha o meio de lavagem permaneceu na extremidade elevada do sistema, acoplado a um tubo de plástico flexível e translúcido, por onde fluiu o meio de coleta. Na outra extremidade havia um filtro para a obtenção dos conceptos. O meio de colheita fluiu através do tubo acoplado ao recipiente, bem como através do cateter em direção aos cornos uterinos. O recipiente foi mantido um metro acima da garupa do animal. O manejo da solução para dentro e para fora do útero foi controlado por meio de grampos fixados nos tubos flexíveis, que ora se abriam num sentido, ora em outro. Embora os conceptos pudessem ser vistos com olho desarmado, todo o conteúdo do filtrado foi examinado em placas de Petri (12 cm de diâmetro). A manipulação foi feita com auxílio de micropipeta de vidro sob estereomicroscópio (aumento de 50 a 80 vezes). Os conceptos foram avaliados e medidos com régua graduada em milímetros posicionada por baixo da placa de Petri. Os conceptos (ou fragmentos) encontrados foram transferidos para microtubos de polipropileno do tipo *Eppendorf* que continham 1,5 mL de solução salina formolizada (10%) para preservação e futuros estudos.

Experimento 2

Foram usadas 71 vacas da raça Nelore (*Bos indicus*), com idade entre cinco e onze anos, que tinham pelo menos 90 dias pós-parto. As fêmeas tinham média de peso vivo de $416,05 \pm 4,61$ kg e ECC (escala de 1 a 9) de $5,48 \pm 0,06$. As vacas foram submetidas ao exame ginecológico por palpação retal e ultra-sonografia transretal, sendo utilizadas apenas aquelas portadoras de corpo lúteo ou folículo com diâmetro maior do que 10 mm associado com turgidez uterina. O manejo adotado foi o sistema intensivo de rotação de pastagem em piquetes de capim-marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) e de capim-tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia). Havia nos piquetes livre acesso a suplemento mineral e água. As vacas foram submetidas a uma estação de reprodução com 90 dias de duração, baseada na detecção do estro espontâneo por meio de observação visual, duas vezes ao dia durante 45min. Esta tarefa foi auxiliada por dois rufiões (relação de 1:35) equipados com buçal marcador. As vacas foram inseminadas artificialmente por cinco inseminadores, com sêmen de três touros da raça Nelore de fertilidade comprovada. O inseminador e o touro foram distribuídos aleatoriamente para as

vacas, conforme elas apresentaram estro. Formou-se um grupo composto por 38 vacas, as quais foram submetidas à coleta transcervical do concepto (18 dias após a inseminação), seguida por aplicação intramuscular de análogo sintético da $PGF_{2\alpha}$. As vacas deste grupo que ainda regressaram ao estro, após a primeira coleta e dentro do período da estação reprodutiva, foram inseminadas novamente e submetidas à coleta do concepto uma segunda ou uma terceira vez. O restante do lote ($n = 33$) formou outro grupo que foi submetido ao diagnóstico de gestação por ultra-sonografia (ROCHA, 2000) aos 28 e aos 42 dias após a inseminação, e aos 60 dias e sucessivamente a intervalos de 30 dias, por palpação retal, até o parto. Utilizou-se um aparelho Mind-Ray, modelo Vet 33000, em modo B, acoplado a transdutor de 7,5 MHz. Os resultados foram analisados por meio do programa *SAS for Windows* (SAS, 2000). As variáveis discretas foram submetidas à análise de variância por meio do procedimento GLM e seus valores foram expressos por média \pm erro padrão da média. As variáveis mensuradas como taxas foram expressas em proporções e analisadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2) com o procedimento FREQ.

Resultados e Discussão

Experimento 1

No método cirúrgico a exteriorização do útero foi muito dificultada pela forte resistência dos ligamentos uterinos e pela ampla distância entre a incisão e a inserção do útero na cavidade pélvica. Tal circunstância tornou difícil o acesso à parede do útero, com prejuízo das manobras para inserção do cateter flexível no lume uterino. Nenhum concepto foi recuperado de duas vacas submetidas ao método cirúrgico. Por causa disto, o método cirúrgico não foi aplicado nas outras três vacas que haviam sido designadas para esse tratamento. Não obstante, as vacas submetidas à intervenção apresentaram cicatrização normal e tiveram restabelecimento reprodutivo (apresentação de estro) antes de se completarem 60 dias da intervenção. Não foi observada qualquer ocorrência pós-operatória anormal. Estes achados são distintos dos resultados de Lima (2006), que teve sucesso na manobra de exposição do útero, embora as vacas tenham posteriormente sido destinadas ao descarte, pois não restabeleceram sua função reprodutiva normal após a intervenção. Além disso, neste experimento piloto, o cateter foi removido e a sutura em todos os planos foi realizada imediatamente após a coleta, o que favoreceu o restabelecimento

reprodutivo das fêmeas. No experimento de Lima (2006), o cateter permaneceu *in situ* por longo período, o que deve ter colaborado para as ocorrências pós-cirúrgicas por ele relatadas.

Foram recuperados quatro conceptos (três íntegros e um hemorrágico) de oito vacas submetidas ao método transcervical.

Experimento 2

Ao final da estação de reprodução verificaram-se médias de aumento ($P < 0,05$) de 88,1 kg no peso vivo ($504,14 \pm 5,73$ kg) e de 0,5 no ECC ($6,00 \pm 0,05$) das vacas. Apenas duas vacas (2,8%) não apresentaram estro e, em média, a primeira inseminação artificial ocorreu decorridos $14,03 \pm 1,29$ dias ($n = 69$) do início da estação. Nas vacas confirmadas prenhes após a 1ª inseminação (pela coleta de concepto ou visualização ultra-sonográfica), este serviço ocorreu em média $25,37 \pm 2,43$ dias após o início da estação. Estes achados são compatíveis com a eficiência reprodutiva verificada por Bergamaschi (2005), o que assegura que os resultados deste experimento são os tipicamente obtidos nas condições a que esse rebanho foi mantido.

Ao longo da estação, foram realizadas 164 inseminações artificiais nessas vacas; 24 delas foram inseminadas uma única vez (todas estavam prenhes e pertenciam ao grupo de vacas submetidas à ultra-sonografia), 13 foram inseminadas duas vezes, 17 foram inseminadas três vezes, 12 foram inseminadas quatro vezes e três foram inseminadas cinco vezes. Portanto, 45 vacas foram inseminadas mais de uma vez e houve 95 repetições de inseminação [(164 – 24 = 140) – 45]. Dessas 95 inseminações, 31 foram devidas a retorno ao estro e sete vacas retornaram ao estro após a 1ª inseminação. As demais repetições de inseminação ($n = 64$) foram devidas à interrupção de uma possível prenhez causada pela realização da lavagem uterina.

Dessas 45 vacas inseminadas mais de uma vez, 38 foram submetidas à lavagem; 18 delas foram lavadas duas vezes e quatro foram lavadas em três ocasiões. Ao final da estação, havia sete vacas que não se tornaram prenhes. Duas dessas haviam sido lavadas após a 1ª inseminação e não mais retornaram ao estro.

As taxas de concepção após as várias inseminações artificiais foram diferentes ($P < 0,01$) e seus valores constam na Tabela 1. A despeito de o objetivo do presente estudo ser outro, verifica-se (Tabela 1) que os resultados obtidos são compatíveis com os de um rebanho comercial nacional bem manejado (PEREIRA, 1999). De fato, o principal objetivo do manejo reprodutivo é obter o

número máximo de vacas prenhes no mais curto período de tempo possível (CAVESTANY et al., 2003). Os resultados deste experimento atendem a este preceito, pois alcançaram potencialmente as metas estabelecidas por Randle (1993), que sugeriu que o manejo da reprodução em bovinos de corte deve visar à obtenção de 70% das vacas com parição nos primeiros 21 dias da estação de nascimentos. Tal desempenho pode ser atribuído aos critérios de seleção das vacas, que consideraram o ECC e a avaliação ginecológica, o que assegurou alta taxa de ciclicidade do rebanho. Cutaia et al. (2003) encontraram correlação de 0,9 entre a porcentagem de prenhez e a condição corporal das fêmeas.

As taxas de recuperação de conceptos após a 1ª, a 2ª e a 3ª lavagem uterina não foram diferentes ($P > 0,05$) e seus valores constam na Tabela 2. Não houve efeito significativo do touro ($P > 0,05$) nem do inseminador ($P > 0,05$) sobre as taxas de recuperação de conceptos ou de concepção.

Tabela 1. Taxa de concepção após a inseminação artificial (IA).

Ordem da IA	Número de IAs	Número de diagnósticos positivos ¹	Concepção (%) ²
1ª IA	69	48	69,5 ^a
2ª IA	45	21	46,7 ^{b,c}
3ª IA	32	12	37,5 ^c
4ª IA	15	4	26,7 ^c
5ª IA	3	1	33,3 ^c
Total de IAs	164	86	52,4

¹ Por recuperação de concepto pelo método transcervical ou por ultra-sonografia.

² $a > b$ ($P < 0,01$; $\chi^2 = 6,01$); $a > c$ ($P < 0,01$; $\chi^2 = 9,32$); $b = c$ ($P > 0,05$; $\chi^2 = 0,64$).

Tabela 2. Taxas de recuperação de conceptos¹ após a lavagem uterina.

Lavagens	1ª lavagem			2ª lavagem			3ª lavagem		
	n	Concepção	Taxa de concepção	n	Concepção	Taxa de concepção	N	Concepção	Taxa de concepção
1x/vaca	16	10	62,5%	-	-	-	-	-	-
2x/vaca	18	12	66,7%	18	11	61,1%	-	-	-
3x/vaca	4	3	75,0%	4	2	50,0%	4	1	25,0%
concepção	65,8% (25/38) ^{ns}			59,1% (13/22) ^{ns}			25,0% (1/4) ^{ns}		

¹ Foi considerada concepção quando havia concepto presente no lavado uterino.

ns = não houve diferença significativa ($P > 0,05$).

A taxa de recuperação de conceptos após a 1ª inseminação de vacas que foram lavadas (65,8%; Tabela 2) não diferiu ($P > 0,05$) da taxa de concepção de vacas não-lavadas ($24/31 = 77,4\%$). Assim, a sonda de maior calibre testada no Experimento 1 permitiu a coleta de conceptos e o procedimento foi validado no Experimento 2, pois os resultados das coletas podem ser considerados fidedignos, já que as taxas de concepção das vacas lavadas e das não-lavadas não diferiram. Analogamente, a taxa de concepção à 1ª inseminação (69,5%) não diferiu ($P > 0,05$) da taxa de recuperação de conceptos após a 1ª lavagem (65,8%) e a taxa de concepção à 2ª inseminação (46,7%) não diferiu ($P > 0,05$) da recuperação de conceptos observada após a 2ª lavagem (59,1%). Estes achados contrapõem-se às conclusões de Arnold (ARNOLD, D. R., McGill University Health Centre, Montreal, 2007 – comunicação pessoal), que tinha verificado taxa de recuperação de 30% a 40% de conceptos filamentosos e completamente íntegros. Entretanto, ele trabalhou com vacas portadoras de múltiplos produtos obtidos após superovulação ou involução de muitos embriões. No presente estudo havia um só concepto por vaca, fruto de concepção por inseminação artificial após ovulação simples subsequente ao estro natural. Diferentemente do protocolo aqui apresentado, pela técnica de Arnold et al. (2006) obtém-se o líquido de lavagem em um béquer, recipiente no qual se permite a decantação dos conceptos, dispensando o uso do filtro para evitar o excesso de muco.

O relato de Arnold et al. (2006) sobre coleta de conceptos envelados e as vezes rompidos foi confirmado neste trabalho. De fato, alguns produtos obtidos estavam bastante fragmentados. Resta diferenciar se tal fragmentação foi causada mecanicamente pelo processo de lavagem ou se foi devida a alguma alteração do concepto com significado fisiológico, a exemplo de degeneração em progresso. Há um experimento em andamento na Embrapa Pecuária Sudeste cujo objetivo é elucidar esta dúvida.

As taxas de concepção cumulativas (1ª + 2ª inseminação e 1ª + 2ª lavagem) também não diferiram ($P > 0,05$). Estes resultados permitem constatar que o procedimento de lavagem não teve efeitos residuais prejudiciais sobre a fertilidade das vacas. De fato, ao se comparar a taxa de concepção mais elevada, auferida como resultado da 1ª inseminação (69,5%; Tabela 1) verifica-se que ela não diferiu ($P > 0,05$) daquela obtida nas vacas lavadas duas vezes (59,1%; Tabela 2). Além disso, o intervalo entre a lavagem e o próximo estro foi, em média, de $12,05 \pm 2,43$ dias ($n = 69$). Este intervalo não diferiu ($P > 0,05$) nas vacas que se tornaram prenhes no ciclo subsequente à lavagem ($12,94 \pm 2,18$ dias; $n = 36$) e naquelas que não se tornaram prenhes nesse ciclo ($12,54 \pm 2,24$ dias; $n = 28$).

Não é usual a coleta de embriões com mais de oito dias de idade, pois o objetivo da indústria da transferência de embriões é obter estruturas transferíveis para vacas receptoras. Assim, as tentativas de coleta de estruturas mais velhas estão limitadas a interesses acadêmicos e científicos. A equipe de Reprodução Animal da Embrapa Pecuária Sudeste vem desenvolvendo estudos sobre mortalidade embrionária precoce e estratégias para a sua redução. Nesse contexto, foi necessário desenhar um experimento capaz de permitir o monitoramento da mortalidade embrionária, a fim de se determinar os períodos, as frequências e as possíveis causas das perdas de prenhez (MACHADO et al., 2007). Para tanto, seriam necessárias ferramentas como a coleta de embriões no dia 7 ou no dia 8, a obtenção de conceptos no dia 18, a ultra-sonografia diagnóstica no dia 28 e no dia 42, e a palpação retal entre o 2º e o 9º mês de prenhez. Neste momento, verificou-se a carência de informações sobre a obtenção de conceptos. A idéia inicial previu a execução de um procedimento análogo ao de uma cesariana, isto é, o método cirúrgico. Embora de interesse e com aplicações na coleta de lavados para estudos moleculares e microbiológicos (LIMA, 2006), os achados do Experimento 1 contra-indicavam tal abordagem, se a saúde reprodutiva imediata da vaca devesse ser preservada. A coleta transcervical, similar à realizada no dia 7 ou no dia 8 em vacas superovuladas era inicialmente temerária, pois é sugerido um intervalo entre coletas de 45 dias para doadoras (ARMSTRONG, 1993) e havia relatos de baixa taxa de recuperação de embriões (ARNOLD, D. R., McGill University Health Centre, Montreal, 2007 – comunicação pessoal). Entretanto, com a disponibilidade de sondas de três vias com calibre maior (24 G) do que as rotineiramente usadas em vacas doadoras (18 G), o risco foi assumido. Os resultados da coleta transcervical obtidos no Experimento 1 foram promissores e então validou-se a técnica no Experimento 2. De fato, os temores iniciais foram eliminados, pois no caso de Arnold et al. (2006) o complicador da coleta foi a quantidade de conceptos, o que provavelmente favoreceu o envelhecimento e as tensões exageradas entre diferentes conceptos, o que pode causar ruptura das estruturas e entupimento da sonda de Foley e dificultar ou prevenir a recuperação do(s) embrião(ões). No nosso caso, com apenas um concepto presente, esta dificuldade foi minimizada. Além disso e contrariamente às doadoras dos programas de transferência de embriões, as vacas não foram submetidas a qualquer tratamento hormonal prévio às coletas, de modo que a atividade reprodutiva pôde ser restaurada rapidamente. Com efeito, o retorno ao estro deu-se aproximadamente 12 dias depois da lavagem, independentemente de a vaca estar prenhe ou não.

É interessante destacar que no ciclo subsequente à lavagem a taxa de prenhez foi de 56,2% (36/64), valor não diferente da taxa de prenhez à 2ª inseminação de vacas não-lavadas. Portanto, a lavagem não causou transtornos reprodutivos imediatos nas vacas submetidas a esse procedimento. Achados similares haviam sido encontrados em doadoras de embrião com períodos de repouso de 21 até 75 dias (ARMSTRONG, 1993; ELSDEN et al., 1980).

Conclusões

A dificuldade de acesso e a relativa demora em seu pleno restabelecimento reprodutivo são fatores limitantes do método cirúrgico para a coleta de conceptos com 18 dias de idade em vacas da raça Nelore.

O método transcervical, com uso de sonda de Foley de grosso calibre (24 G), deve ser a técnica de eleição para coletas em escala de conceptos com 18 dias, pois assegura a sua obtenção e não altera o desempenho reprodutivo imediato das vacas da raça Nelore.

São requeridos estudos adicionais sobre a viabilidade dos conceptos de 18 dias coletados pelo método transcervical.

Referências

- ARMSTRONG, D. T. Recent advances in superovulatory treatments of cattle. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 7-24, 1993
- ARNOLD, D.; BORDGNON, V.; LEFEBVRE, R.; MURPHY, B. D.; SMITH, L. C. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 279-290, 2006.
- AYALON, N. A review of embryonic mortality in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 54, p. 483-93, 1978.
- BANU, S. K.; AROSH, J. A.; CHAPDELAINE, P.; FORTIER, M. Expression and regulation of prostaglandin transporter in corpus luteum and utero-ovarian plexus during the bovine estrous cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 68 (suppl. 1), p. 175-176, 2003.
- BERGAMASCHI, M. A. C. M. **Estratégias hormonais para otimizar a função luteínica da vacas da raça Nelore após a sincronização do estro**. 2005. 111 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- BINELLI, M.; THATCHER, W. W. Conceptus stimulated signal transduction pathway in the endometrium to maintain pregnancy. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 59-85, 1999.
- BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1451-1463, 2001.
- CARAVIELLO, D. Z.; WEIGEL, K. A.; CRAVEN, M.; GIANOLA, D.; COOK, N. B.; NORDLUND, K. V.; FRICKE, P. M.; WILTBANK, M. C. Analysis of reproductive performance of lactating cows on large dairy farms using machine learning algorithms. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 12, p. 4703-4722, 2006.

CARTMILL, J. A.; EL-ZARKOUNY, S. Z.; HENSLEY, B. A.; ROZELL, T. G.; SMITH, J. F.; STEVENSON, J. S. An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperatures before or after calving or both. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 4, p. 799-806, 2001.

CAVESTANY, D. A.; MEIKLE, A.; KINDAHL, H.; VAN LIER, E.; MOREIRA, F.; THATCHER, W. W.; FORSBERG, M. Use of medroxy-progesterone acetate (MAP) in lactating Holstein cows within a Ovsynch protocol: follicular growth and hormonal patterns. **Theriogenology**, v. 59, n. 8, p. 1787-1798, 2003.

CHRISTIANSON, W. T. Stillbirths, mummies, abortions and early embryonic death. **Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice**, v. 8, n. 3, p. 623-639, 1992.

CUTAIA, L.; VENERANDA, G; TRIBULO, R.; BARUSELLI, P. S.; BÓ, G. A. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de cría: factores que lo afectan y resultados productivos. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 5., 2003, Córdoba, Argentina. **Proceedings...** Córdoba: INTA, 2003. p. 119-132.

DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, n. 2, p. 463-468, 1980.

ELSDEN, R. P.; NELSON, L. D.; SEIDEL JUNIOR, G. E. Superovulating cows with FSH and PMSG. **Theriogenology**, v. 13, n. 3, p. 455-463, 1980.

LIMA de, M. C. **Desenvolvimento de uma técnica cirúrgica para o monitoramento do microambiente uterino de bovinos**. 2006. 153 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YÁÑIZ, J.; RUTLLANT, J.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Factors affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. **Animal Reproduction Science**, v. 57, n. 2, p. 1251-1261, 2002.

MACHADO, R.; GENOVEZ, M. E.; OKUDA, L. H.; BERGAMASCHI, M. A. C. M.; BARBOSA, R. T.; PAULIN, L. M. S; CASTRO, V.; PITUCO, E. M. Relação entre perdas embrionárias precoces e a condição sorológica para enfermidades infecciosas da reprodução em bovino de corte. **O Biológico**, v. 69, n. 2, p. 124, 2007.

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

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

NEUMANN, A. L.; LUSBY, K. S. The commercial cow-calf program . In: _____. **Beef cattle**. 8. ed. New York: John Wiley & Sons, 1986. p. 1-14.

PEREIRA, J. C. C. Melhoramento genético das raças zebus. In: _____, **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: FEP-MVZ Editora, 1999. p. 198-251.

PETERS, A. R.; DREW, S. B.; MANN, G. E; LAMMING, G. E.; BECK, N. F. Experimental and practical approaches to the establishment and maintainance of pregnancy. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 43 (Suppl. 1), n. 4, p. 143-152. 1992.

RANDLE, R. F. Production medicine considerations for enhanced reproductive performance in beef herds. In: BRAUN JR., W. F.; YOUNGQUIST, R. S. **Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice** , Philadelphia, v. 2, p. 405-417, 1993.

REICHENBACH, H.; OLIVEIRA, M. A. L. O.; LIMA, P. F.; SANTOS FILHO, A. S.; ANDRADE, J. C. O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varella, 2001. p. 127-178.

ROCHA, J. L. **Sincronização hormonal da onda folicular e do estro em novilhas de corte mestiças monitoradas por radiotelemetria**. 2000. 125 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C.; CERRI, R. L. A.; GALVÃO, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83 (special issue), p. 513-535, 2004.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide, Version 6. 4. ed. Cary: SAS Institute, 2000. v. 2, p. 891-1686.

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

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1435-1450, 2001.

VANROOSE, G.; deKRUIF, A.; VanSOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, n. 1, p. 131-143, 2000.

Agradecimentos

Ao professor Méd. Vet., M. Sc. Marcelo Cardoso de Lima e à graduanda Denise F. R. de Oliveira, ambos do curso de Medicina Veterinária da Universidade Anhembí-Morumbi, de São Paulo, SP.

Apoio financeiro

Embrapa;

Fapesp (processo 2006/55199-2).