



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DO EFEITO DA APLICAÇÃO INTRAUTERINA DE OZONO SOBRE A TAXA DE
GESTAÇÃO, APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL, EM VACAS REPETIDORAS DE RAÇA
FRÍZIA HOLSTEIN

NÉLIA FIALHO VALENTE DA LUZ

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

ORIENTADOR

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

2013

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DO EFEITO DA APLICAÇÃO INTRAUTERINA DE OZONO SOBRE A TAXA DE
GESTAÇÃO, APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL, EM VACAS REPETIDORAS DE RAÇA
FRÍZIA HOLSTEIN

NÉLIA FIALHO VALENTE DA LUZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

COSNTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

ORIENTADOR

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

2013

LISBOA

Aos meus pais...

AGRADECIMENTOS

Desde já queria agradecer ao meu orientador, Doutor João Nestor das Chagas e Silva, por todos os ensinamentos, por toda a disponibilidade, pelos momentos de trabalho e de convívio e pela amizade, acima de tudo. Muito obrigada!

À Professora Doutora Isabel Neto Fonseca por me ter auxiliado no tratamento dos dados e análise estatística dos mesmos.

Aos outros bons professores da Faculdade de Medicina Veterinária que me ensinaram esta magnífica profissão.

À empresa R. Amorim & Companhia, Lda, que possibilitou a realização do ensaio experimental, ao oferecer as palhinhas Ripromed®.

À Sociedade Agropecuária José Ribeiro Chula & Filho, em especial ao Sr. José Alberto, agradeço a oportunidade de estágio e de realização do ensaio clínico, assim como, pela transmissão dos seus conhecimentos. Um agradecimento especial também, ao Sr. Pedro, pela sua simpatia e a sua disponibilidade.

Aos meus pais, que sempre lutaram para me fornecer as melhores condições na realização dos meus sonhos. Para eles, que são o meu exemplo, que me ensinaram a ultrapassar todas as dificuldades, sempre com dignidade, pelo seu consolo nos momentos difíceis, pela sua segurança e pelo seu amor.

Ao meu irmão, o meu melhor amigo.

Ao Gonçalo e à Marlene, os meus companheiros nas aventuras do estágio, pelo apoio, pela amizade, pelos momentos de alegria durante estes últimos meses.

Aos meus amigos (Anita, Inês, Hermanita, Diogo, Fili, Letícia, Zé e João) por estarem sempre presentes nestes 6 anos. Serão sempre a minha segunda família. Vocês são os maiores!

A todos os meus outros colegas de curso, que foram parte essencial desta minha vida académica.

ESTUDO DO EFEITO DA APLICAÇÃO INTRAUTERINA DE OZONO SOBRE A TAXA DE GESTAÇÃO, APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL, EM VACAS REPETIDORAS DE RAÇA FRÍSIA HOLSTEIN

RESUMO

Nos bovinos, a saúde uterina no pós-parto encontra-se facilmente comprometida. O ambiente uterino, durante o puerpério, é um dos principais factores que influencia a fertilidade das vacas e, desta forma, qualquer alteração da saúde uterina pode induzir a síndrome da vaca repetidora. Esta definição compreende um grupo heterogéneo de vacas subférteis, sem anomalias anatómicas ou infecciosas, que exibem uma variedade de desequilíbrios reprodutivos, num padrão constante, durante três ou mais ciclos éstricos consecutivos, de duração normal (17-25 dias).

O objectivo principal deste trabalho experimental foi o de avaliar o efeito da aplicação intrauterina de ozono (Ripromed® palhinhas; Novagen, Itália), 10 horas antes da IA, sobre alguns índices reprodutivos de vacas repetidoras de raça Frísia Holstein. Foram utilizados dois grupos de vacas repetidoras: um dos grupos foi sujeito a tratamento (n=23) e o outro serviu de grupo controlo (n=31), não tendo sido tratado.

Foram avaliadas nos dois grupos a taxa de gestação à 1ª IA do ensaio e da 2ª IA do ensaio. Também foi avaliada a incidência de afecções no pós-parto das vacas de ambos os grupos e a taxa de gestação à 1ª IA do ensaio, tendo em conta essas afecções. Após a análise estatística dos resultados, verificou-se não haver diferenças significativas ($p>0,05$) entre os dois grupos, muito possivelmente devido ao reduzido número da amostra (n=54). Ainda assim, no que diz respeito à taxa de gestação à 1ª IA do ensaio, verificou-se que os resultados foram numericamente superiores para o grupo dos animais tratados, relativamente ao dos não tratados (43% vs. 26%, $p>0,05$). Relativamente ao número de animais gestantes após a 2ª IA do ensaio (animais que fizeram retorno ao cio – 40%) registaram-se resultados menos favoráveis nas vacas tratadas (0% vs. 37%, $p>0,05$). No entanto, pouco se pôde concluir acerca deste resultado, dada a pequenez da amostra. Observou-se, da mesma forma, que a retenção placentária (46,6%) e a endometrite clínica (53,3%) foram as afecções de maior incidência em ambos os grupos e que, os resultados do tratamento foram favoráveis tanto para as vacas que apresentaram patologia no puerpério (45% vs. 37%, $p>0,05$), como para as que tiveram um pós-parto aparentemente normal (42% vs. 8%, $p>0,05$).

Deste modo, e como pouco se poderá efectivamente concluir, com base no tratamento estatístico acerca dos efeitos desta terapêutica sobre os índices reprodutivos analisados, outros estudos prospectivos deverão ser realizados.

Palavras-chave: Pós-parto, Vaca repetidora, Tratamento intrauterino, Ozono.

STUDY OF THE EFFECT OF INTRAUTERINE OZONE TREATMENT ON REPEAT-BREEDERS HOLSTEIN-FRIESIAN COWS PREGNANCY RATE AFTER ARTIFICIAL INSEMINATION

ABSTRACT

In cattle, postpartum uterine health is easily compromised. The uterine environment during the puerperium influences cows' fertility and its perturbation can induce the repeat-breeder syndrome. The repeat-breeders cows are an heterogeneous group of subfertile cows without anatomical abnormalities or infectious diseases. Those females exhibit reproductive imbalances in a constant pattern, for three or more consecutive estrous cycles (17-25 days). The main objective of this study was to evaluate the effect of intrauterine ozone treatment (Ripromed® straws; Novagen, Italy), given 10 hours before the AI on a few reproductive parameters of repeat-breeders Holstein-Friesian dairy cows. The study was conducted on two different groups: treatment group (n = 23) and control group (n = 31).

It was evaluated in both groups: the pregnancy rate (1st and 2nd AI), the incidence of postpartum diseases and the pregnancy rate, taking into account those diseases. After statistical analysis, it was found no significant differences ($p>0.05$) between the two groups, most likely due to the small sample size (n = 54). Still, with regard to the pregnancy rate at 1st AI, the results were numerically higher for the treated group compared to the untreated one (43% vs 26%, $p>0.05$). Regarding the number of pregnant animals after the 2nd AI (animals that return to oestrus - 40%) it was found lower results in treated group (0 % vs 37 %, $p>0.05$). It was observed that retained placenta (46.6%) and clinical endometritis (53.3%) had higher incidence in both groups and the treatment results were favorable for the cows that had postpartum diseases (45% vs 37%, $p>0.05$) and for those that had an apparently normal postpartum (42% vs 8%, $p>0.05$).

Therefore, based on the statistical treatment, it was not possible to conclude much. Other prospective studies should be conducted.

Keywords: Postpartum, Repeat-breeders cows, Intrauterine treatment, Ozone.

ÍNDICE GERAL

Resumo	ii
Abstract	iii
Índice geral	iv
Índice de figuras	vi
Índice de tabelas.....	vii
Índice de gráficos.....	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
I. Objectivos	1
II. Relatório de actividades desenvolvidas durante o estágio	2
III. Revisão bibliográfica	5
1. Período pós-parto	6
1.1. Nota Introdutória	6
1.2. Involução Uterina	6
1.3. Regeneração do endométrio.....	8
1.4. Reinício da actividade ovárica	8
1.5. Eliminação da contaminação bacteriana.....	10
2. Patologias do aparelho reprodutor associadas ao pós-parto.....	13
2.1. Urovagina e Pneumovagina.....	13
2.2. Vaginite.....	14
2.3. Retenção placentária	14
2.4. Infecções uterinas.....	16
2.4.1. Metrite	18
2.4.2. Endometrite clínica	20
2.4.2.1. Definição e incidência da endometrite clínica	20
2.4.2.2. Fisiopatologia	20
2.4.2.3. Impacto da endometrite clínica	21
2.4.2.4. Técnicas de diagnóstico	21
2.4.2.5. Tratamento	23
2.4.3. Endometrite subclínica	24
2.4.3.1. Definição e incidência da endometrite subclínica.....	24
2.4.3.2. Fisiopatologia	24
2.4.3.3. Impacto da endometrite subclínica	25
2.4.3.4. Técnicas de diagnóstico	26
2.4.3.5. Tratamento	35
2.4.4. Piómetra	36
3. Síndrome da vaca repetidora	38
3.1. Importância da vaca repetidora na produção leiteira.....	38
3.2. Etiologia da síndrome da vaca repetidora	39
3.2.1. Factores maternos.....	39

3.2.1.1. Idade	39
3.2.1.2. Factores genéticos	40
3.2.1.3. Infecções uterinas	40
3.2.1.4. Defeitos anatómicos do aparelho reprodutor	40
3.2.1.5. Disfunções hormonais	41
3.2.1.6. Morte embrionária precoce (MEP)	41
3.2.1.7. Nutrição	42
3.2.2. Factores relacionados com o touro e qualidade do sémen	43
3.2.3. Ambiente e factores relacionados com o manejo	44
3.2.3.1. Detecção correcta do cio	44
3.2.3.2. Higiene durante a inseminação artificial	44
3.2.3.3. <i>Stress</i>	44
3.3. Técnicas de diagnóstico	45
3.4. Tratamento e controlo da síndrome da vaca repetidora de forma a reduzir o impacto negativo na exploração	46
3.4.1. Tratamento nutricional	46
3.4.2. Técnicas de reprodução assistida	46
3.4.3. Tratamentos intrauterinos	47
3.4.4. Tratamentos hormonais	47
3.4.4.1. Progesterona	47
3.4.4.2. GnRH	47
3.4.4.3. Gonadotrofinas exógenas	48
3.4.4.4. Prostaglandina F _{2α}	48
3.4.4.5. Maneio reprodutivo	48
IV. Trabalho experimental	50
1. Introdução	51
2. Desenho experimental	53
3. Material e métodos	54
3.1. Caracterização da exploração	54
3.2. Maneio reprodutivo	54
3.3. Animais do ensaio experimental	55
3.4. Tratamento	57
3.5. Registo de dados e análise estatística	58
4. Resultados	59
5. Discussão	63
6. Conclusão	67
V. Bibliografia	68
VI. Anexos	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Involução uterina durante o puerpério. Adaptado de Noakes et al. (2001a)	7
Figura 2. Diferentes aspectos do corrimento cérvico-vaginal. O aspecto e o odor do corrimento podem indicar o grau de infecção uterina. Retirado de Marques Júnior et al. (2011)	16
Figura 3. Esquema de pontuação da endometrite clínica. Retirado de Sheldon et al. (2006)	22
Figura 4. Observação microscópica de citologia do conteúdo uterino recolhido por lavagem uterina. Retirado de Sheldon et al. (2006).....	29
Figura 5. Aspecto das células encontradas na citologia endometrial. Retirado de Meira Júnior (2010).....	30
Figura 6. Secção histológica de biópsia do endométrio. Retirado de Sheldon et al. (2006)..	32
Figura 7. Observação de detalhe histológico de útero de bovino. Retirado de Meira Júnior (2010)	33
Figura 8. Evolução da curva de lactação em vacas normais e repetidoras. Notar que as vacas repetidoras têm menos partos e, desta forma, a produção de leite é menor. Adaptado de Perez-Marin et al. (2012).	39
Figura 9. Consequências do stress hipertérmico. Retirado de Departamento técnico-comercial Vitas Portugal (2013)	45
Figura 10. Protocolo OVSYNCH. Adaptado de Pursley et al. (1995).....	48
Figura 11. Processo de produção de ozono. Adaptado de apresentação ppt "Bio Ozotech" (2009).	51
Figura 12. Três apresentações clínicas de ozono intrauterino. Retirado de Novagen website (2013)	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Casuística das actividades desenvolvidas durante o estágio.	3
Tabela 2. Mecanismos de defesa do útero. Adaptado de Sheldon et al. (2008a).....	11
Tabela 3. Critério de diagnóstico da endometrite subclínica baseado no exame histopatológico. Adaptado de Meira Jr. et al. (2012).	34
Tabela 4. Práticas de manejo para reduzir os riscos de doença uterina no pós-parto. Adaptado de LeBlanc et al. (2011).	36
Tabela 5. Análise descritiva da amostra relativamente à idade.	55
Tabela 6. Distribuição da amostra relativamente ao número de lactações.....	56
Tabela 7. Distribuição da amostra relativamente às afecções no pós-parto.....	57
Tabela 8. Apresentação do número médio (χ) e desvio padrão (σ) do Intervalo parto- 1ª IA (dias), número de dias em leite e da produção de leite à IA do ensaio (L/dia) nos dois grupos de vacas.	59
Tabela 9. Resultados dos diagnósticos de gestação.....	61
Tabela 10. Resultado do diagnóstico de gestação à 2ª IA.	61
Tabela 11. Resultados do diagnóstico de gestação, realizado aos 28-32 dias após a IA por exame ecográfico, em vacas que apresentaram doença pós-parto e nas que tiveram um pós-parto normal, tratadas e não tratadas.	62
Tabela 12. Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados (ponto 4. do trabalho experimental).	76

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Representação gráfica da distribuição, em percentagem, da amostra relativamente ao número de lactações.....	56
Gráfico 2. Representação gráfica da distribuição das diferentes afecções pós-parto do grupo “Doença no pp”	57
Gráfico 3. Número de retornos ao cio ao longo do ensaio clínico.....	60
Gráfico 4. Representação gráfica dos resultados do diagnóstico de gestação em vacas que apresentaram doença pós-parto e um pós-parto normal, tratadas e não tratadas	62

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau(s) Celsius
€	Euro(s)
µm	Micrómetro(s)
%	Porcentagem
®	Marca registrada
BEN	Balanço energético negativo
BHV-1	Herpesvirus bovino 1
CC	Condição corporal
cc	Centímetro(s) cúbico(s)
CL	Corpo(s) lúteo(s)
CLRs	Receptores <i>C-type lectin</i>
cm	Centímetro(s)
CMI	Concentração mínima inibitória
DEL	Dias em leite
DG	Diagnóstico de gestação
EL	Esterase leucocitária
FMV	Faculdade de Medicina Veterinária
FSH	Hormona folículo-estimulante
GnRH	Gonadoliberina
h	Hora(s)
ha	Hectare (s)
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial a tempo fixo
IFN-tau	Interferão tau
Ig	Imunoglobulina(s)
IGF-1	Factor de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	Interleucina
IPP	Intervalo entre partos
Kg	Quilograma(s)
L	Litro(s)
LH	Hormona luteinizante
MEP	Morte embrionária precoce
mg	Miligramma(s)
MHz	Megahertz
mL	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
mMol	milimole(s)
NEFA	Ácidos gordos não esterificados
NLRs	Receptores <i>nucleotide oligomerization domain (NOD)-like</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGFM	13,14-dihydro-15-keto-PGF _{2α}
PMN's	Neutrófilos polimorfonucleares
PP	Pós-parto
PRID	Dispositivo intravaginal com progesterona
PTR	Palpação transrectal
RLRs	Receptores <i>retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like</i>
RP	Retenção placentária
TE	Transferência de embriões
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF-α	Factor de necrose tumoral
UI	Unidades internacionais

I. OBJECTIVOS

O principal objectivo da indústria leiteira é o de fornecer leite ao mercado consumidor. Nas últimas décadas, a produção de leite por vaca tem aumentado significativamente. Contudo, um impacto negativo deste melhoramento tem sido a redução da fertilidade (por exemplo, mais dias em aberto e mais serviços por concepção) em virtude do aumento da incidência de problemas reprodutivos (Gröhn & Rajala-Schultz, 2000).

De forma a diminuir a utilização de antibióticos nestes casos, têm sido abordados novos tratamentos uterinos, como é o caso da ozonoterapia. O ozono inactiva bactérias, vírus, fungos, algas e protozoários, agentes estes que podem causar endometrites clínicas ou subclínicas, que afectam negativamente a fertilidade (Loste, Zabala & Mendizabal, 2011). Este tratamento intrauterino, em comparação com tratamentos antibacterianos, tem como vantagens não causarem resistências bacterianas, nem produzir resíduos no leite e/ou carne (Djuricic et al., 2012a)

Tendo em conta esta situação, decidiu-se por uma dissertação de mestrado com os seguintes objectivos:

- Avaliar as variáveis Parto-1ª IA, Dias em leite até à IA do ensaio e produção de leite no dia da IA do ensaio e a sua relação com a fertilidade nos grupos Controlo X Grupo Tratamento;
- Avaliar a fertilidade após a IA com tratamento intrauterino de ozono: grupo Controlo X grupo Tratamento;
- Avaliar a fertilidade após a IA ao retorno do cio: grupo Controlo X grupo Tratamento;
- E, por fim, avaliar a fertilidade do grupo PP normal X grupo Doença no PP, em relação aos animais tratados com ozono e os não tratados.

II. RELATÓRIO DE ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

O estágio curricular, inserido no Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade de Lisboa, consistiu em duas partes complementares, ambas sob a orientação do Doutor João Nestor das Chagas e Silva.

A primeira teve início em Setembro de 2012 e prolongou-se até Julho de 2013, durante a qual foi possível a autora acompanhar a actividade profissional do orientador, tanto no âmbito escolar, como na prática privada. Durante este período a autora assistiu a visitas de controlo reprodutivo onde desenvolveu capacidades na técnica de palpação transrectal (PTR). Seguiu vários programas de superovulação, recolha e transferência de embriões (TE) em bovinos de leite, na área geográfica de Aveiro e da Moita do Ribatejo, assim como em bovinos de carne, de raça Salers na área geográfica de Alcochete. Foi então possível adquirir conhecimentos sobre a técnica de recolha dos embriões, da sua pesquisa e caracterização à lupa, assim como sobre a técnica de congelação e de transferência de embriões. A autora teve ainda oportunidade de assistir e auxiliar em exames andrológicos, tanto em touros de leite (Frísia Holstein), como de carne (Limousine, Charolesa e Blonde d'Aquitaine) e no processo de colheita e congelação de sémen. Estes trabalhos foram desenvolvidos na área geográfica de Alcochete, Milfontes e Montemor-o-Novo. Ao longo deste período, o orientador deu formação na área da ecografia reprodutiva bovina e a autora também teve oportunidade de participar num *workshop* nesta área, organizado pela FMV nas instalações da ex-Estação Zootécnica Nacional (Fonte Boa). Também acompanhou um Curso de Inseminação Artificial (IA) em Bovinos para técnicos, organizado pela FMV, a partir do qual pôde desenvolver e aplicar a técnica.

A segunda parte do estágio curricular desenvolveu-se na Sociedade Agropecuária José Ribeiro Chula & Filho, a tempo inteiro. Este período decorreu de 17 de Setembro de 2012 a 28 de Março de 2013 e foi uma mais-valia na aquisição de conhecimentos práticos referentes ao maneio, reprodução e clínica de bovinos de leite, assim como para a recolha de informação para a dissertação. Aí, a autora teve a oportunidade de acompanhar a rotina e o funcionamento de uma exploração de leite. As actividades principais que lhe atribuíram foram:

- Assistência aos partos;
- Administração de colostro a vitelos recém-nascidos por entubação esofágica;
- Monitorização e tratamento das vacas nos primeiros dias pós-parto (registo de temperatura rectal, avaliação da recuperação do animal e diagnóstico de doença pós-parto, avaliação do leite aos primeiros jactos e diagnóstico de mastite, administração e registo dos tratamentos);
- Vacinação dos vitelos e tratamento de diarreias neonatais;
- Auxiliar a descorna de vitelos;

- Auxiliar o Dr. Carsten Dammert nas visitas de avaliação reprodutiva (administrações intramusculares e colocação de dispositivos intravaginais de progesterona) e nos casos clínicos da exploração;
- Detecção de cios, IA e tratamentos intrauterinos de endometrites.
- Auxiliar no tratamento de doenças podais, incluindo corte funcional de unhas;
- Colaboração na rotina de ordenha;
- Secagem das vacas;
- Vacinações.

Durante este estágio foi possível acompanhar, igualmente, as visitas da Dra. Ema, responsável pela qualidade do leite e do Prof. Dr. Saraiva Lima aquando da realização da necrópsia de um vitelo. No âmbito do estudo realizado, que deu origem à dissertação, a autora realizou ecografias a todos os animais que nele participaram, para diagnóstico de gestação (DG), entre os 28 e os 32 dias pós-IA.

Tabela 1. Casuística das actividades desenvolvidas durante o estágio.

Área de intervenção	Actividades desenvolvidas	Nº de casos
Reprodução Bovina	Exame ginecológico	PTR 800
		Ecografia 80
	DG	PTR 30
		Ecografia 80
Patologias Reprodutivas	Quistos ováricos	PTR 15
	Útero unicórnio	PTR 1
	Piómetra	PTR 10
		Ecografia 3
	Endometrite	PTR 40
	Colocação de dispositivos intravaginais de progesterona (P ₄)	30
	Colocação de comprimidos intrauterinos de terramicina	30
	Tratamento AB intrauterino	10
	IA (DGs positivos)	20 (9)
	Lavagem uterina para TE	7 ¹
	TE	40 ¹
	Exame andrológico	10
	Congelação de sémen	1
	Distócias	10
	Retenção placentária	30
	Torção uterina	1

Tabela 1 (continuação). Casuística das actividades desenvolvidas durante o estágio.

Área de intervenção	Actividades desenvolvidas	Nº de casos	
Cirurgia	Deslocamento do abomaso	1 ¹	
	Cesariana	3 ¹	
	Resolução de hérnia umbilical	1	
Clínica	Hipocalcémia	8	
	Indigestão	1	
	Patologia Podal	Úlcera da sola	20
		Panarício	5
	Mastites clínicas	30	
	Diarreia (vitelos/vacas)	50	
	Necrópsia (vitelo)	1 ¹	
	Recolha de amostras de leite	20	
	Recolha de amostras de sangue	10	

¹Observei o procedimento

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.PERÍODO PÓS-PARTO

1.1. Nota Introdutória

O período pós-parto (pp) é a fase em que o aparelho reprodutivo recupera após o parto e retorna ao seu estado normal, pronto para uma nova gestação (Sheldon, Barret & Boyd, 2008a).

Por norma, vacas com condição corporal (CC) entre 3,5 e 4,0 ao parto e que não sofreram distócia, parto gemelar, parto de nados mortos ou retenção placentária, têm um período pós-parto normal, cio detectável mais precocemente e mais ciclos éstricos (Draper & Wheal, 1989) durante o período voluntário de espera (40 a 60 dias após o parto; Sheldon et al., 2008a). Estas vacas também têm produções leiteiras mais elevadas, melhor saúde do úbere e menos inseminações artificiais (IA) por concepção (Draper & Wheal, 1989).

Existem quatro áreas principais de actividade fisiológica no puerpério: o sistema genital tubular (especialmente, o útero) atrofia, em oposição à hipertrofia que ocorre durante a gestação; a estrutura do endométrio é restaurada; a contaminação bacteriana do lúmen uterino é eliminada e há um restabelecimento da função ovárica (Noakes, Parkinson & England, 2001a).

Desta forma, qualquer transtorno que prolongue a duração do puerpério, pode afectar a performance reprodutiva futura da vaca (Noakes et al., 2001a).

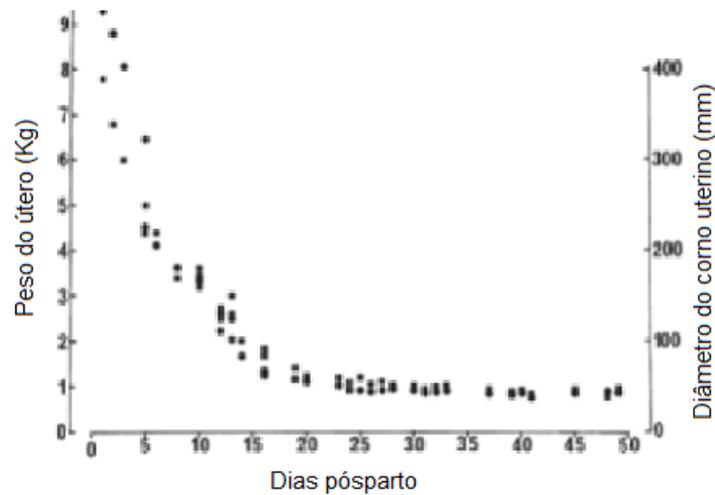
1.2. Involução Uterina

A involução uterina representa o retorno do aparelho reprodutor, após o parto, à sua condição pré-gravídica. Este processo ocorre a nível macro e microscópico e a nível funcional (Noakes et al., 2001a) e envolve diminuição do tamanho, necrose e desprendimento das carúnculas e, regeneração do endométrio (Sheldon, Williams, Miller, Nash & Herath, 2008b).

Com a necrose das carúnculas uterinas, estas são expulsas, o que contribui significativamente para a rápida redução do peso do útero, que passa de 13 quilogramas (Kg) para 1Kg, em 3 semanas (Sheldon et al., 2008b).

De acordo com Noakes et al. (2001a), o diâmetro do corno uterino anteriormente gravídico diminui para metade em cinco dias e, o seu comprimento, em quinze. Como se pode verificar na Figura 1, a involução uterina acontece numa escala logarítmica decrescente, com maior alteração nos primeiros dias após o parto. A velocidade de involução do corno não gravídico é mais variável, pois depende do grau de envolvimento da placentação (Noakes et al., 2001a).

Figura 1. Involução uterina durante o puerpério. Adaptado de Noakes et al. (2001a)



No decurso de uma involução uterina saudável, todo o aparelho reprodutor é palpável por exame transrectal aos 10-14 dias após o parto, embora o corno uterino anteriormente grávidico apresente um comprimento e diâmetro maiores do que o corno uterino contralateral (Sheldon et al., 2008a). O cérvix também sofre atrofia e diminui de tamanho devido à redução do colagénio e do músculo liso. Este processo é, no entanto, mais lento que a do corpo e cornos uterinos, provavelmente dado ao seu elevado conteúdo em colagénio (Noakes et al., 2001a).

Idealmente, o útero deve involuir totalmente no período pós-parto imediato. O diâmetro dos cornos uterinos deve atingir os 3-5 centímetros (cm) por volta dos 30 dias, enquanto o diâmetro do cérvix deve ser inferior a 5 cm, aos 40 dias (Draper & Wheal, 1989; Meira Jr., Henriques, Sá & Gregory, 2012).

As prostaglandinas (PG) podem ter um papel importante no controlo da involução uterina. Parece que existe uma correlação positiva entre a duração da involução uterina e a amplitude e duração da síntese de $PGF_{2\alpha}$ (Kindahl, Odensvik, Aiumlmai & Fredriksson, 1992) e consequentemente, da concentração do metabolito da $PGF_{2\alpha}$, PGFM (13,14-dihydro-15-keto- $PGF_{2\alpha}$; Meira et al., 2012). A síntese e o metabolismo da $PGF_{2\alpha}$ aumentam no útero da vaca no início do período pós-parto e, nessa altura, isso é demonstrado pela presença do seu metabolito, PGFM, no sangue. Há evidência crescente de que a função ovárica não se restabelece até que a concentração desse metabolito atinja valores basais. Está documentado que os valores de PGFM estão aumentados em animais com endometrite grave em relação a animais com endometrite ligeira (Mateus, Costa, Diniz & Ziecik, 2003) e que, quando há infecção uterina, as concentrações de PGFM estão elevadas, em relação a fêmeas saudáveis (Del Vecchio, Matsas, Fortin, Sponenberg & Lewis, 1994), sugerindo que o grau da infecção/inflamação influencia a secreção de $PGF_{2\alpha}$ e que, quando isto acontece, observa-se um atraso na involução do útero.

1.3. Regeneração do endométrio

A regeneração do epitélio do endométrio inicia-se imediatamente depois do parto, nas áreas menos lesadas. Após a expulsão da placenta, ocorre necrose da superfície das carúnculas uterinas, que se desprendem, geralmente, até 12 dias após o parto (Noakes et al., 2001a). Estas porções de massa caruncular são expulsas e formam a lóquia, juntamente com o conteúdo fetal remanescente, o sangue proveniente da rutura dos vasos do cordão umbilical e parte das membranas fetais (Noakes et al., 2001a). Logo após o parto, o útero de vacas saudáveis contém 1 a 2 litros (L) de lóquia, verificando-se uma descarga maior durante os primeiros dois ou três dias que, praticamente desaparece aos 14-18 dias depois do parto (Drost, Thomas, Seguin & Tredsson, 2002). Até ao 9º dia é frequentemente ensanguentado, no entanto, quando se aproxima do fim, o corrimento torna-se mais claro e translúcido. A expulsão da lóquia normal não apresenta odor desagradável (Noakes et al., 2001a; Sheldon, Lewis, LeBlanc & Gilbert, 2006, Sheldon et al., 2008a).

A regeneração do endométrio ocorre inicialmente nas áreas intercarunculares. Após a mesma, há uma re-epitelialização das carúnculas em virtude do crescimento centrípeto das células provenientes das glândulas uterinas circundantes (Sheldon et al., 2008a). A regeneração epitelial completa-se por volta dos 25 dias após o parto, mas as camadas mais profundas dos tecidos só são restauradas completamente a partir das 6-8 semanas (Sheldon et al., 2008b). Enquanto ocorrem essas alterações epiteliais, as carúnculas diminuem de tamanho. Aos 40-60 dias pós-parto, elas têm apenas 4 a 8 milímetros (mm) de diâmetro e 4 a 6 mm de altura (Sheldon et al., 2008a).

1.4. Reinício da actividade ovárica

A primeira ovulação no período pós-parto é essencial para a eficiência reprodutiva futura e a sua ausência caracteriza o anestro nesse espaço temporal (Vieira, 2011).

Depois do parto, a concentração de hormonas esteróides decresce para valores basais e há um aumento da concentração de FSH (hormona folículo-estimulante) no plasma que estimula o aparecimento da primeira onda folicular (Sheldon, Noakes, Rycroft, Pfeiffer & Dobson, 2002). Consequentemente, o primeiro folículo dominante é seleccionado por volta dos 10-12 dias pp e pode ter três destinos possíveis: ovulação e formação do primeiro corpo lúteo (retorno da actividade cíclica), atresia com surgimento de uma nova onda folicular sem ovulação (anestro) ou formação de um quisto folicular (Sheldon et al., 2008b).

O principal factor que determina o destino dos folículos dominantes é a frequência de pulsos de LH (hormona luteinizante). Geralmente, a ovulação ocorre quando o intervalo da frequência

de pulsos de LH é de 1 hora. Portanto, factores que nesse período a suprimam, podem retardar o retorno à actividade cíclica dos ovários (Noakes et al., 2001a).

Uma característica interessante do crescimento folicular nas quatro semanas após o parto é que há bem menos folículos dominantes ou corpos lúteos no ovário ipsilateral ao corno uterino anteriormente gravídico em comparação ao ovário contralateral (Sheldon *et al*, 2002). Este facto parece sugerir que a infecção uterina influencia a actividade dos ovários pois, em animais com elevado nível de contaminação bacteriana, mais de 90% tiveram a sua primeira onda folicular no ovário contralateral à gestação prévia, enquanto que em fêmeas com uma carga microbiana menor, apenas 70% das ondas foliculares foram registadas no ovário contralateral. No entanto, folículos de ovários contra e ipsilaterais em relação à gestação prévia têm a mesma capacidade funcional (Sheldon et al., 2002). Uma hipótese que pode explicar este efeito localizado é que dado o maior tamanho do corno uterino previamente grávido, a irrigação sanguínea é maior, o que vai promover uma maior absorção de mediadores inflamatórios (Sheldon et al., 2002).

Sheldon & Dobson (2004) propuseram que a resposta imunológica à infecção uterina, bem como as endotoxinas produzidas pelas bactérias, teriam um efeito localizado na função ovárica. Estes autores referiram que a infusão da endotoxina da *Escherichia coli* (*E. Coli*) inibia a secreção pulsátil de LH pela adeno-hipófise, suprimia a secreção da gonadoliberina (GnRH) pelo hipotálamo e reduzia a resposta aos pulsos de GnRH. Noutras fêmeas, a endotoxina bloqueou a elevação da concentração pré-ovulatória de estradiol, no plasma, mesmo perante valores normais de LH pulsátil. Esta observação sugere, novamente, que poderá haver um efeito directo da contaminação bacteriana na actividade ovárica.

Propôs-se, por outro lado, que uma menor actividade ovárica possa ser consequência da ausência de sensibilidade ovárica à hormona FSH (Williams et al., 2007) já que a sua concentração não parece ser alterada pelo grau de contaminação bacteriana (Sheldon et al., 2002). Apesar de concordarem com a afirmação anterior, Williams et al. (2007) demonstraram que os corpos lúteos que se formavam destas ovulações eram de menores dimensões e segregavam menos progesterona, nas vacas com maior índice de crescimento bacteriano. Facto que poderá ser positivo na auto-regulação destas infecções, dado a progesterona ter um efeito imunossupressor.

1.5. Eliminação da contaminação bacteriana

Durante o parto, o útero é contaminado por bactérias, que são posteriormente eliminadas pelos mecanismos de defesa do mesmo (Sheldon et al., 2008b). Nessa altura, a vulva relaxa e o cérvix dilata, permitindo que as bactérias entrem na vagina e no útero (Williams et al., 2007).

A contaminação bacteriana é resultante do ambiente que rodeia a fêmea no pós-parto, da pele e das fezes da própria vaca (Földi et al., 2006). Mais de 90% das vacas leiteiras são contaminadas nas primeiras duas semanas após o parto (Williams et al., 2005; Potter, Guitian, Fishwick, Gordon & Sheldon, 2010). Contudo, isto não significa que desenvolvam doença uterina (Sheldon et al., 2002; Sheldon & Dobson, 2004). Estes últimos autores demonstraram que a percentagem de contaminação uterina por bactérias decrescia de 78% nos dias 16-30, para 50% nos dias 31-45 e por fim, 9% nos dias 46-60 pp. Contaminação bacteriana não é sinónimo de infecção e a percentagem de vacas com presença de bactérias no útero vai diminuindo com o tempo (Williams et al., 2005).

A bactéria *E. coli* é o contaminante principal nos primeiros dias pós-parto. Já a *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) é a bactéria mais importante no pós-parto tardio e está associada a fêmeas com endometrite (Williams, et al., 2007). A *E.coli* parece aumentar a susceptibilidade do útero para infecções subseqüentes por *T. pyogenes* e anaeróbios negativos, tornando-se relevante para o estabelecimento e persistência de infecção uterina (Silva et al., 2009).

O ambiente uterino só é comprometido quando ocorrem alterações nos mecanismos de defesa local e conseqüente persistência das bactérias, facto que permite o estabelecimento de diferentes quadros de infecção uterina (Sheldon & Dobson, 2004; Marques Júnior, Martins e Borges, 2011). Os mecanismos para controlar a infecção uterina são mantidos de várias formas (Tabela 2): anatomicamente, pelo epitélio cilíndrico simples ou pseudo-estratificado do endométrio; quimicamente, pelas secreções das glândulas endometriais; imunologicamente, através da acção das células polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) e dos anticorpos (Azawi, 2008). Todos estes mecanismos estão funcionais durante o período de involução uterina normal e, qualquer alteração a este nível, influencia a capacidade de eliminação dos microrganismos (Sheldon et al, 2008a).

Vacas que apresentem partos distócicos, lesões traumáticas do endométrio ou retenção placentária (RP) são animais menos resistentes à contaminação uterina (Földi et al., 2006; LeBlanc, 2008; Sheldon et al., 2008a). Nestes casos, existe uma diminuição na eficiência das células fagocitárias no endométrio e no lúmen uterino e, como resultado, potenciais microrganismos patogénicos podem persistir e causar metrite ou endometrite (Turner, Healey & Sheldon, 2012).

Tabela 2. Mecanismos de defesa do útero. Adaptado de Sheldon et al. (2008a)

Mecanismos de defesa do útero

Neutrófilos no ambiente intrauterino

Barreira físicas da vulva e do cérvix

Contracções uterinas persistentes e involução do útero

Desprendimento das carúnculas (expulsão de bactérias aderentes)

Produção de Imunoglobulinas

Imunidade mediada por células

Potencial hidrogeniónico (pH) intrauterino (de 6,4 durante o diestro, eleva-se para 7,0 durante o cio, reduzindo a taxa de crescimento bacteriano)

Flora bacteriana vaginal normal

A resposta imunitária do útero é gerada pelas células imunitárias que estão no endométrio, pelo estroma endometrial e pelas células epiteliais. Na verdade, estas células epiteliais são a primeira linha de defesa contra os organismos microbianos presentes no lúmen uterino (Sheldon et al., 2008b)

A imunidade inata é a defesa inespecífica contra microrganismos, que inclui as barreiras físicas da pele e das mucosas, péptidos antimicrobianos, o sistema de complemento e células que detectam e respondem aos microrganismos (Sheldon et al., 2008a). As células hematopoiéticas envolvidas na resposta inata incluem monócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e células *natural killer*. A fagocitose por parte dos PMNs é a primeira e mais importante linha de defesa inespecífica face à contaminação bacteriana (Kasimanickam et al., 2004; Sheldon & Dobson, 2004). Algumas destas células do sistema imunitário inato usam receptores de reconhecimento para detectar antígenos, conhecidos como PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*). As famílias mais importantes de receptores de reconhecimento são os receptores *Toll-like* (TLRs), receptores *nucleotide oligomerization domain* (NOD)-like (NLRs), receptores *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I)-like (RLRs) e receptores *C-type lectin* (CLRs) (Turner et al., 2012)

Para além desta resposta imunitária, existe também a adquirida, que engloba a imunidade humoral (linfócitos B) e a imunidade mediada por células (linfócitos T). A imunidade humoral, na forma de imunoglobulinas (Ig), actua no útero (Sheldon et al., 2008a). Os antígenos bacterianos capturados pelos macrófagos (células apresentadoras de antígeno) estimulam os linfócitos T helper a produzir interleucina (IL) 2 que, por sua vez, estimula os linfócitos B a diferenciarem-se no endométrio e a produzir anticorpos específicos que ajudam a combater a infecção (Turner et al., 2012).

Há um grupo de moléculas que modulam a resposta imunitária, chamadas citoquinas. Delas são exemplo, o interferão α , o factor de necrose tumoral (TNF α) e as interleucinas.

As interleucinas (IL1, IL2, IL6, IL8) agem em conjunto para activar e estimular a diferenciação de várias linhas celulares, aumentam a concentração plasmática de cálcio (que ajuda nas contracções do miométrio), estimulam a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e induzem um aumento do número de receptores da oxitocina no miométrio (Sheldon & Dobson, 2004; LeBlanc, 2012). Estas citoquinas causam pirexia e, providenciam um feedback positivo para aumentar a mobilização das células imunitárias.

As citoquinas pró-inflamatórias que são libertadas em resposta à infecção bacteriana também estimulam a secreção hepática de proteínas de fase aguda. Por definição, estas são as proteínas produzidas pelo fígado que, aumentam ou diminuem a sua concentração em pelo menos 25%, nos primeiros 7 dias após um dano tecidual, que tenha originado a resposta de fase aguda. As proteínas que apresentam elevação dos seus valores séricos, como a proteína C reactiva, a substância amilóide sérica-A, a haptoglobina, o fibrinogénio, a α 1-glicoproteína ácida e a ceruloplasmina são denominadas de proteínas de fase aguda positivas; enquanto as que apresentam redução daqueles valores, como a albumina e a transferrina, são denominadas de proteínas de fase aguda negativas (Cerón, Eckersall & Martínez-Subiela, 2005). De uma forma geral, a concentração de proteínas de fase aguda no plasma aumenta na altura do parto e diminui com a eliminação da contaminação bacteriana e involução uterina (Sheldon & Dobson, 2004).

Pode haver uma grande diversidade de bactérias envolvidas na contaminação uterina (Noakes et al., 2001a). De uma forma geral, a infecção uterina está associada a *T. pyogenes*, *E. coli*, *Fusobacterium necrophorum* e *Prevotella spp.* que actuam sinergicamente, contribuindo para um maior risco de doença uterina (Földi et al., 2006; Sheldon et al, 2008a).

2. PATOLOGIAS DO APARELHO REPRODUTOR ASSOCIADAS AO PÓS-PARTO

2.1. Urovagina e Pneumovagina

Por vezes, durante um parto normal, ocorrem lesões traumáticas no aparelho genital, nos ossos ou nervos da pélvis. No entanto, estas lesões são mais comuns após um parto distócico (Noakes et al., 2001a). Qualquer porção do canal obstétrico pode sofrer lacerações durante a tração do feto, mas o cérvix e a vulva são as estruturas anatómicas mais sensíveis (Sheldon et al., 2008a).

Se uma laceração da vulva ou do períneo não for suturada, a formação de tecido cicatricial pode impedir a acção do esfíncter vulvar, com formação consequente de uma pneumovagina, vaginite e metrite (Noakes et al. 2001a).

A pneumovagina pode ser congénita ou ocorrer devido a uma lesão da vulva durante o parto, como já foi referido. Está frequentemente associada à distócia ou parto de uma cria de grandes dimensões. Esta condição pode passar despercebida até ao exame ginecológico ou inseminação artificial, escutando-se, por vezes, ruído do ar aspirado pela vulva (Sheldon et al., 2008a). A pneumovagina pode conduzir a infecção uterina, como endometrite e consequentemente infertilidade, em virtude da possibilidade de acumulação de fezes no seu interior (Goncagul, Seyrec, Kumru & Seyrec, 2012). O tratamento de pneumovagina requer resolução cirúrgica através da sutura de *Caslick* (Sheldon et al., 2008a).

A urovagina é uma condição patológica caracterizada pela acumulação de urina na porção cranial da vagina (Zobel, Tkalčić, Štoković, Pipal & Buić, 2001). Apesar da causa desta não ser totalmente conhecida, uma alteração dos ligamentos suspensores do aparelho reprodutor, como resultado de uma distócia, partos gemelares ou sucessivas gestações, pode ser factor predisponente (Sheldon et al., 2008a). O número de fêmeas diagnosticadas com urovagina aumentou nos últimos anos. Estudos recentes reportam uma prevalência significativa em vacas Holstein, com 65% de redução da taxa de gestação e, um efeito considerável na taxa de refugo por subfertilidade.

Sabe-se que a urina tem um efeito espermicida e causa irritação crónica da mucosa resultando em vaginite, cervicite e posteriormente endometrite (Zobel et al., 2011). O diagnóstico de urovagina é, muitas vezes, feito ao exame pós-parto e, nalguns casos, a resolução é espontânea (Sheldon et al., 2008a). O reinício à actividade ovárica ou então, a administração de PGF_{2α} para a indução do cio podem ajudar na resolução de alguns casos. Nos casos mais graves ou prolongados poderá ser necessária uma intervenção cirúrgica, que é dispendiosa, a recuperação é prolongada e não há garantias de sucesso (Sheldon et al., 2008; Zobel et al., 2011).

2.2. Vaginite

A vaginite está associada a uma infecção mais extensa do aparelho genital. No entanto, esta afecção também pode estar associada à pneumovagina ou urovagina ou ainda, a traumatismo durante o parto (Sheldon et al., 2008a). Nas vacas adultas, a vaginite pode ser resultante de infecções ambientais e facilmente levam à endometrite. A prevenção deve basear-se na melhoria da higiene. Uma série de infecções específicas são acompanhadas de vaginite e/ou endometrite (Baruselli, sem data). Além disso, estão descritas causas infecciosas de vaginite, em especial, no regime de monta natural. A vulvovaginite pustular infecciosa provocada pelo herpesvirus bovino 1 (BHV1) é a mais comum (Sheldon et al., 2008a).

No geral, o sinal comumente manifestado pela vaca é o tenesmo. Também pode haver secreção vaginal ou vulvar anormal e alterações na mucosa, que variam de hiperémia à necrose e mais raramente, gangrena (Baruselli, sem data). O diagnóstico faz-se por observação do corrimento vaginal e com o auxílio do vaginoscópio (Perez-Marion, Moreno & Calero, 2012). A vaginite discreta pouco influencia a fertilidade subsequente, a menos que seja acompanhada por endometrite, pneumovagina ou urovagina. Porém, casos graves de vaginite podem originar cicatrizes que aumentam a probabilidade de distócia ao parto seguinte. Soluções salinas ou soluções anti-sépticas suaves podem ajudar a resolver a vaginite, mas quando a infecção atinge tecidos mais profundos é recomendado o uso sistêmico de antibióticos (Sheldon, Barret & Boyd, 2008).

2.3.Retenção placentária

A expulsão da placenta após o parto é um processo fisiológico que envolve a perda da aderência feto-maternal, combinada com contrações do miométrio (Noakes et al, 2001a). Em 77% dos animais, a placenta é expelida 6 a 8 horas após o parto.

A retenção placentária numa vaca é definida como a ausência da sua expulsão nas 12-24 horas depois do parto (Sheldon et al., 2008b; Djuricic, Vince, Ablondi, Dobranic & Samardzija, 2012b). Segundo os primeiros, a incidência de RP varia entre 2% e 5% das vacas de numa exploração.

A RP é um transtorno comum que tem um efeito negativo sobre a eficiência reprodutiva das vacas, predispondo-as a infecções uterinas (Noakes et al., 2001a). Está igualmente associada a uma diminuição da produção de leite que persiste mesmo após a resolução do problema (Sheldon et al., 2008a).

Vários factores, tais como gémeos, distócia, nados mortos, parto induzido, aborto, hipocalcémia, idade avançada, cetose e balanço energético negativo (BEN), são factores de risco associados à RP (LeBlanc, 2008).

A RP mantém a permeabilidade do cérvix, que é uma barreira física às infecções e atrasa a involução uterina, a expulsão da lóquia e a regeneração do endométrio (Potter, Guitian, Fishwick, Gordon & Sheldon, 2010).

Qualquer interferência com o processo de maturação dos placentomas ou a ocorrência de um parto prematuro, antes de a maturação estar completa, resulta nesta condição (Sheldon et al, 2008). Mas a causa principal deste problema parece ser uma deficiência em colagenases, enzimas proteolíticas, que têm um papel crucial na libertação da placenta ao lisarem as ligações peptídicas do colagénio (Djuricic et al., 2012b). Há uma persistência do colagénio tipo III em vacas com RP, daí sugerir-se haver uma deficiência de colagenases envolvidas na sua hidrólise (Eiler, 1997). A RP também parece estar relacionada com uma falha do sistema imunitário no processo degenerativo dos placentomas, no final da gestação (LeBlanc, 2008). Quanto ao impacto da RP, ele é muito variável, pois depende da evolução da doença. Um útero com RP está infectado por diversas bactérias e as defesas do endométrio estão reduzidas em virtude da diminuta funcionalidade dos neutrófilos (Djuricic, 2012b). Com o aumento do risco de infecção uterina, a RP pode evoluir para metrite ou endometrite. O impacto da condição resulta disso e não de si mesma (LeBlanc, 2008). As causas da RP apesar de serem multifactoriais parece, ainda, haver uma certa componente genética (Potter et al., 2010).

Não há evidência que a remoção manual da placenta traga benefícios e alguns autores sugerem que é traumático para o útero e que pode retardar o retorno à condição reprodutiva plena (Leblanc, 2008). A terapia local com vários antibióticos intrauterinos está recomendada na literatura. Esta abordagem tem sido questionada devido às interacções múltiplas das substâncias antibióticas com o conteúdo uterino e à grande amplitude do seu grau de absorção (Djuricic et al., 2012b). Além disso, os resultados de alguns estudos indicam que o tratamento da retenção das membranas fetais com antibióticos parenterais, mas sem manipulação e tratamento intrauterino, pode ser tão eficaz quanto o tratamento convencional (Sheldon et al., 2008). Uma das abordagens farmacológicas para a prevenção e tratamento da RP é a administração de prostaglandinas imediatamente após o parto (Noakes et al., 2001a). Outros tratamentos são a administração parenteral de antibiótico: Ceftiofur ou Oxitetraciclina (também pode ser intrauterina); e aplicação de colagenases (LeBlanc, 2008). A abordagem mais aconselhada parece ser o tratamento selectivo dos casos que evoluem para metrite ou endometrite (Djuricic et al., 2012b).

2.4. Infecções uterinas

Nos bovinos, a saúde uterina no pós-parto encontra-se facilmente comprometida e as doenças clínicas são mais comuns que em qualquer outro ruminante (Sheldon & Dobson, 2004).

As infecções da esfera genital, durante esse período, representam a maior causa de ineficiência reprodutiva e perda económica (infertilidade, diminuição da produção de leite, aumento das despesas com medicamentos e aumento do refugo; Couto, Vaillancourt & Lefebvre, 2013).

Os factores de risco para uma infecção uterina são bem conhecidos, mas os correspondentes programas de prevenção da doença não estão implementados no terreno, tanto quanto seria desejável. Esta patologia é importante porque não só compromete a função do útero, mas também dos ovários e dos centros de controlo superior, como o hipotálamo e a hipófise, condicionando o bem-estar do animal e causando subfertilidade e infertilidade. Estes efeitos podem persistir mesmo após a resolução clínica da doença (Sheldon & Dobson, 2004). Na Figura 2 podemos observar vários tipos de corrimento cervico-vaginal que podem ser relacionados com o grau de infecção uterina.

Figura 2. Diferentes aspectos do corrimento cérvico-vaginal. O aspecto e o odor do corrimento podem indicar o grau de infecção uterina. Retirado de Marques Júnior et al. (2011)



Legenda: a. corrimento sanguinolento; b. corrimento hemopurulento; c. corrimento purulento; d. corrimento mucopurulento; corrimento com estrias de pus; f. corrimento limpo.

O ambiente endócrino também influencia a capacidade imunitária no útero. O risco de infecção uterina é maior durante a fase lútea do ciclo éstrico e a indução da luteólise e do cio é um dos tratamentos mais efectivos da infecção uterina (Sheldon et al., 2008b).

As bactérias reconhecidas como associadas à doença clínica são *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* e *Prevotella melaninogenica*. O *T. pyogenes* é considerada a bactéria mais relevante no estabelecimento da infecção puerperal devido à sua persistência no útero, resistência a tratamentos e à sua acção sinérgica com anaeróbios Gram negativos (Mateus, Lopes da Costa, Carvalho, Serra & Robalo Silva, 2002b; Silva et al., 2008). Entre os seus efeitos, o *T. pyogenes* produz um factor de crescimento para *F. necrophorum* que, por sua vez, produz uma leucotoxina e, a *P. melaninogenica* produz uma substância que inibe a fagocitose. A contaminação quantitativa e qualitativa do útero depende pois, do balanço entre a contaminação bacteriana e os mecanismos de defesa do hospedeiro (Sheldon & Dobson, 2004).

Os factores de risco para a ocorrência de uma infecção uterina incluem a RP, o ambiente do parto, partos gemelares, partos distócicos e a dieta. Porém, a RP é de todos, o mais importante (Sheldon et al., 2008b).

O elevado risco de contrair doença durante o puerpério é atribuído, em parte, à redução da função do sistema imunitário, até às 3 semanas pp. A quebra no consumo de calorias, vitaminas e minerais, o BEN, a perda de peso, a mobilização de ácidos gordos e proteínas, as mudanças drásticas dos níveis de estrogénio e progesterona e a elevação significativa da concentração de cortisol, no momento do parto, parecem estar relacionados com a redução das defesas imunitárias (LeBlanc, Osawa & Dubuc, 2011).

Os custos associados à infecção uterina dependem dos custos do tratamento, da quebra da produção de leite e da infertilidade. No Reino Unido, o custo directo do tratamento e da diminuição da produção numa vaca com doença uterina é cerca de 91 euros (€), com uma perda média de produção de cerca de 300L. O custo indirecto devido a um mais longo intervalo entre partos, inseminações extras e reduzida expressão de cios são cerca de 101€ por vaca, o que perfaz um total de despesas de 192€ por fêmea. Os custos directos da doença uterina foram estimados em cerca de 1059€ por 100 vacas, por ano, utilizando-se dados de 21 explorações de leite do Reino Unido, recolhidos entre 1989 e 1999 (Sheldon et al., 2008b). Segundo este estudo, os autores concluíram que vacas com doença uterina têm menor probabilidade de o primeiro folículo dominante pós-parto sofrer ovulação (8% vs. 40%, $p < 0,05$) e que é mais provável apresentarem perfis de progesterona anormais (58% vs. 39%, $p < 0,05$).

A resposta das células imunitárias pode ser afectada por diversas estratégias terapêuticas habitualmente usadas na resolução de problemas pós-parto dos bovinos. Por exemplo, a remoção manual da placenta pode inibir a actividade fagocitária dos leucócitos por vários dias, assim como, a administração intrauterina de antissépticos e desinfectantes (Azawi, 2008).

A escolha da terapêutica para uma infecção uterina deve permitir eliminar o microorganismo patogénico do útero e proporcionar um menor intervalo de segurança possível para resíduos no leite e na carne (Azawi, 2008).

Os seguintes critérios são importantes para a escolha do antibiótico para o tratamento de infecção uterina (Azawi, 2008):

1. Deve actuar contra os microorganismos patogénicos do útero e manter a sua actividade no ambiente uterino;
2. Deve estar presente em concentrações suficientes no local da infecção;
3. Não deve inibir os mecanismos de defesa normais, deve ser bem tolerado e não ser agressivo para o endométrio.

2.4.1. Metrite

A metrite é uma reacção inflamatória grave que envolve todas as camadas do útero: endométrio, submucosa, muscular e serosa (Sheldon & Dobson, 2004; Földi et al., 2006) e pode mesmo, afectar as serosas de outras vísceras abdominais, causando peritonite localizada ou generalizada (Sheldon et al., 2008a).

A incidência da metrite varia entre 2,2% e 37,3% nos bovinos de leite (Földi et al., 2006), havendo contudo, uma grande variação entre explorações, podendo nalgumas, atingir os 40% (Sheldon & Dobson, 2004).

De acordo com Giuliodori et al. (2013), animais com útero aumentado de tamanho, corrimento fétido, aquoso, vermelho acastanhado, febre e sinais de doença sistémica até aos 21 dias em leite (DEL) são diagnosticados como tendo metrite puerperal/metrite tóxica. Já animais que apresentem um útero de dimensões aumentadas, corrimento fétido, aquoso, vermelho acastanhado, mas sem sinais de doença sistémica até aos 21 DEL são diagnosticados como tendo metrite clínica.

Os sinais sistémicos descritos são a diminuição na produção de leite, apatia, temperatura superior a 39,5°C, assim como qualquer outro sinal de toxémia (Földi et al., 2006; Sheldon et al., 2006; Sheldon et al., 2008b). Um corrimento fétido não só indica uma contaminação do útero por agentes patogénicos, mas também um certo grau de resposta sistémica estimulada pelo sistema imunitário inato. Esta constatação advém do facto de um corrimento fétido, mas não purulento, estar relacionado com a produção de proteínas de fase aguda, determinada pela elevada concentração de α_1 -glicoproteína ácida, produzida pelo fígado em resposta às citocinas pró-inflamatórias (Williams et al., 2005).

Segundo LeBlanc (2008), o mais importante factor de risco para a ocorrência de metrite é a RP. A *E.coli* e o *T. pyogenes* são as espécies mais relevantes na patogénese da metrite devido à sua persistência no útero. Contudo, muitos outros organismos como *F. necrophorum*, *P. melaninogenicus*, *Bacteroidetes spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus spp.*, e

Staphylococcus spp., em várias combinações, foram isolados de animais com metrite e, pensa-se serem eles, os responsáveis pelo desenvolvimento da metrite puerperal (Santos, Gilbert & Bicalho, 2011).

Existe alguma controvérsia quanto ao tratamento da metrite com antibióticos sistêmicos, pois o grau da afecção pode variar de moderado a grave (LeBlanc, 2008). Contudo, para evitar a morte, em casos mais graves, e também por questões de bem-estar animal, é aconselhado o tratamento sistêmico. Os antibióticos mais amplamente utilizados são o ceftiofur (1-2 mg/Kg, im, 1/d) e a penicilina procaínica (21000 UI/Kg, 12- 24h) por 3-5 dias, mas a percentagem de cura é bastante variável (LeBlanc, 2008; Giuliadori et al., 2013). De acordo com estes últimos autores, a terapia com ceftiofur (1-2mg/Kg, im, 1/d) durante três dias, não está associada à cura, mas sim relacionada com um incremento da taxa de gestação com inseminação artificial a tempo fixo (IATF) e, deste modo, com redução do risco de refugo reprodutivo. Também referiram que a probabilidade da ocorrência de corrimento vaginal normal (indicador de cura, na metrite) aumentava, 2,6% por dia.

LeBlanc (2008) afirmou que, numa tentativa de diagnóstico precoce da metrite puerperal, as vacas com RP deveriam ser inspeccionadas diariamente, dando especial atenção à colheita da temperatura rectal, à produção de leite e à ingestão de alimento/apetite. Uma abordagem racional para este autor seria, tratar com os antibióticos anteriormente mencionados todas as fêmeas que, nos primeiros 10 dias pós-parto, apresentassem pelo menos dois destes sintomas: temperatura $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$, retenção placentária, apatia ou inapetência ou ainda, corrimento uterino fétido.

Apesar de a oxitetraciclina ser bastante utilizada, há evidência de resistência bacteriana a este antibiótico e são necessárias elevadas concentrações para se conseguir inibir o crescimento bacteriano, no útero. A CMI (concentração mínima inibitória) da oxitetraciclina contra os principais contaminantes uterinos tem vindo a aumentar durante os últimos 10-15 anos, o que faz requerer doses muito elevadas (2-4g/dia), durante 3-5 dias. As cefalosporinas têm o valor mais baixo de CMI, quando testadas em bactérias recolhidas do útero de vacas leiteiras com doença clínica (Földi et al., 2006)

Os efeitos negativos da metrite afectam a fertilidade de várias formas: atrasa o retorno à actividade ovárica após o parto (Mateus et al., 2002a), altera o ambiente uterino e impede o desenvolvimento embrionário (Giuliadori et al., 2013). Tanto a metrite puerperal, como a metrite clínica, têm um efeito negativo sobre o pico de produção de leite. Uma das razões pode resultar da redução da ingestão voluntária, facto que diminui a energia disponível para a produção de leite (Giuliadori et al., 2013).

Por último, são necessários bons cuidados de enfermagem. A vaca deve ser colocada numa baia com cama de boa qualidade, confortável e, estimulada a alimentar-se e a beber água. Deve-se minimizar a exploração uterina, nos momentos agudos de doença, pois nestes casos de metrite, o útero torna-se friável e propenso a traumatismo (Sheldon et al., 2008a).

2.4.2. Endometrite clínica

2.4.2.1. Definição e incidência da endometrite clínica

A literatura especializada carece de uma definição universalmente aceite de endometrite bovina e, associado a esse facto, não existe uma uniformidade nos critérios de diagnóstico (Gilbert, Shin, Guard, Erb & Frajblat, 2005). LeBlanc et al. (2011) definiram a endometrite baseando-se em factores relacionados com o alongamento do período parto-concepção. Neste estudo, concluíram que as consequências reprodutivas dos sinais clínicos dependem da fase do pós-parto.

Kasimanickam et al. (2004) descrevem a endometrite clínica como sendo uma inflamação do endométrio sem sinais sistémicos e que está associada a um atraso na involução uterina. Já Couto et al. (2013) definem-na como uma inflamação do endométrio que sofreu involução de forma normal com corrimento vaginal purulento visível depois dos 21 dias. Potter et al. (2010) confirmaram o facto e ainda registaram uma perturbação na função do endométrio e ovárica. A partir dos resultados de vários autores, a incidência de endometrite na produção leiteira varia dentro de um intervalo de valores alargado (3,4% até mais de 40%), valores estes que são obtidos com base na interpretação dos resultados dos vários métodos de diagnóstico (Gilbert et al., 2005).

2.4.2.2. Fisiopatologia

Na endometrite, a inflamação é superficial, limitada ao endométrio e não se estende para além do *Stratum spongiosum*. Histologicamente, a endometrite é caracterizada pela ruptura do epitélio superficial, infiltração de células inflamatórias, congestão vascular, edema do estroma, com grau variável de linfócitos e células plasmáticas nas camadas superficiais (Sheldon & Dobson, 2004; Földi et al., 2006; Meira et al., 2012).

A endometrite clínica caracteriza-se também pela presença de corrimento uterino purulento (> 50% de conteúdo purulento), 21 ou mais dias no pós-parto, ou mucopurulento (aproximadamente 50% de pus e 50% de muco), após os 26 dias pós-parto, um diâmetro cervical superior a 7,5 cm e ausência de sinais sistémicos (Gilbert et al., 2005; Sheldon et al., 2006; Sheldon et al., 2008b; Potter et al., 2010).

Os efeitos observados aquando da doença podem ser mediados directamente pelos produtos bacterianos, como lipopolisacáridos ou indirectamente, por mediadores de inflamação como citoquinas, eicosanóides, óxido nítrico e *stress* oxidativo que afectam a função dos espermatozóides, do ovário e do útero (Gilbert, 2012).

Ao contrário dos outros agentes patogénicos, a incidência e a importância da *E. coli* decresce gradualmente com o tempo (Földi et al 2006) e então, as bactérias associadas à endometrite clínica são principalmente *T. pyogenes*, *F. necrophorum* e *Prevotella spp.* (Potter et al., 2010). O endométrio torna-se hiperémico e congestionado, as células epiteliais podem descamar ou até mesmo, necrosar. Nas formas crónicas, o tecido cicatricial pode substituir o endométrio funcional, resultando em fibrose periglandular, degenerescência quística e/ou atrofia das glândulas uterinas (Földi et al., 2006).

2.4.2.3. Impacto da endometrite clínica

Num estudo realizado por Berlund et al. (2008), vacas com endometrite clínica, diagnosticadas por citologia, revelaram ter menos 17,9 pontos percentuais de probabilidade de ficarem gestantes à primeira IA, mais 25 dias em aberto que a média e uma tendência para exigir mais inseminações por concepção do que as vacas sãs. De acordo com Potter et al. (2010), há um aumento de 3% na taxa de refugo por infertilidade. Os custos são imputados ao aumento dos dias em aberto, à baixa concepção ao primeiro serviço, a mais IA, à diminuição da taxa de gestação, ao aumento do refugo e à aquisição de novos animais (Gilbert et al., 1998; Gilbert et al., 2005).

2.4.2.4. Técnicas de diagnóstico

A infecção uterina e, em concreto, as endometrites são processos difíceis de diagnosticar. Se é certo que o endométrio pode estar inflamado, é também certo que toda a involução uterina acarreta um certo grau de inflamação e, por isso, o diagnóstico deve ter tal facto em conta (Barlund, Carruthers, Waldner & Palmer, 2008).

A abordagem aconselhável para o diagnóstico da endometrite clínica consiste em examinar as fêmeas, duas a oito semanas após o parto, de forma a identificar aquelas que não estão a ter uma involução uterina normal. O desafio será identificar aqueles animais que realmente estão em risco de redução da fertilidade e que necessitam de facto de tratamento (LeBlanc, 2008). Variações na aparência do corrimento, nesta fase, podem também confundir o diagnóstico (Sheldon et al., 2006).

Os meios de diagnóstico a serem empregues devem ser avaliados segundo critérios económicos e com a possibilidade de os relacionar com os parâmetros reprodutivos da exploração (Barlund et al., 2008), dado o risco de sobrediagnosticar endometrites e sujeitar a tratamento animais que não vão ser afectados quanto ao seu desempenho reprodutivo.

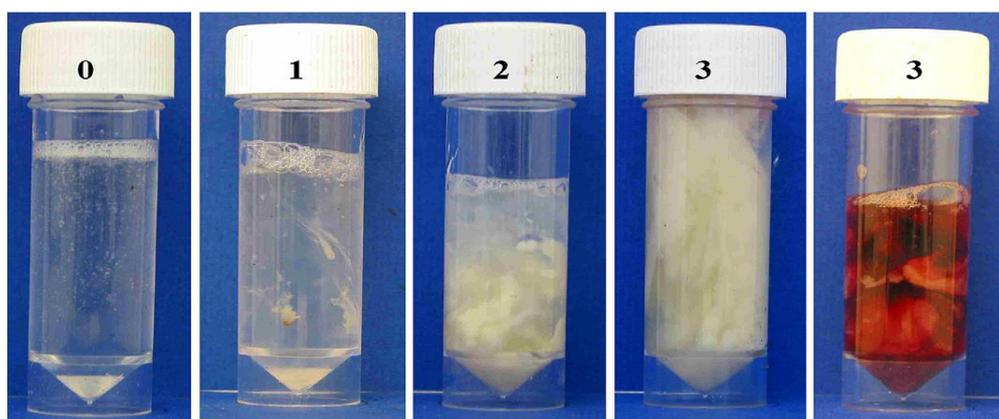
Embora na prática, a palpação transrectal do útero seja o método mais utilizado pelo médico veterinário para o diagnóstico de doenças uterinas, vários estudos têm vindo a demonstrar

que este método resulta num grande número de falsos positivos (Gilbert, Shin, Guard & Erb, 1998; Leutert, von Krueger, Plöntzke & Heuwieser, 2012).

Outros métodos de diagnóstico foram descritos para o exame dos fluídos vaginais como o “exame da luva”, o método de *Metricheck* e a vaginoscopia (Sheldon et al., 2008b). Os dois primeiros implicam a limpeza da vulva com toalhete de papel e a introdução da mão protegida com luva de latex limpa e lubrificada ou, a introdução do aparelho de *Metricheck*, respectivamente, através da vulva e retirar o conteúdo vaginal para observação (Sheldon et al., 2008b). Apesar de se usar um processo simples de limpeza vulvar antes do exame, estas técnicas não causam contaminação bacteriana, nem inflamação (Sheldon & Dobson, 2004). A técnica de vaginoscopia para o diagnóstico de endometrites tem uma fiabilidade bastante superior quando comparada com a palpação transrectal do útero. No entanto, é subutilizada pelo médico veterinário (Barlund et al., 2008). Estes autores calcularam que a vaginoscopia tem 53,9% de sensibilidade e 95,4% de especificidade, quando comparada com os resultados obtidos por citologia.

Williams et al. (2005) estabeleceram um sistema de avaliação de quatro pontos para caracterizar o muco vaginal (Figura 3; 0= corrimento claro ou translúcido; 1= corrimento claro com “flocos” de pús; 2= corrimento com menos de 50% de pús; mucopurulento; 3= corrimento com mais de 50% de pús; purulento). O aspecto e o odor (0 = sem odor; 3 = odor fétido) são pontuados e a soma dos dois classifica a endometrite clínica de 0 a 6 (Sheldon & Dobson, 2004; Sheldon et al., 2008b).

Figura 3. Esquema de pontuação da endometrite clínica. Retirado de Sheldon et al. (2006)



Legenda: 0 = muco limpo ou translúcido; 1 = corrimento claro com “flocos de pús”; 2 = corrimento mucopurulento; contém $\leq 50\%$ de pús; 3 = corrimento purulento; contém $>50\%$ de pús, que pode ser branco, amarelo ou, ocasionalmente, sanguinolento

O exame citológico é o método de diagnóstico definitivo para a endometrite e permite diferenciar a endometrite clínica, da vaginite ou cervicite (Leutet et al., 2012).

Um importante obstáculo na validação de diferentes métodos de diagnóstico e descrição das características dos testes é a não existência de um padrão *gold standard* na caracterização da inflamação uterina. Para além disso, a presença de corrimento mucopurulento pode não reflectir uma inflamação do endométrio (Leutert et al., 2012) e, desta forma, muitas vezes a vaginoscopia falha na identificação das fêmeas que não estão realmente em risco de terem uma reduzida capacidade reprodutiva (Kasimanickam et al., 2004).

A ecografia transrectal tem sido utilizada para detectar acumulação de fluído, associada à endometrite e oferece a vantagem de um diagnóstico imediato, em tempo real. No entanto, estudos recentes demonstraram que o nível de concordância entre a citologia por “cytobrush” e a ecografia para diagnóstico de endometrite clínica é fraco (Barlund et al., 2008).

2.4.2.5. Tratamento

Têm sido referenciados uma grande variedade de tratamentos para a endometrite, incluindo a antibioterapia sistémica e/ou intrauterina ou a $PGF_{2\alpha}$ injectável. O princípio geral da terapêutica é o de reduzir a carga bacteriana patogénica, aumentar as defesas uterinas e, assim, deter e reverter o processo inflamatório que perturba a fertilidade (LeBlanc, 2008).

A infusão de antimicrobianos no útero tem como objectivo atingir altas concentrações no local da infecção, o que dificilmente é conseguido numa administração sistémica. Apesar disso, é escassa a penetração dos antibióticos nas camadas mais profundas do útero ou outros tecidos do aparelho reprodutor (Brick et al., 2012). Há evidência que vacas com corrimento vaginal purulento melhoram a sua performance reprodutiva quando medicadas com uma única infusão intrauterina de cefapirina, aproximadamente um mês antes da primeira IA, relativamente às fêmeas que não foram sujeitas a qualquer tipo de tratamento (LeBlanc et al., 2011). A emergência de resistências a vários antibióticos por parte de *T. pyogenes* e *E. coli*, tem sido descrita em vacas com endometrite. Por isso, o uso de terapia não-antibiótica como soluções hipertónicas (por exemplo, 50% dextrose em água) pode ser uma estratégia eficaz e viável para estas fêmeas. Estas soluções tendem a reduzir a taxa de crescimento bacteriano no útero, a aumentarem o tónus uterino e fornecem energia para as defesas naturais do útero (macrófagos, neutrófilos), para controlar a infecção e melhorar a performance reprodutiva (Brick et al., 2012). A diluição da solução de Lugol (1-2%) e a oxitetraciclina são irritantes para a mucosa, podem causar necrose e, mais tarde, esclerose, por coagulação do endométrio.

Em vacas cíclicas, a $PGF_{2\alpha}$ causa luteólise do CL, resultando na diminuição dos níveis periféricos de progesterona e num estro subsequente, com elevação dos níveis de estrogénio e das contracções do miométrio. Todos estes eventos são favoráveis ao combate da infecção (LeBlanc, 2008).

2.4.3. Endometrite subclínica

2.4.3.1. Definição e incidência da endometrite subclínica

A endometrite subclínica é definida como uma inflamação do endométrio, caracterizada por uma extensa infiltração de neutrófilos, que pode ser detectada por exame citológico do endométrio (Földi et al., 2006; Meira Jr. et al., 2012; Madoz et al., 2013). Apesar de não apresentar sinais clínicos, a gravidade da doença é suficiente para afectar a performance reprodutiva (Barlund et al., 2008). Pode ocorrer em qualquer altura, após o final da involução uterina (8 semanas ou mais após o parto; Földi et al., 2012).

O valor numérico da sua incidência depende da exactidão da técnica de diagnóstico utilizada e do dia do pós-parto em que é realizada (Couto et al., 2013). Tem sido descrita tão elevada como 43% nas fêmeas com 20-33 DEL, 45% para aquelas entre 34 e 47 DEL e 55% para as vacas com 40 a 60 DEL (Couto et al., 2013).

No passado, a endometrite subclínica era considerada a causa do insucesso reprodutivo quando não era encontrado qualquer outro motivo (Barański, Podhalicz-Dziegielewska, Zduńczyk & Janowski, 2012).

LeBlanc (2001) concluiu que os animais clinicamente normais que eram sujeitos a tratamento tinham uma melhor performance reprodutiva que os que não recebiam qualquer tratamento, sugerindo-se, desta forma, que vacas identificadas como clinicamente saudáveis ao exame ginecológico de rotina, durante o período pós-parto, deviam ser rastreadas para a endometrite subclínica (Kasimanickam et al. 2004). No estudo destes autores, as vacas com alguma perturbação do foro reprodutivo no peri-parto (assistência ao parto, partos gemelares, RP) revelaram 3,5 vezes maior probabilidade de terem um diagnóstico positivo de endometrite subclínica, por citologia endometrial ou ecografia do conteúdo uterino, entre 20-33 dias pós-parto e, 3,18 vezes maior, com os mesmos meios de diagnóstico, entre 34-47 dias pós-parto.

2.4.3.2. Fisiopatologia

As bactérias que contaminam o útero no puerpério são reconhecidas pelo sistema imunitário inato, o que resulta na chamada de células inflamatórias, como os neutrófilos. Estes são recrutados da circulação para o lúmen uterino e iniciam um processo de eliminação daquelas. A quantidade relativa das células inflamatórias face às endometriais tem-se tornado num indicador do processo de inflamação e é uma característica importante da endometrite subclínica (Couto et al., 2013).

Deste modo, este tipo de endometrite tem sido caracterizado pela presença de mais de 18% de células PMN's em amostras de citologia uterina colhidas entre 21-33 dias pós-parto ou

então, mais de 10% de PMN's em amostras colhidas entre 34-47 dias pós-parto (Kasimanickam et al., 2004; Barlund et al., 2008)

Apesar de muitos agentes específicos induzirem infertilidade por endometrite, a causa mais importante do aparecimento da sua forma subclínica é não-específica, por acção de agentes oportunistas que contaminam o útero durante o período puerperal (Kasimanickam et al., 2004).

Barański et al. (2012) realizaram um estudo onde avaliaram a situação bacteriológica do útero e a sua relação com os achados citológicos e concluíram que esta relação era ténue. Registaram um maior número de animais com inflamação uterina que com infecção, facto que sugere que muitos casos de endometrite subclínica não são causados por bactérias, mas sim por outros factores envolvidos na regulação do influxo de PMNs, como a reduzida capacidade das células imunitárias ou a presença de hormonas esteróides ou corpos cetónicos. Também concluíram que a endometrite subclínica parece estar mais associada à involução uterina e à regeneração do endométrio do que com a infecção, pois na maioria dos casos, a inflamação desaparecia espontaneamente após seis semanas, indicando que a descida nas contagens de PMNs correspondia à normal ou a um ligeiro atraso na involução uterina.

São os potentes sinais quimiotáticos que estimulam o afluxo de células PMN para o útero inflamado, e a produção local de TNF- α , leucotrienos e outros eicosanóides (PGF_{2 α} e PGE₂) pode ser relevante na patogénese. No entanto, não são enviados sinais sistémicos e a produção de proteínas de fase aguda não é induzida. Desta forma, vacas com endometrite subclínica raramente apresentam doença sistémica (Földi et al 2006).

2.4.3.3. Impacto da endometrite subclínica

Gilbert et al. (1998) concluíram que a presença de neutrófilos no útero, 40-60 dias pp estava associada à endometrite subclínica, resultando num aumento de 39 dias na média de dias em aberto. Segundo o estudo de Kasimanickam et al. (2004), as fêmeas que apresentaram endometrite subclínica tiveram um aumento de 29 a 62 dias, na média de dias em aberto, relativamente às vacas sem a doença, entre os 20-33 DEL e os 34-47 DEL, respectivamente. Sheldon et al. (2008b) afirmaram que a taxa de concepção ao primeiro serviço era mais baixa em animais com endometrite (29,8% vs. 37,9%, $p < 0,05$), o intervalo parto concepção era maior (151 vs. 119 dias) e havia mais animais refugados por infertilidade (6,7% vs. 3,8%, $p < 0,05$), quando comparados com animais sãos.

As moléculas pró-inflamatórias, incluindo as citocinas TNF α , IL-1 e IL-6 são enviadas para o ovário em resposta às endotoxinas e, desta forma, os produtos bacterianos podem exercer um efeito directo sobre o ovário ipsilateral ou por via destes intermediários. Na verdade, o TNF α suprime *in vitro* a secreção de estradiol pelas células da teca e da granulosa (Sheldon & Dobson, 2004).

Gilbert (2012) referiu que os mediadores de inflamação, mais do que a infiltração de células, exercem um efeito deletério nos embriões. Especificamente, os embriões expostos a estes mediadores têm um reduzido número de células da trofoectoderme. Visto que esta é a fonte do interferão tau (IFN-tau), é plausível que estes componentes da resposta inflamatória (principalmente as citocinas) possam alterar o desenvolvimento do embrião de forma a impedir o reconhecimento materno da gestação. O efeito da inflamação no endométrio pode fisicamente impedir a interacção embrião-endométrio e, desta forma, comprometer a implantação (Gilbert, 2012).

Os dados existentes relacionados com os efeitos sobre a reacção acrossómica e a penetração do oócito são controversos, mas o processo inflamatório contraria certos aspectos funcionais dos espermatozóides, bem como, pode potencializar a fagocitose destes por leucócitos.

As células do sistema imunitário, ao fagocitarem as bactérias, vão produzir oxigénio reactivo e azoto. Este *stress* oxidativo pode influenciar a reprodução de várias maneiras. Os espermatozóides que foram expostos, *in vitro*, a *stress* oxidativo, sofrem uma redução da motilidade e os oócitos por eles fertilizados têm menor probabilidade de clivarem e, desta forma, menor probabilidade de atingirem o estágio de blastocisto (Gilbert, 2012).

2.4.3.4. Técnicas de diagnóstico

Nos bovinos, os métodos de avaliação do processo inflamatório do endométrio incluem exame histológico, citologia, ecografia e exame bacteriológico (Barański et al., 2012; Couto et al., 2013).

Sheldon et al. (2006) referiram que é difícil estimar a sensibilidade e a especificidade dos diferentes métodos de diagnóstico da endometrite subclínica, sendo assim difícil encontrar um método *gold standard*. Um processo alternativo é a análise da performance reprodutiva, avaliada pelo diagnóstico de gestação aos 120 dias. Contudo, esta estratégia nunca alcança os 100% de sensibilidade porque existem vários factores que levam à infertilidade (Meira Jr et al., 2012).

Embora a biópsia endometrial seja a ferramenta de diagnóstico mais fiável e definitiva, é reconhecida como sendo monetariamente não praticável e, demasiado morosa, se utilizada com o objectivo de melhorar a fertilidade futura numa exploração de leite (Gilbert et al., 2005). Métodos menos invasivos para avaliar a inflamação do endométrio incluem lavagem uterina e citologia 'cytobrush', que são bastante bem aceites, hoje em dia (Barlund et al., 2008).

2.4.3.4.1. Ecografia

A primeira descrição de uma gestação observada por ecografia em tempo real foi feita por Chaffeux et al. (1982) e, mais tarde, Pierson & Ginther (1984) mostraram imagens de estruturas ováricas em novilhas superovuladas. A ecografia transrectal tem melhorado significativamente a nossa capacidade para avaliar o aparelho reprodutor nos bovinos (Perez-Marin et al., 2012).

Na avaliação reprodutiva destes animais é utilizada frequentemente uma sonda linear especialmente desenhada para uso transrectal. As frequências de 5,0 e 7,5 MHz (megahertz) são as mais utilizadas no exame ginecológico da fêmea bovina, sendo que a frequência de 5,0 MHz atinge uma maior profundidade, mas resulta em menor detalhe na imagem. A frequência de 7,5 MHz resulta numa menor penetração, mas tem um maior detalhe de imagem (Azawi, 2008).

Sheldon et al. (2006) afirmaram ser o exame ecográfico um método objectivo, não invasivo, prático e exacto. Souza et al. (2011) e Meira Jr. et al. (2012) estão de acordo com este ponto de vista, quando referem que a avaliação do aparelho reprodutivo por esta técnica fornece resultados em tempo real e medições exactas.

A acumulação de fluído intrauterino tem sido referido como estando associado a crescimento bacteriano e atraso na involução uterina. Os PMNs são as células inflamatórias predominantes nesse fluído (Mateus et al., 2002a; Kasimanickam et al., 2004).

Concluindo, a avaliação do conteúdo uterino por ecografia transrectal, depois das 3 semanas pós-parto é uma opção de diagnóstico de boa sensibilidade (Mateus et al., 2002a; Kasimanickam et al., 2004; Barlund et al., 2008; Meira Jr et al., 2012). Contudo, a ecografia, só por si, não é específica o suficiente para identificar correctamente um animal com endometrite subclínica, pois o conteúdo intrauterino, que é o indicador principal desta técnica de diagnóstico, não está presente em todas as fêmeas afectadas (Barański et al., 2012).

Souza et al. (2011) desenvolveram um estudo em que relacionaram a espessura do endométrio avaliada por ecografia com a performance reprodutiva de vacas de alta produção e, concluíram que esta observação, na altura do cio, era um bom indicador da probabilidade de gestação.

2.4.3.4.2. Citologia endometrial

A citologia do endométrio é considerada o método de referência para o diagnóstico da endometrite subclínica, devido à qualidade da amostra e da repetibilidade do teste. Contudo, não é um método prático, pois requer material especializado, perícia na técnica e análises laboratoriais (Couto et al., 2013).

A presença de neutrófilos no lúmen uterino é um ótimo indicador de um processo inflamatório activo. Esta relação entre a resposta celular e a inflamação activa é a base de um exame citológico do útero (Azawi, 2008).

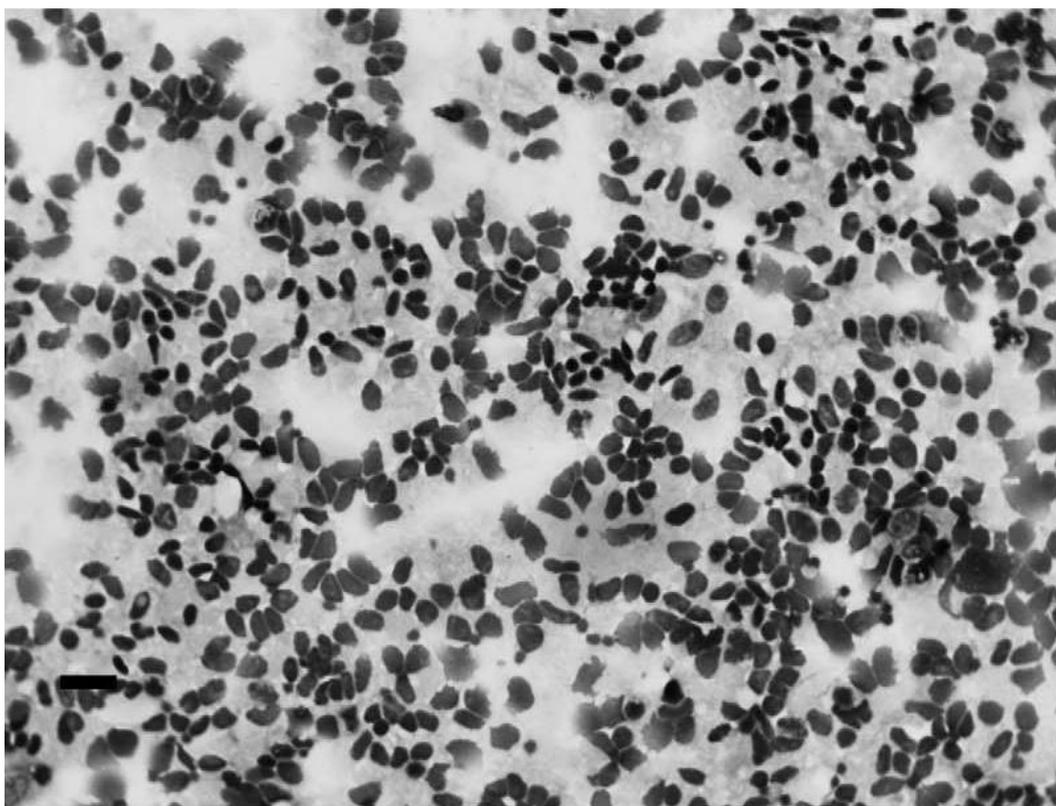
Células endometriais e inflamatórias podem ser recolhidas através de zaragatoa, lavagem uterina ou pela técnica do “cytobrush”. Se não forem visualizadas células epiteliais, não há segurança quanto à qualidade da amostra (Azawi, 2008; Marques Júnior et al., 2011).

A técnica de “cytobrush” é um processo mais consistente e fiável de colheita de células inflamatórias, em relação às lavagens uterinas (Madoz et al., 2013). Estas requerem mais tempo para a obtenção das amostras, têm uma taxa de 17% de insucesso e revelam um maior número de células danificadas (Barlund et al., 2008). Para além disso, a amostra quando recolhida por lavagem uterina, é muito reduzida (2-5 mL) e desta forma, antes de se fazer a coloração, tem que se fazer uma ressuspensão, seguida de centrifugação e, só depois, é feito o esfregaço. A coloração é feita em ambas as técnicas com corante Giemsa (Földi et al., 2006). Depois de corada, a amostra é avaliada microscopicamente para determinar o rácio PMN's em relação às células epiteliais (Barański et al., 2012).

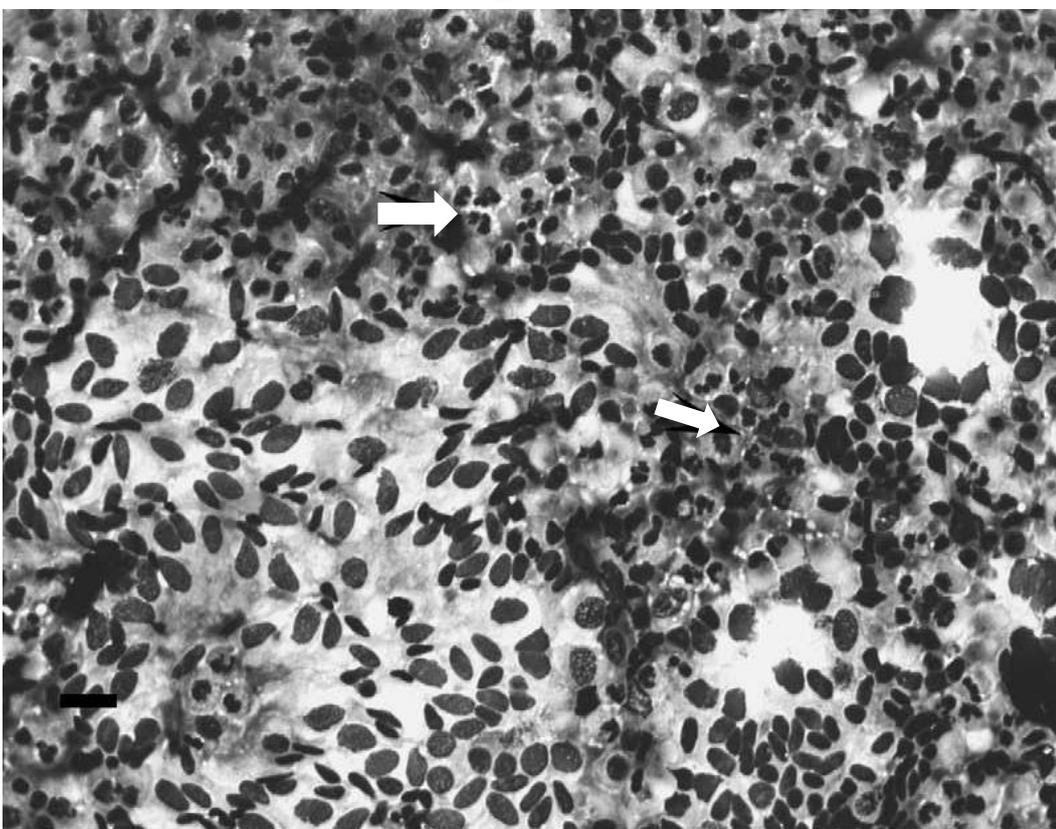
No estudo realizado por Kasimanickam et al. (2004), o limite da percentagem de PMN's utilizando a citologia endometrial foi de 18% entre 20-33 DEL e 10% entre 34-47 DEL. Porém, Gilbert et al. (2005) referiram que >5% já seria um valor crítico para uma resposta inflamatória do endométrio, entre os 40 e 60 dias pós-parto. Daí, terem Kasimanickam et al. (2004) sugerido que a citologia endometrial poderia ser usada com sucesso em diferentes alturas do pós-parto, desde que o limite da percentagem de PMN, para definir a endometrite subclínica, fosse ajustado ao período temporal.

As Figuras 4 e 5 representam imagens microscópicas de citologia do endométrio, onde se podem observar as diferentes células que aí podemos encontrar.

Figura 4. Observação microscópica de citologia do conteúdo uterino recolhido por lavagem uterina. Retirado de Sheldon et al. (2006).



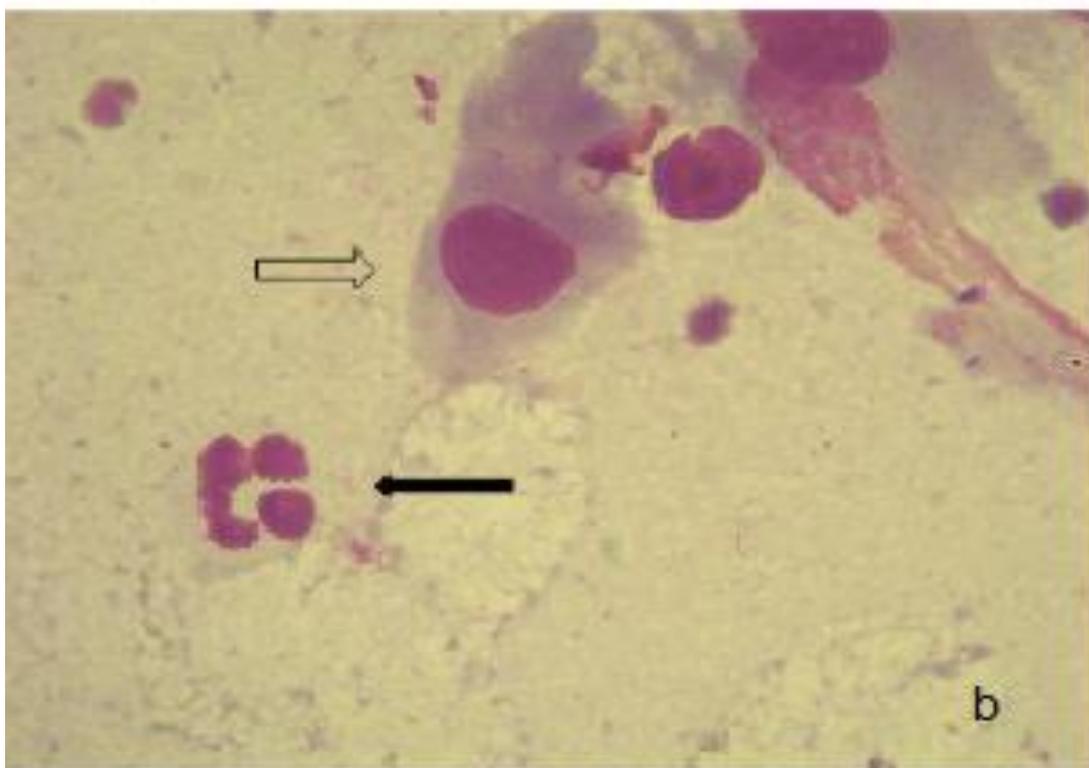
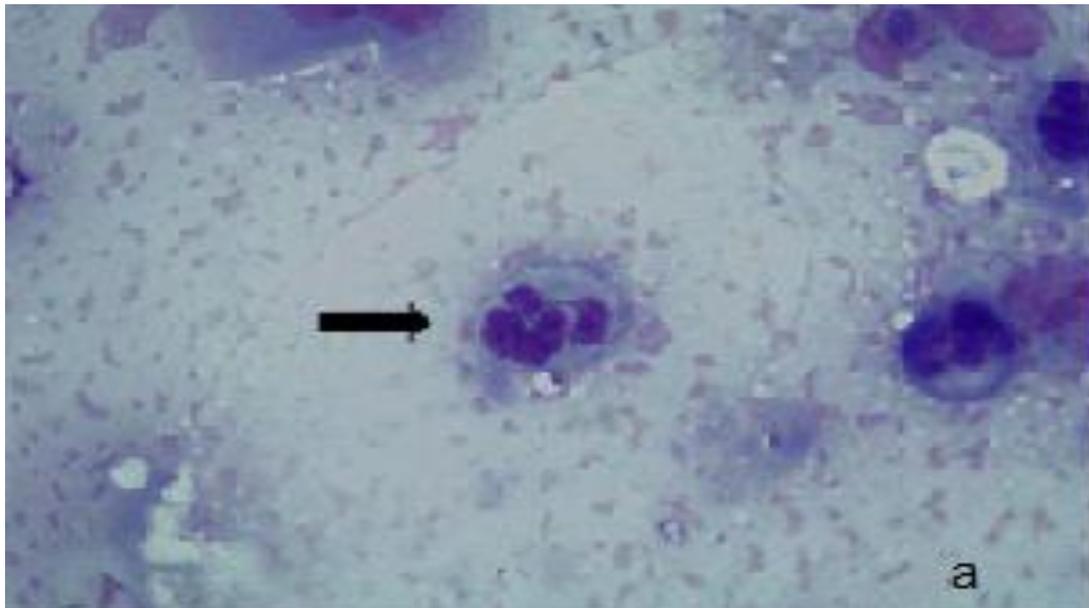
a



b

Legenda: a. Citologia de um endométrio normal; b. Citologia de um endométrio com inflamação, com infiltração de células polimorfonuclear neutrófilos (setas) entre as células epiteliais (escala = 15 μ m).

Figura 5. Aspecto das células encontradas na citologia endometrial. Retirado de Meira Júnior (2010)



Legenda: em (a) podemos observar uma célula polimorfonuclear neutrófila (seta). Em (b) observamos duas células: uma célula epitelial (seta vazia) e uma célula polimorfonuclear neutrófila (seta cheia).

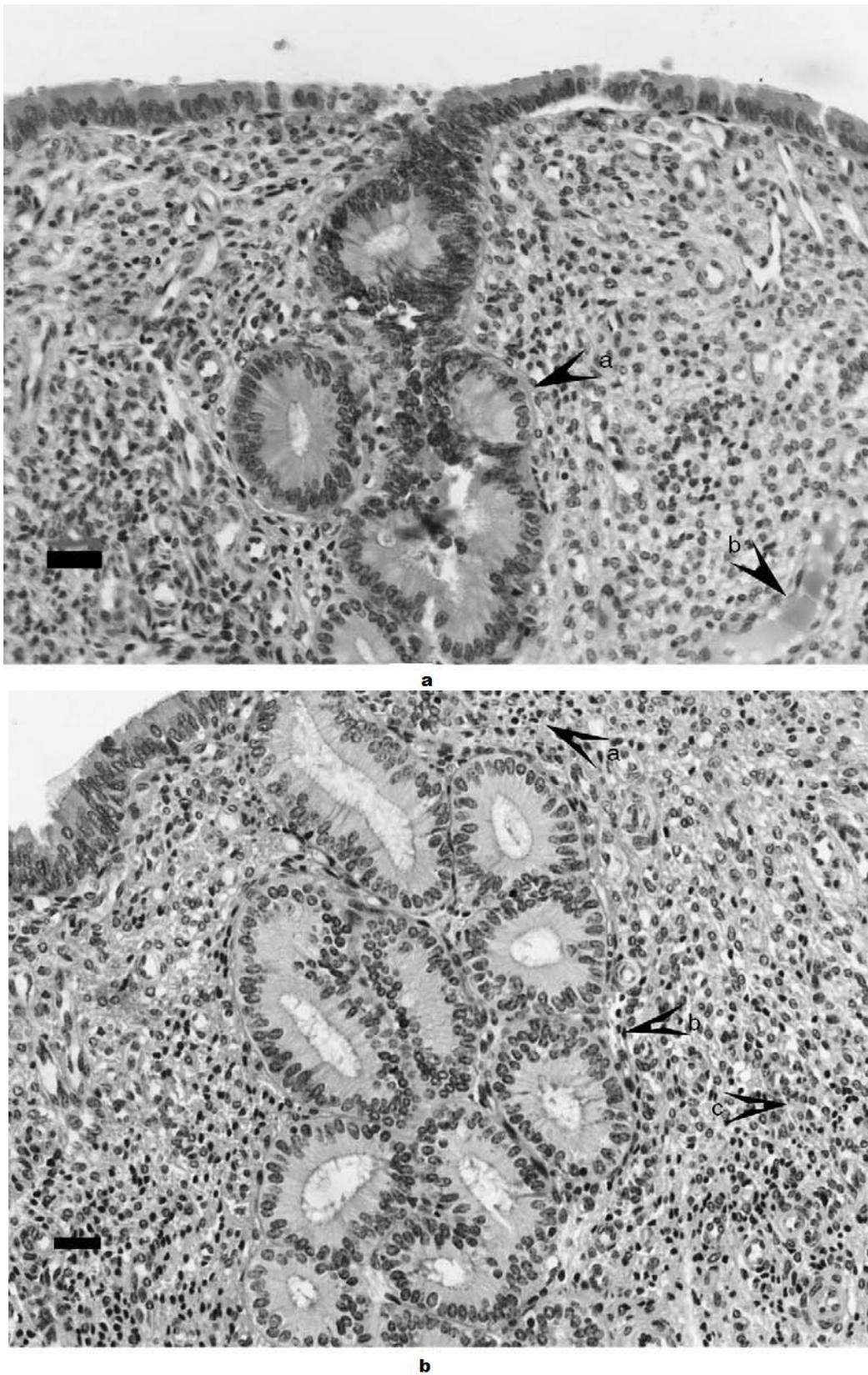
2.4.3.4.3. Biópsia endometrial

A biópsia uterina permite uma análise morfológica do endométrio. Trata-se de uma técnica cujos resultados podem ser correlacionados com a infertilidade bovina, assumindo que a amostra é representativa de ambos os cornos uterinos (Meira Jr. et al., 2012). Tem sido descrita como uma técnica segura e fiável na avaliação da função e da saúde do útero (Meira Jr. et al., 2012) contudo, é morosa e cara (Barański et al., 2012). Segundo Meira Jr. et al. (2012), as amostras colhidas numa biópsia devem ter aproximadamente 5 mm de comprimento, 2 mm de largura e 2 mm de altura. Após a observação histopatológica, aqueles autores desenvolveram uma escala de somatórios, em que as pontuações finais eram obtidas ao somarem-se quatro pontuações parciais que reflectissem o epitélio superficial, a lâmina própria, as glândulas endometriais e o estado inflamatório vascular (Tabela 3). O valor crítico para o diagnóstico positivo de endometrite subclínica foi de 15 pontos. Com isto, concluíram que a biópsia era uma técnica de diagnóstico útil para a endometrite e que, o exame histopatológico providenciava um conhecimento rico do grau de inflamação e, ainda, alguns outros detalhes lesionais, se porventura presentes. Os mesmos autores referiram também que a biópsia tinha uma sensibilidade de 44% e uma especificidade de 92% para o diagnóstico de endometrite subclínica, usando a citologia como o método *gold standard*, afirmando por isso, tratar-se de um método de diagnóstico bastante específico.

Quando em combinação com os achados microbiológicos, esta metodologia permite um acesso mais fiável ao prognóstico reprodutivo da fêmea (Azawi, 2008). Esta avaliação é influenciada por factores como a inflamação, a fibrose periglandular e a degenerescência quística glandular. A inflamação endometrial é evidenciada pelo aumento do número de células inflamatórias, em focos ou difusas, em várias áreas da lâmina própria. A inflamação aguda contém predominantemente PMNs, enquanto que nas endometrites crónicas há infiltração de linfócitos e de macrófagos. A fibrose ocorre mais frequentemente junto à glândula e parece ser causada pela lesão inflamatória desta. A fibrose periglandular pode afectar a função glandular que suporta a sobrevivência do embrião e, desta forma, ser causa de morte embrionária precoce.

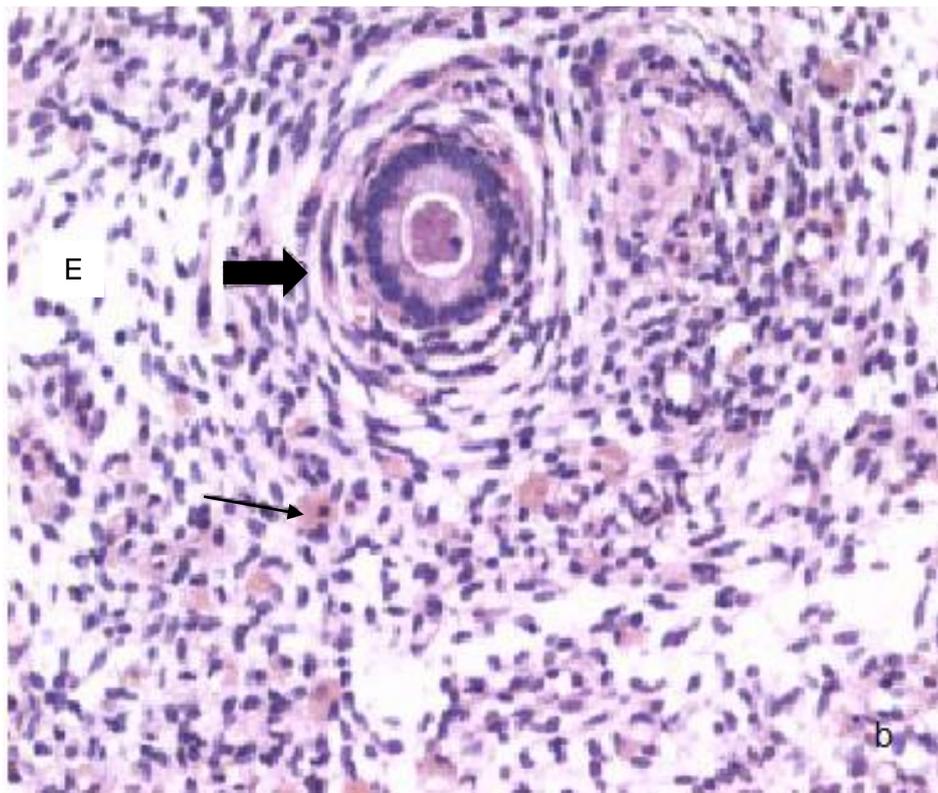
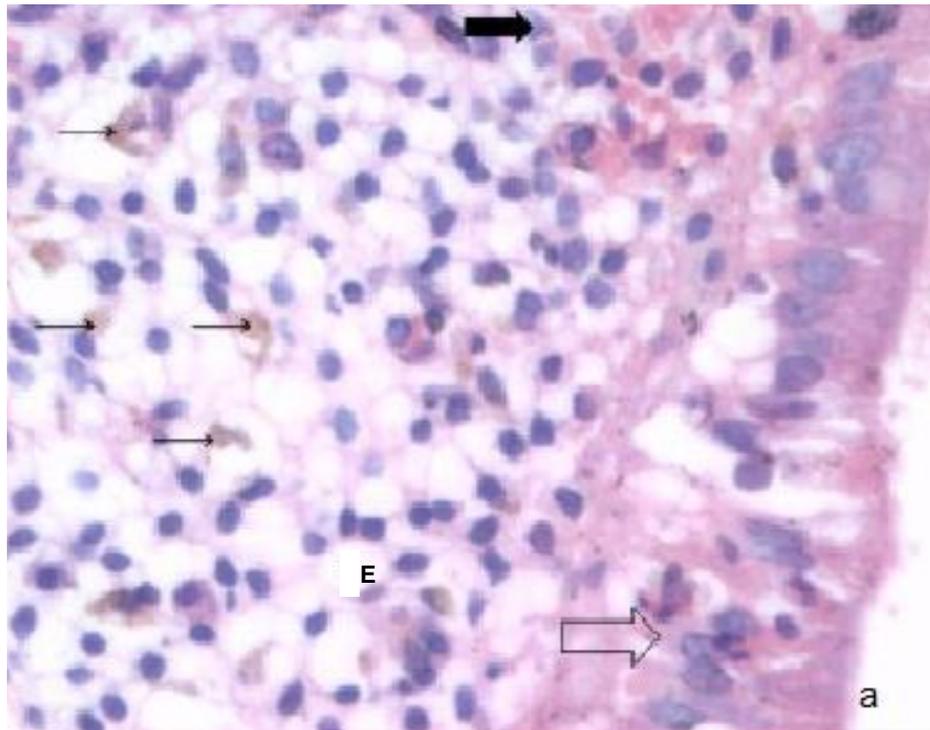
Nas Figuras 6 e 7 estão representadas imagens microscópicas de secções histológicas de biópsia do endométrio, onde estão indicadas algumas células que aí podem ser encontradas.

Figura 6. Secção histológica de biópsia do endométrio. Retirado de Sheldon et al. (2006).



Legenda: a. Biópsia endometrial de tecido normal, com glândula endometrial (seta a) e vaso sanguíneo (seta b); b. Biópsia endometrial de tecido com inflamação, onde se pode observar a infiltração de células polimorfonuclear neutrófilos (seta a), alguma fibrose periglandular (seta b) e um aumento da densidade celular devido à infiltração celular (seta c). (escala = 15 μ m).

Figura 7. Observação de detalhe histológico de útero de bovino. Retirado de Meira Júnior (2010)



Legenda: a- no epitélio, de padrão cilíndrico, há migração intra-epitelial de neutrófilos e linfócitos (seta vazia); no estroma há presença de edema (E); hemorragia (seta cheia) e macrófagos com pigmento, hemossiderina (flechas). Ampliação 10x; b- pode observar-se infiltração de células inflamatórias, presença de edema (E); hemossiderina (flecha) e três camadas de fibroblastos (seta cheia) em redor da glândula endometrial, caracterizando a situação de fibrose periglandular. Ampliação 20x.

Tabela 3. Critério de diagnóstico da endometrite subclínica baseado no exame histopatológico. Adaptado de Meira Jr. et al. (2012).

Variável	Categoria	Pontuação (intervalo)
Epitélio		Pontuação (1-11)
Altura	Cilíndrico	1
	Cuboidal	2
	Achatado	3
Lesão epitelial	Ausente	0
	Leve	1
	Moderada	2
Tipo de células inflamatórias	Úlcera	3
	Ausente	0
	Mononuclear	1
Intensidade da infiltração	Polimorfonuclear	2
	Ausente	0
	Leve (≤ 5 células/campo; x40)	1
	Moderada (6-10 células/campo; x40)	2
	Grave (>10 células/campo; x40)	3
Lâmina Própria		Pontuação (0-8)
Tipo de células inflamatórias	Ausente	0
	Mononuclear	1
	Polimorfonuclear	2
Intensidade da infiltração	Normal (≤ 20 células/campo; x40)	0
	Leve (21-40 células/campo; x40)	1
	Moderada (41-70 células/campo; x40)	2
	Grave (>70 células/campo; x40)	3
Agregados de linfócitos	Ausente	0
	Leve (≤ 3 agregados/campo; x10)	1
	Moderado (4-5 agregados/campo; x10)	2
	Grave (≥ 6 agregados/campo; x10)	3
Glândula endometrial		Pontuação (0-4)
Atrofia ou dilatação	Ausente	0
	Presente	1
Fibrose	Ausente	0
	Leve (1-3 camadas/campo; x40)	1
	Moderada (4-5 camadas/campo; x40)	2
	Grave (≥ 6 camadas/campo; x40)	3
Vascular		Pontuação (0-3)
Degenerescência dos vasos	Ausente	0
	Presente	1
Hemorragia	Ausente	0
	Presente	1
Hemossiderófagos	Ausente	0
	Presente	1
Total		Pontuação (1-26)

2.4.3.4.4. Esterase leucocitária

Um método alternativo que permite um acesso a células inflamatórias no lúmen do útero é o teste da esterase leucocitária (EL). A EL é libertada pelas células neutrófilas e reage com o indoxil num reagente de éster de ácido carbónico. A reacção da esterase com o sal diazônio liberta o indoxil que é oxidado dando origem a uma cor violeta. A intensidade da cor está relacionada com a contagem leucocitária (de acordo com as instruções do fabricante). Este método tem sido usado para diagnósticos rápidos de inflamação em vários fluidos corporais, incluindo urina, líquido peritoneal, líquido pleural e cerebrospinal e, pode ser usado como método indirecto para detectar neutrófilos no útero bovino (Couto et al., 2013). No estudo realizado por estes autores, os resultados do teste de EL relacionaram-se fortemente com a proporção de neutrófilos encontrados por citologia endometrial, mas não revelaram associação à probabilidade de gestação. É necessário uma melhoria na precisão do teste para que possa ser usado como ferramenta rápida e prática no diagnóstico de endometrite subclínica no pós-parto.

2.4.3.4.5. Cultura bacteriana

Uma cultura bacteriana uterina é uma ferramenta essencial para determinar a etiologia da infecção uterina. A recolha com zaragatoa é o método mais preciso para obter amostras e identificar as bactérias específicas ou não específicas que estão a causar a infecção (Azawi, 2008). No entanto, é um método caro e implica um tempo prolongado para obtenção do diagnóstico (Marques Júnior et al., 2011).

2.4.3.5. Tratamento

O tratamento intrauterino com cefapirina ou a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumenta a taxa de gestação, em casos de endometrite subclínica (LeBlanc, 2008).

Medidas preventivas devem ser postas em prática de forma a diminuir a sua incidência na exploração. O princípio da prevenção consiste em otimizar a função imunitária no peri-parto, principalmente através do maneio, no sentido de aumentar a capacidade de ingestão, no período de transição (LeBlanc, 2008). Um BEN excessivo, com altas concentrações de NEFA e de β -hidroxibutirato em circulação, pode contribuir para a redução da função neutrófila e é a este nível que se deve actuar (LeBlanc et al., 2011). Na Tabela 4 são propostas algumas práticas de maneio recomendáveis durante o período do peri-parto de vacas de leite que poderão contribuir para a redução da incidência das doenças no pós-parto.

Tabela 4. Práticas de manejo para reduzir os riscos de doença uterina no pós-parto.

Adaptado de LeBlanc et al. (2011).

Recomendações
Evitar o consumo de dietas excessivamente energéticas entre a 8ª e a 3ª semana pré-parto.
Garantir o acesso livre à alimentação (todos os animais devem ser capazes de comer no momento da distribuição da alimentação; por exemplo, 75 cm de largura de espaço por vaca ou 5 “cornadis” para 4 vacas).
Proporcionar espaço para as vacas poderem estar deitadas aproximadamente 12h/dia (por exemplo, ≥ 1 lojete/vaca ou 10 m ² de cama livre por vaca).
Minimizar as deslocções e mudanças no grupo social.
Construir parques para aproximadamente 140% da média do número de partos esperada por mês.
Proporcionar redução de calor (ventiladores e aspersores) quando o índice temperatura-humidade excede os 72.
Gerir o manejo nutricional de forma as vacas parirem com uma CC de 3,0 ou 3,25 e mantê-la num mínimo de 2,5 (numa escala de 5 pontos).
Testes serológicos ou plasmáticos:
NEFA <0,5 mMol/L na semana anterior à data esperada do parto
β -hidroxibutirato <1,1 mMol/L na primeira semana e <1,4 na segunda semana, depois do parto
Haptoglobina <0,8 g/L na primeira semana depois do parto

2.4.4. Piómetra

A piómetra pode ocorrer em qualquer fase do puerpério e define-se como uma retenção de conteúdo purulento ou mucopurulento no útero, com o cérvix fechado devido à presença de um corpo lúteo (Sheldon et al., 2006; Sheldon et al., 2008b; Marques Júnior et al., 2011).

Na maioria dos casos, a piómetra ocorre como sequela da endometrite crónica quando, como resultado da inflamação, o útero cessa a produção da hormona luteolítica. O corpo lúteo persiste e, como o útero continua sob a influência de progesterona, a infecção não é eliminada. O cérvix mantém-se fechado e o conteúdo purulento acumula-se no lúmen uterino, embora, por vezes, haja ligeira eliminação do mesmo. A morte do feto seguida de invasão do útero por *T. pyogenes* e persistência do corpo lúteo grávidico ou a contaminação do útero durante o diestro, como por exemplo, por IA pouco higiénica, são outras causas que podem provocar piómetra, mas não são tão frequentes como a primeira (Noakes et al., 2001a).

O diagnóstico da piómetra é realizado por palpação rectal e/ou ecografia transrectal, com base nos sinais bem definidos de um útero de grandes dimensões, elevado volume do seu conteúdo, cérvix fechado e um CL activo (Földi et al., 2006). As vacas acometidas não apresentam sinais de doença, no entanto revelam anestro (Sheldon et al., 2008a). O melhor e mais apropriado tratamento consiste em induzir luteólise com $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou seus análogos (Sheldon et al., 2008b; Marques Júnior et al., 2011). Neste cenário, a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$, em geral, resulta na dilatação do cérvix e expulsão do conteúdo purulento do útero, com manifestações do cio, três a cinco dias mais tarde (Sheldon et al., 2008a; Baruselli, sem data). Há evidência de que o tratamento é mais eficiente quando se administram duas doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$, com um intervalo de oito horas (Sheldon et al., 2008a).

Muitas vacas que tiveram piómetra ficam gestantes, apesar da fase lútea prolongada. No entanto, os casos de longa duração estão associados à degenerescência endometrial, que pode aumentar a taxa de morte embrionária (M.E.; Sheldon et al., 2008a).

3. SÍNDROME DA VACA REPETIDORA

3.1. Importância da vaca repetidora na produção leiteira

Para se estabelecer uma indústria leiteira sustentável é importante que os animais fiquem gestantes em tempo biologicamente ótimo e num período economicamente rentável, depois do parto (Sakaguchi, 2011). No geral, um intervalo entre partos de 12 a 13 meses é considerado economicamente sustentável (Inchaisri, Jorritsma, Vos, van der Weijden & Hogeveen, 2011).

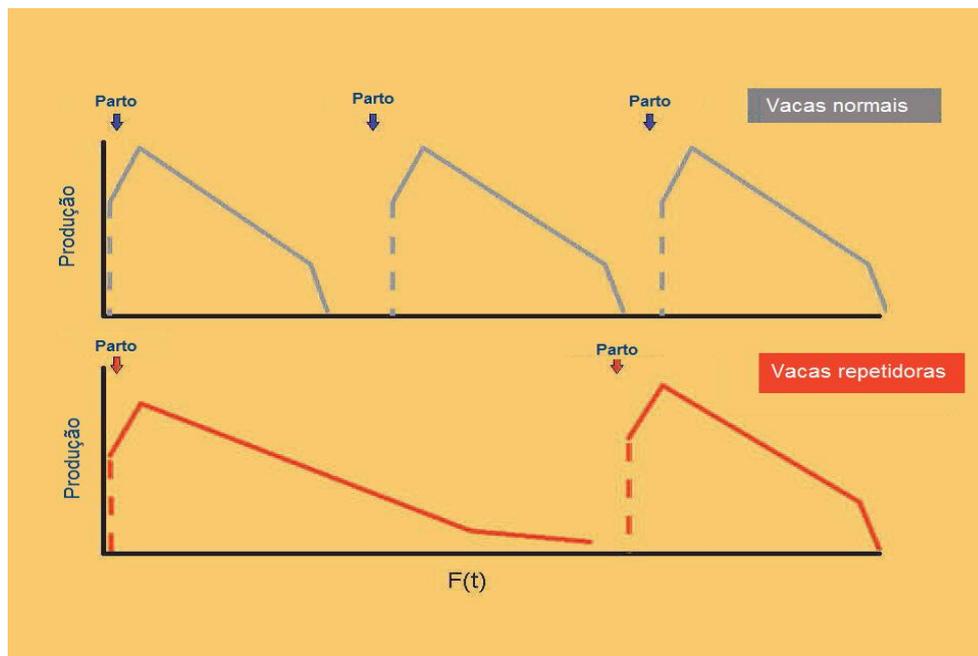
Nos últimos 50 anos, a seleção intensiva para a produção de leite tem sido associada a um declínio global na fertilidade das vacas (Evans & Walsh, 2012). A demanda imposta pela lactação interage com factores genéticos que promovem um maior efeito negativo no moderno sistema de produção de bovinos leiteiros (Vieira, 2011). Vacas com maior produção de leite têm assim uma maior incidência de infertilidade (Sakaguchi, 2011). Neste contexto, aparece a vaca repetidora, que compreende um grupo heterogêneo de vacas subfêrteis, sem anomalias anatómicas ou infecções clínicas, que exibem uma variedade de desequilíbrios reprodutivos, num padrão constante, durante três ou mais ciclos éstricos consecutivos, de duração normal (17-25 dias). Estes desequilíbrios podem afectar o comportamento de cio, o padrão hormonal ou a dinâmica ovárica, que em sincronia com a função uterina, determinam o resultado final da monta natural ou da inseminação artificial (Perez-Marin et al., 2012). A vaca repetidora é, assim, caracterizada por baixa taxa de fertilização e morte embrionária precoce (Ferreira et al., 2011).

Este desequilíbrio reprodutivo leva a grandes perdas económicas para o produtor de leite devido ao aumento do intervalo entre partos, maior número de inseminações (custos do sêmen e da inseminação), aumento do refugo e gastos com a substituição dos animais (Son et al., 2007; Ferreira et al., 2011; Mellado et al., 2012).

Em explorações leiteiras com uma fertilidade adequada, onde as taxas de concepção são normalmente de 50-55%, cerca de 14-24% das fêmeas apresentam a síndrome da vaca repetidora (Mellado et al., 2012).

Considerando as grandes exigências da produção de leite, esta síndrome revela um impacto de grande monta na economia da exploração (Fig. 8; Perez-Marin, 2012).

Figura 8. Evolução da curva de lactação em vacas normais e repetidoras. Notar que as vacas repetidoras têm menos partos e, desta forma, a produção de leite é menor. Adaptado de Perez-Marin et al. (2012).



3.2. Etiologia da síndrome da vaca repetidora

A etiologia não é clara e é multifatorial (Ferreira et al., 2011; Perez-Marin et al., 2012). A fêmea, o touro e vários factores ambientais e de manejo estão envolvidos. Todos eles, por vezes, sobrepostos, o que torna difícil determinar a origem da síndrome (Perez-Marin et al., 2012).

3.2.1. Factores maternos

3.2.1.1. Idade

A idade tem um impacto negativo na fertilidade e grande incidência de vacas repetidoras têm sido registada em animais velhos. Isto deve-se principalmente a alterações dos níveis hormonais hipotalâmicos ou hipofisários ou à incapacidade de resposta ovárica. Também foi demonstrado a relação entre a idade e a baixa viabilidade dos oócitos, o que também pode explicar este declínio da fertilidade. Esta, nas vacas de leite, aumenta após o 1^o-2^o parto e diminui a partir do 4^o-5^o parto. Porém, devem ter-se em conta o tempo necessário para a involução uterina ou os problemas associados ao puerpério (Perez-Marin et al., 2012).

3.2.1.2. Factores genéticos

O mérito genético, bem como as anomalias genéticas e dos cromossomas dos pais ou os defeitos genéticos que possam ocorrer no processo de diferenciação, podem comprometer a fertilidade (Diskin, Parr & Morris, 2012). A síndrome da vaca repetidora tem sido descrita em animais com translocação 1/29 ou trissomia do cromossoma X (Ayalon, 1984). Diskin et al. (2012) referiram que a translocação Robertsoniana (1/29) nos bovinos reduzia a fertilidade quando estes eram heterozigóticos para a condição. Poucos embriões (menos de 10%) exibem alterações genéticas que estão, normalmente, associadas à consanguinidade ou a gâmetas envelhecidos (Diskin et al., 2012; Perez-Marin et al., 2012).

A utilização de sémen de touros com elevado índice para dificuldade de partos pode ser considerado um factor genético para a ocorrência desta síndrome. A probabilidade de ocorrer parto distócico nestes casos é superior e, da mesma forma, a probabilidade de doença pós-parto e, conseqüentemente, a infertilidade também aumenta (Perez-Marin et al., 2012).

3.2.1.3. Infecções uterinas

O ambiente uterino durante o puerpério é um dos principais factores que influenciam a fertilidade das vacas e assim, a ocorrência de infecções uterinas compromete a eficiência reprodutiva (Marques Júnior et al., 2011).

Desta forma, qualquer alteração da saúde uterina pode induzir a síndrome da vaca repetidora (Perez-Marin et al., 2012). As infecções uterinas (específicas ou não específicas) constituem um obstáculo ao estabelecimento de uma nova gestação (Evans & Walsh, 2012), ao atrasarem a involução uterina e do cérvix, ao alterarem o desenvolvimento folicular e ao aumentarem a mortalidade embrionária e a taxa de retorno ao cio (Perez-Marin et al., 2012). A endometrite subclínica deve ser considerada quando há insucesso na gestação ou quando é registada uma repetição dos cios. Contudo, os sinais clínicos são difíceis de detectar, pois o exame por palpação transrectal e a análise bacteriológica do muco cervical não reflectem, na íntegra, a situação do endométrio (Kasimanickam et al., 2004; Barański et al., 2012; Perez-Marin et al., 2012).

3.2.1.4. Defeitos anatómicos do aparelho reprodutor

O aparelho reprodutor de uma fêmea bovina deve fornecer um ambiente propício à maturação do oócito, assim como ao transporte dos espermatozóides, fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário e fetal. Alterações anatómicas ou funcionais destas estruturas podem levar ao insucesso da gestação e à infertilidade (Perez-Marin et al., 2012).

Alterações no oviducto estão presentes em 6-15% de animais adultos e, podem atingir os 80% nas fêmeas com história de infertilidade. Aderências entre o ovário, a trompa de Falópio e a bursa ovárica, obstruções unilaterais ou bilaterais, hidrossalpingite ou inflamação

(perissalpingite, peritonite) têm sido descritas na síndrome da vaca repetidora (Perez-Marin et al., 2012).

O cérvix é uma barreira e um reservatório dos espermatozóides. Traumatismos com esta localização podem levar a estenose ou obstrução, prolapso dos anéis cervicais, aderências ou incompetência funcional que podem ser associados à repetição dosaios (Sheldon et al., 2008a; Perez-Marin et al., 2012).

A vagina actua como um receptáculo do sémen e como barreira defensiva. Patologias de carácter infeccioso alteram o pH vaginal assim como a flora bacteriana, reduzindo a vitalidade dos espermatozóides (após cópula). Anomalias congénitas, defeitos de conformação (urovagina ou pneumovagina) e infecções (vaginite) podem perturbar a função reprodutiva normal (Zobel et al., 2001; Sheldon et al., 2008; Perez-Marin et al., 2012).

3.2.1.5. Disfunções hormonais

Um CL hipofuncional provoca uma diminuição dos níveis de progesterona e afecta negativamente a fertilidade. Estes CL são pequenos e pouco desenvolvidos, com menor capacidade de produção de progesterona e, desta forma, o ambiente uterino disponível é inadequado para iniciar/manter uma gestação, o que pode aumentar a taxa de morte embrionária. Uma deficiente curva pós-ovulatória de progesterona também está relacionada com uma menor produção do interferão-tau pelo embrião bovino (Marques et al., 2007; Perez-Marin et al., 2012). Há evidência de que uma suplementação progesterónica, em vacas em risco de ter uma menor taxa de sobrevivência embrionária por insuficiência de progesterona, melhora essa mesma taxa (Diskin et al., 2012).

Por outro lado, um nível suprabasal de progesterona, perto do estro, está associado a uma regressão incompleta do CL, o que prolonga o crescimento folicular e compromete a competência oocitária.

Estão descritas ovulações irregulares, quando há assincronia entre o cio e a ovulação ou assincronia entre o pico de LH e a ovulação ou ainda, ausência da ocorrência do pico de LH. Nestes casos, os sinais de cio são menos óbvios que em fêmeas normais (Perez-Marin et al., 2012).

3.2.1.6. Morte embrionária precoce (MEP)

Para que se estabeleça uma gestação é necessário que haja uma inter-relação entre o embrião e o útero, dependente de uma comunicação activa e passiva entre ambos, indispensável para que o embrião se implante e possa ser nutrido e ainda, que seja bloqueada a regressão do corpo lúteo (Vieira, 2011). O embrião bovino liberta para o útero uma substância produzida pelas células mononucleares da trofoectoderme (interferão-tau; Thatcher et al., 2001; Marques et al., 2007), por volta do 16^o-18^o dia, que inibe a regressão do CL e mantém a gestação, processo denominado de reconhecimento materno da gestação

(RMG; Vieira, 2011). O mecanismo pelo qual o interferão-tau inibe a regressão do CL resulta da supressão da libertação pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial. Sabe-se que o interferão-tau produzido pelo embrião actua de forma parácrina no tecido materno suprimindo a transcrição de genes para receptores de ocitocina e de estradiol (Thatcher et al., 2001; Marques et al., 2007).

A MEP pode estar associada a perfis de LH e de progesterona irregulares que induzem a regressão do CL, a uma quebra da competência gamética, a alterações uterinas, a desequilíbrios hormonais ou ainda, a alterações do sistema imunitário, que resultam em contaminação bacteriana com processo inflamatório (Vieira 2011; Perez-Marin et al., 2012). Uma falha no mecanismo antiluteolítico por acção do interferão-tau segregado pelo embrião, uma reacção inadequada do endométrio ao interferão-tau no período do RMG ou ainda, uma falha na interacção embrião-mãe, que requer a participação de um número de citocinas envolvidas no processo da implantação, podem também ser responsáveis pela morte do embrião (Vieira, 2011).

A MEP ocorre entre o 8º e o 16º e a vaca retorna ao estro no período fisiológico do ciclo (Vieira, 2011). A incidência deste tipo de morte embrionária varia entre 10,6 a 39,7%, segundo Perez-Marin et al. (2012).

Alguns estudos sugerem que o ambiente uterino é o factor mais importante na MEP e referem desequilíbrios nas concentrações de certos iões e proteínas no útero (Perez-Marin et al., 2012). Durante a fase de pré-implantação, o crescimento embrionário está dependente do suplemento nutricional das secreções das glândulas uterinas e transporte selectivo dos nutrientes para o lúmen uterino. Uma suplementação insuficiente de aminoácidos, essenciais ou não-essenciais, resulta numa alteração do desenvolvimento embrionário. A redução da viabilidade do embrião pode também estar relacionada com a redução da capacidade de troca de nutrientes ou de outras substâncias reguladoras, que podem comprometer o processo de diferenciação celular (Groebner et al., 2011).

Níveis inadequados de estrogénio e interacções anormais das gonadotrofinas prejudicam a maturação do oócito, o que resulta também, num desenvolvimento embrionário anormal (Perez-Marin et al., 2012).

3.2.1.7. Nutrição

O metabolismo basal, a actividade física, o crescimento e a manutenção das reservas corporais têm prioridade sobre a reprodução (actividade cíclica do ovário, estabelecimento e manutenção da gestação; Freitas, 2002). A deficiência nutricional e o aumento do número de IA por vaca estão então, interrelacionados, devido à diminuição da ingestão, do peso e da condição corporal que causam desequilíbrios endócrinos e afectam a fertilidade (LeBlanc et al., 2011; Perez-Marin et al., 2012). Também pode alterar a composição nutricional do conteúdo uterino (Groebner et al., 2011).

Durante o pós-parto, os animais atravessam um período de balanço energético negativo, mudanças metabólicas, endócrinas e fisiológicas e aumento do stress oxidativo. Associando-se ao stress provocado pelo parto, todas estas alterações comprometem a resposta imunitária e inflamatória (Evans & Walsh, 2012). Esta deficiência nutricional também afecta o período pós-parto, causando atraso na involução uterina e aumento do número dos dias em aberto (Perez-Marin et al., 2012). A diminuição da capacidade de ingestão e o BEN levam igualmente a uma diminuição da actividade hormonal, que tem como resultado a diminuição da duração e da intensidade dosaios (Departamento técnico-comercial Vitas Portugal, 2013).

É importante maximizar a ingestão dos alimentos e minimizar o BEN no pós-parto, de forma a permitir elevadas taxas de sobrevivência embrionária (Diskin et al., 2012). As consequências fisiológicas do BEN são perda de condição corporal, mobilização das reservas corporais, baixa concentração de glucose, insulina, IGF-I (que podem afectar a secreção de GnRH e gonadotrofinas; Freitas, 2002) e colesterol, em circulação e, elevadas concentrações de ácidos gordos e ureia. Estas alterações estão associadas ao aumento do risco de doenças metabólicas, redução da função imunitária e diminuição da fertilidade (Evans & Walsh, 2012). Os níveis de nutrição afectam a concentração de progesterona. Isto sugere que a nutrição, a condição corporal e a concentração de progesterona plasmática estão relacionadas e afectam a fertilidade (Ayalon, 1984). As vacas repetidoras têm revelado igualmente, baixas concentrações uterinas de sódio, fósforo, glucose e proteínas totais, nos dias 5 a 11 pós-parto (Ayalon, 1984).

3.2.2. Factores relacionados com o touro e qualidade do sémen

É necessário que a fertilidade do touro/qualidade do sémen seja óptima (por monta natural ou IA) para se atingir uma elevada taxa de gestação e um intervalo entre partos adequado (Ayalon, 1984; Diskin et al., 2012). As doses de sémen para AI devem conter pelo menos 6 milhões de espermatozóides com motilidade progressiva após a descongelação (Perez-Marin et al., 2012). O sémen é depositado na vagina pelo touro ou colocado correctamente no corpo do útero pelo inseminador (Diskin et al., 2012) de forma a atingir os oviductos, onde a fertilização ocorre (Perez-Marin et al., 2012). Inseminações incorrectas, como por exemplo, deposição do sémen à entrada do cérvix, pode provocar a repetição dosaios e afectar negativamente a taxa de fertilidade (Perez-Marin et al., 2012).

O momento da deposição do sémen está relacionado com a detecção do cio. Outras fêmeas ou o touro podem montar a vaca em cio e este comportamento pode ter uma duração de 13-17 horas (h) em média e a ovulação irá ocorrer, aproximadamente, 30h após o início do cio. A regra AM/PM de oportunidade da IA é a prática mais comum utilizada na produção leiteira. Consiste em inseminar pela manhã quando o cio foi observado na tarde/noite do dia anterior ou inseminar à tarde/noite quando o cio foi observado nessa manhã (Perez-Marin et al., 2012).

3.2.3. Ambiente e factores relacionados com o manejo

3.2.3.1. Detecção correcta do cio

Uma incorrecta detecção de cios é uma das principais causas da síndrome da vaca repetidora. O insucesso reprodutivo pode ser observado depois de uma inseminação 'fora de tempo' ou em vacas com cio pouco evidente. As vacas gestantes também podem apresentar sinais de cio e serem inseminadas. Este procedimento pode induzir a morte embrio-fetal (Perez-Marin et al., 2012).

3.2.3.2. Higiene durante a inseminação artificial

Durante a inseminação artificial, o catéter é introduzido no corpo do útero e pode actuar como veículo de bactérias patogénicas, alterar o ambiente uterino e provocar doenças infecciosas agudas, subagudas ou crónicas com efeitos nocivos para a reprodução. É essencial actuar de forma higiénica durante a IA e ter um cuidado redobrado nas medidas de higiene durante o parto e período pós-parto (Perez-Marin et al., 2012).

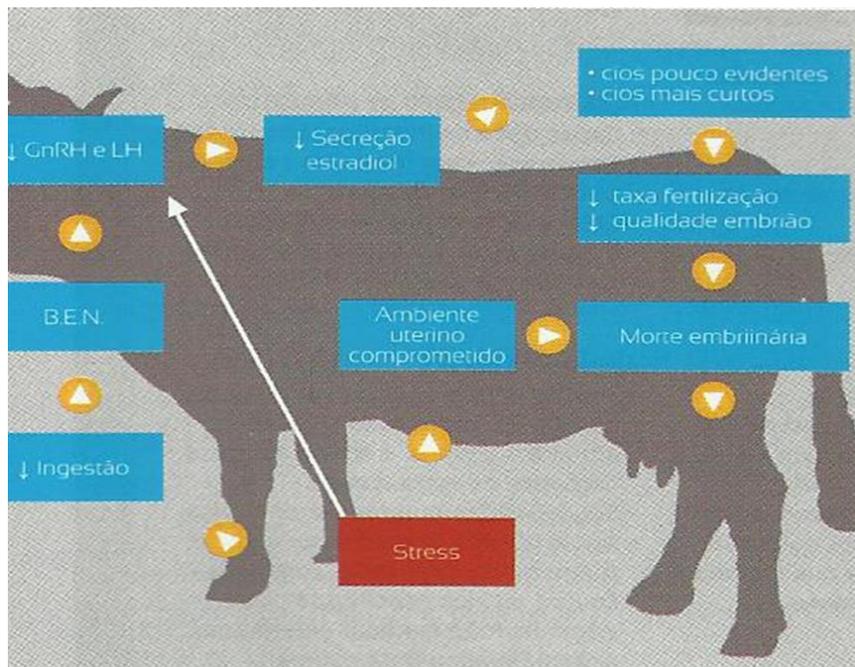
3.2.3.3. Stress

As vacas repetidoras têm uma grande predisposição para estarem stressadas, facto evidenciado pelo aumento da produção de cortisol pelas glândulas supra-renais. A progesterona supra-renal, nas fêmeas sujeitas a situações de *stress*, atinge níveis suprabasais. Desta forma, o *stress* pode ser considerado como um potencial factor causal para a síndrome da vaca repetidora (Perez-Marin et al., 2012).

As temperaturas ambientais elevadas também causam *stress* e trazem problemas reprodutivos. A acidose metabólica que resulta do aumento da frequência respiratória, associada ao aumento dos níveis de amoníaco no sangue, resultante da alteração da fermentação ruminal, vão comprometer o ambiente uterino e assim, aumentar o número de mortes embrionárias (Departamento técnico-comercial Vitas Portugal, 2013).

A hipertermia afecta a função celular em vários tecidos do sistema reprodutivo (Figura 9). O *stress* hipertérmico compromete a dinâmica folicular e a capacidade do folículo dominante em exercer a sua dominância. Para além disso, este tipo de *stress* induz codominância folicular e reduz a duração do ciclo éstrico, bem como a competência do oócito para originar um blastocisto. Oócitos de vacas Holstein, colhidos durante o Verão, mostraram uma reduzida capacidade para se desenvolverem até blastocisto, após fertilização *in vitro*, quando comparados com os recolhidos nos meses de Inverno (Ferreira et al., 2011).

Figura 9. Consequências do *stress* hipertérmico. Retirado de Departamento técnico-comercial Vitas Portugal (2013)



3.3. Técnicas de diagnóstico

É imperioso diagnosticar a etiologia do insucesso reprodutivo em vacas que têm aparentemente uma história clínica normal. Contudo, apesar de estarem disponíveis várias ferramentas para tal, é difícil chegar a um diagnóstico correcto por não ser, muitas vezes, rentável.

Primeiro torna-se necessário obter a história clínica completa a nível individual e da exploração. A idade, o número de partos, a produção leiteira, as doenças, os índices reprodutivos, as características dos ciclos éstricos, o calendário das inseminações, os touros utilizados, a detecção dos cios, as hormonas utilizadas, a alimentação e a higiene da exploração devem ser registados e analisados. O comportamento sexual também deve ser avaliado e é necessário detectar distúrbios a nível muscular e ungular (Perez-Marin et al., 2012).

Para se detectarem alterações ao nível do sistema reprodutor feminino é necessário efectuar inspecção da vagina (manual ou com auxílio de vaginoscópio), de forma a recolher e avaliar o corrimento vaginal (Marques Junior et al., 2011) e verificar a presença de aderências, estruturas anormais ou defeitos cervicais (Perez-Marin et al., 2012). É essencial avaliar todas as estruturas por palpação transrectal ou ecografia, de forma a diagnosticar qualquer alteração a nível do cérvix, útero e ovários e, em último caso, realizar citologia endometrial e/ou cultura bacteriológica do conteúdo uterino para localizar infecções uterinas que possam estar a comprometer a fertilidade do animal (Marques Júnior et al., 2011).

3.4. Tratamento e controlo da síndrome da vaca repetidora de forma a reduzir o impacto negativo na exploração

3.4.1. Tratamento nutricional

A energia é o principal nutriente exigido por bovinos adultos e a sua ingestão inadequada tem um impacto negativo sobre a actividade reprodutiva da fêmea. Uma melhoria do balanço energético através do aumento da ingestão de energia na dieta, reduz os dias até à primeira ovulação e melhora a taxa de concepção (Santos, 2008).

Um suplemento correcto de nutrientes é crucial para a sobrevivência do embrião pré-implantação e para o sucesso da manutenção da gestação (Groebner et al., 2011). Dietas contendo elevadas concentrações de iodo inorgânico, 8-12 dias antes do estro, estimulam a glândula hipofisária, reduzindo ao mesmo tempo, a taxa de vacas repetidoras. Explorações com problemas a este nível ao serem suplementadas com cobre e magnésio minimizaram os problemas de fertilidade. Deficiências nestes minerais podem estar associadas à infertilidade, anemia e supressão imunitária. Deficiências em fósforo e zinco estão relacionadas com baixos níveis de progesterona, que podem causar infertilidade e morte embrionária precoce. Dietas suplementadas com ácidos gordos insaturados aumentam a produção de leite, bem como a taxa de desenvolvimento embrionário, quando administradas nos períodos seco e pós-parto, sendo também benéficas para as vacas repetidoras (Perez-Marin et al., 2012). Estes autores sugerem que a suplementação com fontes lipídicas tem um efeito directo na produção de colesterol (precursor da progesterona), modula o metabolismo do ácido araquidónico (precursor das prostaglandinas) e economiza a glicose, elevando os níveis sanguíneos de IGF-I e, conseqüentemente, a libertação de LH (Vieira, 2011).

3.4.2. Técnicas de reprodução assistida

Está demonstrado que entre 36 a 89% das vacas repetidoras apresentam doença a nível do endométrio, muitas vezes difíceis de detectar (Perez-Marin et al., 2012). O transporte gamético e a implantação anómalos estão associados a alterações a esse nível. A tecnologia da superovulação e transferência de embriões tem-se mostrado eficaz nestas vacas (de mérito genético superior), pois permite um incremento significativo da sua eficiência reprodutiva (Rodrigues et al., 2010). Almeida et al. (1984), citados por Ayalon (1984), na tentativa de responder a questões acerca da transferência de embriões, recolheram embriões de vacas normais e de vacas repetidoras, no dia 6 após inseminação e, demonstraram que não havia diferenças significativas na incidência de embriões normais entre os dois tipos de vacas. Esta técnica demonstrou, portanto, ser eficaz utilizando a vaca repetidora como dadora de embriões se, a causa da síndrome se dever à presença de um útero hostil para o embrião.

Por outro lado, a TE pode ultrapassar certos obstáculos que causem infertilidade, como falhas na fertilização, perdas embrionárias precoces, especialmente durante o stress hipertérmico e perturbações da ovulação e/ou tubáricas (Dochi et al., 2008). Estes autores demonstraram que as taxas de gestação eram superiores em vacas que receberam embriões congelados, comparando com aquelas que foram inseminadas, concluindo portanto que esta também é uma opção para ultrapassar esta síndrome. Outras técnicas reprodutivas como produção *in vitro* de embriões ou a inseminação intraperitoneal podem também ser usadas para minimizar os efeitos negativos desta síndrome (Perez-Marin et al., 2012).

3.4.3. Tratamentos intrauterinos

O tratamento por via intrauterina é o mais utilizado, apesar de a sua eficácia poder ser questionada. Algumas desvantagens deste tipo de tratamento estão relacionadas com a ocorrência de lesões endometriais ou a utilização de substâncias irritantes (Marques Júnior et al., 2011). As infecções não específicas são uma das principais causas desta síndrome e os tratamentos intrauterinos antimicrobianos podem melhorar os índices reprodutivos (LeBlanc, 2008). Uma alternativa a estes tratamentos é a auto-hemoterapia intrauterina. A aplicação intrauterina de sangue heparinizado, em vacas, tem revelado bons resultados, provavelmente devido à acção combinada dos neutrófilos, do sistema de complemento, das opsoninas e imunoglobulinas presentes no sangue. Esta combinação estimula fortemente a fagocitose intrauterina (Vandeplasse, 1987).

3.4.4. Tratamentos hormonais

3.4.4.1. Progesterona

A progesterona (P_4) é a hormona da gestação e é, inequivocamente, necessária para a sobrevivência do embrião, nos mamíferos (Spencer & Bazer, 2002). A administração de P_4 entre o dia 3 e 5 após a inseminação e durante 2 a 3 semanas (ou mais), aumenta a probabilidade de as vacas repetidoras ficarem gestantes (Kendall, Flint & Mann, 2008). Está descrita a utilização de dispositivos intravaginais (como, por exemplo, o PRID-dispositivo intravaginal com progesterona) do dia 5 após a IA até ao dia 19, com registo de melhoria na fertilidade destes animais, devido à elevação dos níveis circulantes de progesterona (Perez-Marin et al., 2012). Também está descrita a sua utilização associada a protocolos de IATF (Mellado et al., 2012).

3.4.4.2. GnRH

A administração de GnRH na altura da inseminação tem como objetivo acelerar e assegurar a ovulação, actuando directamente sobre a hipófise, ao estimular a secreção e libertação das

gonadotrofinas, como a FSH e a LH e promovendo o pico pré-ovulatório de LH (Mellado et al., 2012). Se se suspeita de subfunção lútea como a causa da falha reprodutiva, pode usar-se GnRH no dia 5 pós-inseminação, para promover a libertação de LH e FSH, o que vai elevar os níveis de progesterona e exercer um efeito luteotrófico, melhorando a fertilidade nas vacas repetidoras (Perez-Marin et al., 2012).

3.4.4.3. Gonadotrofinas exógenas

Estas hormonas tem sido usadas em vacas repetidoras para induzir a ovulação e/ou exercer um efeito luteotrófico sobre o CL. A hCG (gonadotrofina coriónica humana) é a gonadotrofina exógena mais utilizada nestes casos. Tratamentos com hCG no dia 5 após a inseminação promovem uma elevação dos níveis de progesterona pelo menos por duas semanas, devido ao desenvolvimento de um CL acessório, melhorando assim a taxa de gestação (Thatcher et al., 2003; Kendall et al., 2008; Perez-Marin et al., 2012).

3.4.4.4. Prostaglandina $F_{2\alpha}$

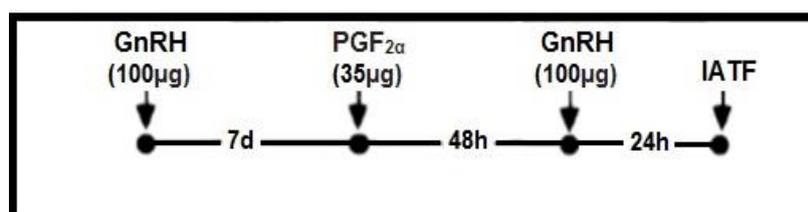
O efeito luteolítico da $PGF_{2\alpha}$ tem sido usado para o tratamento da vaca repetidora, no sentido de se conseguir uma melhor eficiência na detecção de cios e aumentar o número de animais em cio. Existem diversos protocolos utilizados neste cenário, mas ela é frequentemente usada em combinação com outras substâncias, servindo de pré-tratamento e, com o último objectivo de melhorar o maneio reprodutivo (Perez-Marin et al., 2012).

3.4.4.5. Maneio reprodutivo

Os protocolos recentemente utilizados para o tratamento de vacas com ovulações silenciosas ou problemas na ovulação são os que fazem recurso à inseminação artificial em tempo fixo. O Ovsynch (administração de GnRH, $PGF_{2\alpha}$ e novamente GnRH, Figura 10) com inseminação em tempo fixo é um desses protocolos (Pursley et al., 1995).

É também essencial melhorar todos os aspectos relacionados com a detecção de cios de forma a reduzir erros neste capítulo, ao serem considerados diferentes métodos auxiliares de detecção de cios, como os podómetros ou câmaras de vídeo (Perez-Marin et al., 2012).

Figura 10. Protocolo OVSYNCH. Adaptado de Pursley et al. (1995)



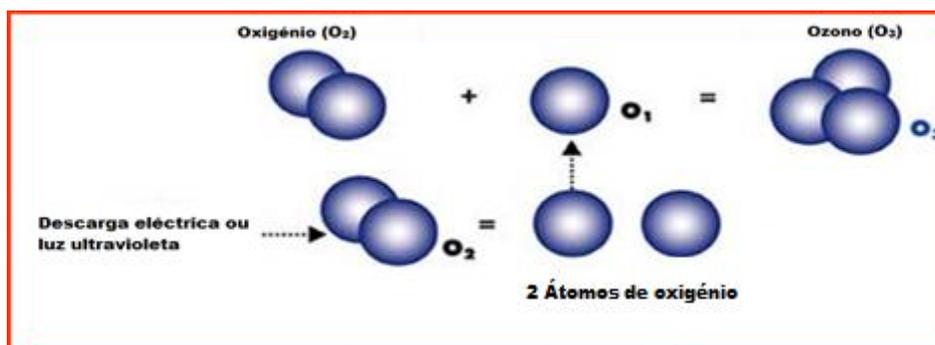
IV. TRABALHO EXPERIMENTAL

1. INTRODUÇÃO

A consciência social acerca dos problemas de segurança alimentar dos produtos destinados a consumo humano, que envolvem os animais tratados com antibióticos, tem crescido nos últimos anos (Ohtsuka, Ogata, Terasaki, Koiwa & Kawamura, 2005). Para além disso, a eficácia da administração intrauterina de antibióticos tem sido questionada devido a múltiplas interações que os mesmos revelam com os componentes do útero e os vários graus de absorção que apresentam (Djuricic et al., 2012a). A administração destas substâncias tem, como grande desvantagem, a presença dos seus resíduos no leite e na carne, bem como o aumento das resistências bacterianas (Djuricic et al., 2012b). Desta forma, têm sido abordados novos tratamentos uterinos, como é o caso da ozonoterapia.

O ozono (O_3) é uma variedade alotrópica do oxigénio, cuja existência foi reportada em 1785 pelo químico holandês M. Van Marum. Este gás possui um poder oxidante superior ao oxigénio e, a sua relação com os compostos orgânicos é mais selectiva (Batista, Mesa, Manresa & Cepero, 2001). Actualmente, está a ser utilizado em vários sectores: farmacêutico, tratamentos ambientais, medicina e cirurgia. Há uns anos, iniciou-se em Itália (Universidade de Parma), um trabalho de investigação sobre a aplicação do ozono em reprodução bovina (Anónimo, prontuário terapêutico Ripromed®, sem data). A molécula é composta por três átomos de oxigénio com uma estrutura cíclica e é um gás instável à temperatura atmosférica normal, que se decompõe rapidamente em moléculas estáveis de oxigénio (Bocci, 2006; Djuricic et al. 2012b). Obtém-se por passagem do oxigénio através de eléctrodos de alta voltagem ou através dos raios ultravioletas (Figura 11; Ogata & Nagahata, 2000; Bocci, 2006). O ozono inactiva bactérias, vírus, fungos, algas e protozoários, agentes estes que podem causar endometrites clínicas ou subclínicas, que afectam negativamente a fertilidade. Destrói as paredes celulares das bactérias através da oxidação dos fosfolípidos e das proteínas, inibe o crescimento celular nos fungos, produz danos nas cápsides virais e altera os receptores vírus-célula, mediante a peroxidação. Além disso, estimula o sistema imunitário, reduz a inflamação e a dor (Loste, Zabala & Mendizabal, 2011).

Figura 11. Processo de produção de ozono. Adaptado de apresentação ppt "Bio Ozotech" (2009).



Podemos considerar o ozono como um pró-fármaco que, em doses não tóxicas, consegue induzir um rearranjo das vias bioquímicas com activação de um segundo mensageiro na cascata do processo inflamatório (Re et al., 2008). Recentemente, foi sugerido que os neutrófilos produzem ozono, o que contribuiria para a sua actividade bactericida e inflamatória. Contudo, a validação desta teoria ainda é tema de debate (Wentworth et al., 2002; Yamashita et al., 2008). De acordo com ela, os anticorpos parecem conseguir catalizar a produção de ozono a partir de uma molécula simples de oxigénio (O_2) e moléculas de água (H_2O), mas o mecanismo através do qual os anticorpos conseguem atingir esta reacção permanece obscuro (Yamashita et al., 2008). Para além disso, também está descrito que o ozono otimiza a regeneração dos tecidos e estimula a produção de tecido de granulação e a epitelização (Re et al., 2008). Esta molécula também parece ter eficácia na inactivação de agentes microbianos no sémen bovino (Gradil, Eaglesome, Stewart, Garcia & Quimby, 1995). A autohemoterapia ozonizada tem sido utilizada para tratamento de diversas doenças (Scrollavezza, Ansaloni, Polidori, Ablondi & Pogliacani, 2002) e parece revelar igualmente vantagens no tratamento de mastites clínicas em vacas (Ogata & Nagahata, 2000). O facto de se tratar de um gás, obriga à necessidade de um substrato, isto é, tem de estar ligado a um suporte líquido ou sólido para que a sua utilização terapêutica seja possível (Bartolini et al., 2004).

Existem diferentes apresentações de preparações de ozono (creme, gás, injeções, palhinhas, espuma, óvulos e bolus; Figura 12). O uso de derivados de óleo ozonizado pode ter várias vantagens a nível bioquímico e, o mais importante em medicina veterinária é o lipo-hidroperóxido. Este actua directamente sobre os microorganismos e estimula as defesas celulares. Para além disso, os produtos do óleo ozonizado não produzem qualquer tipo de resíduo no leite ou carne (Djuricic et al., 2012a).

Zobel et al. (2011) concluíram que o tratamento com ozono podia ser considerado a opção mais eficiente, relativamente a outros tratamentos intrauterinos, dado o seu potente poder antimicrobiano face a um largo espectro de microorganismos e devido ao seu potencial oxidativo e a sua rápida transformação em oxigénio livre, o que não prejudica a viabilidade dos espermatozóides.

Figura 12. Três apresentações clínicas de ozono intrauterino. Retirado de Novagen website (2013)



Legenda: a. *Ripromed Ovuli O₃*® -óvulos; b. *Ripromed palhinhas*®; c. *Ringer Spray*® - espuma.

Concluindo, o ozono promove um ambiente vaginal, cervical e uterino mais favorável à inseminação e fertilização ao reduzir o efeito espermicida causado pela inflamação, contribuindo assim, para a manutenção da viabilidade dos espermatozóides no aparelho reprodutor feminino (Zobel et al., 2011). A vantagem de se usar o ozono em vez de antibióticos resulta, precisamente, da ausência de resistência dos agentes infecciosos (Djuricic et al., 2012a; Djuricic et al., 2012b).

A realização deste trabalho experimental teve como principal objectivo avaliar a eficácia da aplicação do ozono intrauterino [palhinhas de 0,5cc (RIPROMED PALHINHAS®, Novagen, Italy)] na taxa de gestação de vacas repetidoras, da raça Holstein-Frísia, numa exploração de bovinos leiteiros, na Moita, após o tratamento, aproximadamente 10h antes de serem inseminadas artificialmente.

2. DESENHO EXPERIMENTAL

O estudo foi realizado entre 17 de Setembro de 2012 e o final do mês de Julho de 2013. Teve por base 2 grupos: Grupo “Tratamento” (23 animais) que incluiu as fêmeas que foram submetidas ao tratamento com Ripromed® intrauterino, palhinhas de óleo ozonizado (Novagen, Itália), e o Grupo “Controlo” (31 animais), constituído por fêmeas que não foram tratadas.

Neste estudo foram incluídas vacas, de raça Frísia Holstein, que apresentaram cio espontâneo e que já tivessem sido submetidas a duas ou mais IA, com intervalos entre cios regulares (17-23 dias). Foram excluídas aquelas que apresentaram corrimento de estro anormal ou que, ao exame por PTR, lhes foi diagnosticada uma infecção uterina.

O trabalho consistiu na aplicação do tratamento 10h antes da IA. Estas foram feitas sempre com sémen de um de dois touros seleccionados para o ensaio, de forma a reduzir a variabilidade da fertilidade associada ao macho. Tanto a aplicação de ozono como as IA foram realizadas sempre pelo mesmo técnico, de forma a harmonizar o factor humano.

Registou-se, posteriormente, se a vaca apresentou novamente retorno ao cio. Àquelas que o não fizeram, foi realizado o diagnóstico de gestação, por exame ecográfico (Ultrascan 900, AMI, Canadá), com sonda linear de 5 MHz, entre os 28-32 dias pós-IA. A visualização de um corno uterino com líquido e presença de um embrião foram usados como indicadores positivos de gestação. Todos os animais foram reexaminados por palpação transrectal do conteúdo uterino, aproximadamente aos 50 dias após a IA, pelo médico veterinário assistente, para confirmar o diagnóstico anterior ou registar eventuais mortes embrio-fetais. As fêmeas com DG positivo foram sujeitas a novo exame por PTR, aos 90-120 dias pós-IA, realizado igualmente pelo médico veterinário assistente, para registo de mortalidades fetais precoces. As vacas que retornaram ao cio foram re-inseminadas, com sémen do mesmo touro da 1ª IA do ensaio, com o objectivo de se avaliar o efeito, a longo prazo, do tratamento. Estes animais foram sujeitos ao diagnóstico de gestação, apenas aos 50 dias por palpação transrectal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização da exploração

A empresa onde foi realizado o ensaio clínico é uma exploração de bovinos leiteiros, situada na localidade da Moita, distrito de Setúbal, Portugal. Possui um efectivo de, aproximadamente, 780 animais, sendo que destes, 370 são animais em produção leiteira e vacas no período de secagem, e o restante efectivo distribui-se por vitelos (ambos os sexos), vitelões (machos até os 8 meses de idade), novilhas e três touros.

Esta exploração opera em regime intensivo, sendo a área das instalações de cerca de 3,2 ha (hectares). É composta, ainda, por 70 ha de produção de milho e 130 ha de culturas outonais. Os animais são alimentados com uma mistura à base de silagem (silagem de milho, silagem de erva, feno de azevém, massa de cerveja, farinha de milho, farinha de soja e, em certas altura do ano, polpa de laranja e/ou de tomate) e suplementadas com concentrado quando produzem mais de 40L/dia. As fêmeas no parque do pós-parto são ainda suplementadas com vitamina E e minerais.

A exploração é constituída por quatro parques de vacas em produção, sendo os grupos formados consoante o nível de células somáticas que apresentam no leite, com aquelas de níveis mais elevados a serem ordenhadas no final. Realizam-se três ordenhas por dia: a primeira ordenha inicia-se às 6h, a segunda às 13h e a última às 19h, numa sala de duas linhas em espinha, cada uma com vinte locais de ordenha.

A política de substituição dos animais tem por base um sistema de reposição interna, por novilhas nascidas e recriadas na exploração, através de um plano reprodutivo apoiado na inseminação artificial. Os vitelos machos são mantidos na exploração e são vendidos para abate com cerca de 8 meses de idade.

3.2. Maneio reprodutivo

Nesta exploração, a detecção de cios é feita por observação visual por parte dos funcionários, durante todo o dia, com especial incidência em redor das ordenhas. É política da exploração, que qualquer fêmea que tenha atingido um período voluntário de espera de 40 dias seja sujeita a exame ginecológico pelo médico veterinário que indicará se pode ou não ser inseminada no cio seguinte. Passados os 90-120 dias pp, as fêmeas sem registo de cio são sujeitas novamente a um exame ginecológico, procedendo-se então à indução deste. Caso a fêmea apresente condições para tal, a indução do cio é normalmente feita através da administração de PGF_{2α}.

As fêmeas com cerca de sete meses de gestação, são separadas e incluídas no grupo das “vacas secas”. Neste grupo, as vacas passam uma semana a serem alimentadas com palha

e são ordenhadas apenas uma vez por dia. No final dessa semana, são secas (com a instilação de antibiótico intramamário e de um selante interno de tetos) e passam para o parque do 'pré-parto'. Nesse dia, antes de entrarem nesse parque, são vacinadas contra Rotavírus, Coronavírus e E. coli (Trivacton 6[®], Merial, France). Quando a fêmea está próxima da data prevista para o parto é conduzida para um outro grupo, a 'maternidade', onde permanece num espaço com boas condições de higiene e conforto. No dia do parto, são-lhes administrados 120 mL de cálcio subcutâneo (Calfon[®], Bayer, Germany), de modo a evitar complicações metabólicas. Então, são colocadas no parque do "pós-parto" onde são observadas diariamente (registo de temperatura rectal, avaliação da recuperação do animal e diagnóstico de doença pós-parto, avaliação do leite aos primeiros jactos e diagnóstico de mastite, administração e registo dos tratamentos). Durante este tempo, as vacas são ordenhadas apenas duas vezes por dia e o leite é separado para alimentação dos vitelos. Se após 4-5 dias, a fêmea estiver totalmente recuperada do parto, é (re-) introduzida num dos grupos de produção.

Relativamente às novilhas de substituição, são criadas num grupo separado dos animais em produção e, por volta dos 14 meses de idade, são inseminadas pela primeira vez.

3.3. Animais do ensaio experimental

Neste estudo foram utilizadas 54 vacas (23, do grupo tratado e 31, do grupo controlo), exclusivamente da raça Frísia Holstein, com diferentes idades e diferente número de lactações, tendo sido todas elas, anteriormente inseminadas por duas ou mais vezes e tendo tido intervalos entre cios sempre regulares, de 17 a 23 dias. Todas as fêmeas em estudo encontravam-se na mesma situação de manejo, quer alimentar, quer reprodutivo. Os únicos critérios de exclusão foram relativos a animais que ao serem detectados em cio, apresentaram corrimento anormal e/ou patologia uterina evidente à palpação transrectal.

A idade média dos animais do ensaio foi 4,19 anos, sendo a idade máxima 8 anos e a idade mínima 2 anos, como se mostra na Tabela 5.

Tabela 5. Análise descritiva da amostra relativamente à idade.

	n	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Idade	54	2	8	4,19	1,58

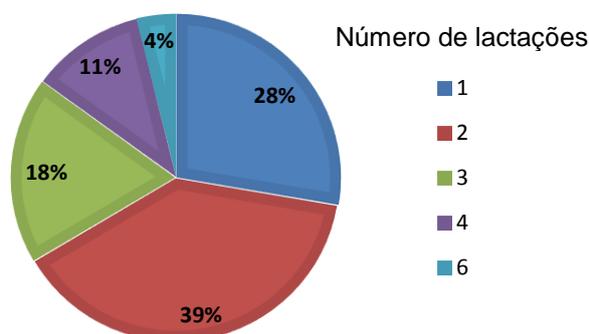
Em relação à paridade, 15 fêmeas do ensaio clínico eram primíparas, sendo as restantes 39 múltíparas, com um máximo de 6 lactações. Na Tabela 6 está caracterizada a distribuição da amostra relativamente ao número de lactações e no Gráfico 1 está representada a mesma distribuição em percentagem e podemos verificar que dentro das múltíparas, o grupo em maioria é o de duas lactações.

Tabela 6. Distribuição da amostra relativamente ao número de lactações

Número de lactações	Número de animais
1	15 (Grupo T n=7; Grupo C n=8)
2	21 (Grupo T n=8; Grupo C n=13)
3	10 (Grupo T n=3; Grupo C n=7)
4	6 (Grupo T n=3; Grupo C n=3)
6	2 (Grupo T n=2; Grupo C n=0)

Legenda: Grupo T- Grupo Tratamento; Grupo C- Grupo Controlo

Gráfico 1. Representação gráfica da distribuição, em percentagem, da amostra relativamente ao número de lactações



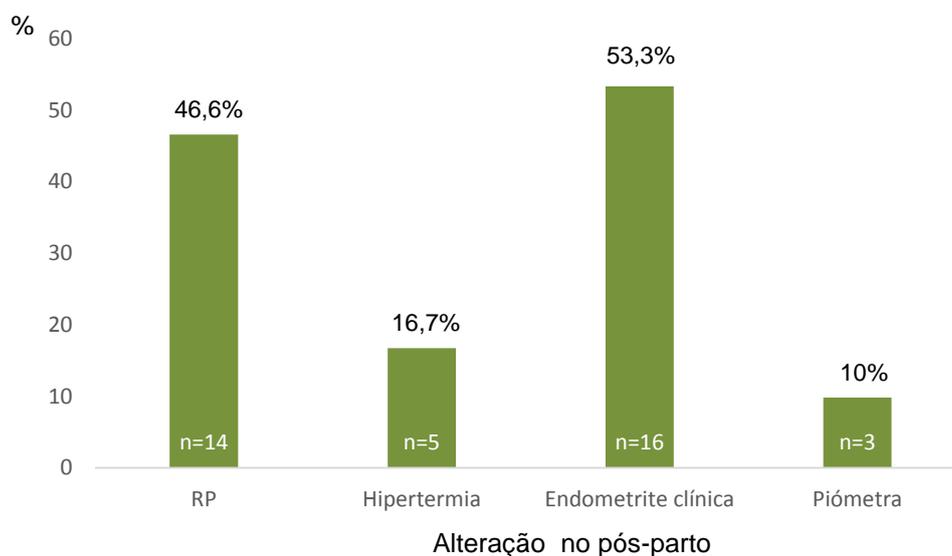
Dentro da amostra, uma das fêmeas teve um parto gemelar e 30 delas [55,6% (30/54)], incluindo esta última, sofreram de patologia(s) durante o pós-parto, estabelecendo um sub-grupo designado por “Doença no pp”. Dentro deste sub-grupo, 14 fêmeas [46,6% (14/30)] sofreram de retenção placentária, diagnóstico estabelecido por não expulsão da placenta nas 24h pp. Contudo, a doença de maior prevalência deste sub-grupo foi a endometrite clínica, afectando 16 dos animais [53,3% (16/30)], sendo que cinco resultaram de retenção placentária e uma, de parto gemelar. Ainda foram registadas 3 vacas [10% (3/30)] com piómetra, todas diagnosticadas anteriormente com endometrite clínica e, outras 5 [16,7% (5/30)] tiveram hipertermia (temperatura superior a 39,5 °C) nos primeiros 5 dias pós-parto, sem causa diagnosticada. Os casos de piómetra e de endometrite clínica foram diagnosticados pelo médico veterinário assistente, durante os exames ginecológicos. A distribuição da amostra em relação às afecções registadas no pós-parto estão resumidas na Tabela 7 e no Gráfico 2.

Tabela 7. Distribuição da amostra relativamente às afecções no pós-parto.

Alteração no pós-parto	Número de animais
Retenção placentária	14 (Grupo T= 7; Grupo C= 7)
Hipertermia	5 (Grupo T= 1; Grupo= 4)
Endometrite clínica	16 (Grupo T= 6; Grupo C= 10)
Piómetra	3 (Grupo T= 3; Grupo C= 0)

Legenda: Grupo T-Grupo Tratamento; Grupo C- Grupo Controlo

Gráfico 2. Representação gráfica da distribuição das diferentes afecções pós-parto do grupo “Doença no pp”. Dentro deste subgrupo 14 fêmeas sofreram de retenção placentária, 16 dos animais foram diagnosticados com endometrite clínica, sendo que cinco resultaram de retenção placentária. Ainda foram registadas 3 vacas com piómetra, todas diagnosticadas anteriormente com endometrite clínica e, outras 5 tiveram hipertermia (temperatura superior a 39,5 °C) nos primeiros 5 dias pós-parto, sem causa diagnosticada.



3.4. Tratamento

Neste ensaio clínico foram utilizadas Ripromed palhinhas®. O ozono, unido a óleos naturais, apresenta-se congelado em palhinhas de 0,5 mL idênticas às de sémen. A aplicação intrauterina foi realizada através da técnica corrente de IA e a descongelação da palhinha, feita à temperatura ambiente (nunca em água). Utilizando-se um “pistolet” universal (palhinhas médias), depositou-se o seu conteúdo no corpo do útero, de forma a facilitar a libertação do ozono, 8 a 10 horas antes da IA convencional. Foi feita apenas uma aplicação por fêmea tratada. As palhinhas têm um preço de mercado de, aproximadamente, 7€ por unidade.

3.5. Registo de dados e análise estatística

Durante a realização deste trabalho experimental, todos os dados e registos recolhidos na exploração foram introduzidos numa base de dados criada no programa informático Microsoft Office Excel® 2013 (ver Anexos), que serviu como suporte para a construção de gráficos e tabelas e, ainda para o cálculo da estatística descritiva (média e desvio padrão) para as variáveis “intervalo parto-1ª IA”, “dias em leite” e “produção de leite à IA do ensaio”.

Para os parâmetros registados sobre a forma de dados quantitativos (os referidos anteriormente) utilizou-se o teste Mann-Whitney U, de forma a determinar o nível de significância estatística (p) para os dois grupos. Para os parâmetros registados sobre a forma de dados qualitativos, foram analisadas e trabalhadas as associações entre as variáveis “Tratamento” x “Taxa de retorno” e “Tratamento” x “Diagnóstico de Gestação” para os grupos “Tratamento” e “Controlo”, assim como para os sub-grupos “Doenças no pp” e “Pp normal”, pelo Teste exacto de Fisher bilateral. Este teste foi utilizado devido ao facto da amostra ser pequena e não reunir todos os pressupostos necessários à realização do Teste Qui-Quadrado. O Teste exacto de Fisher bilateral permite realizar o estudo estatístico em amostras pequenas com maior precisão. Estes testes foram executados com recurso ao programa IBM SPSS Statistics 20® para Windows. O nível de significância adoptado foi de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

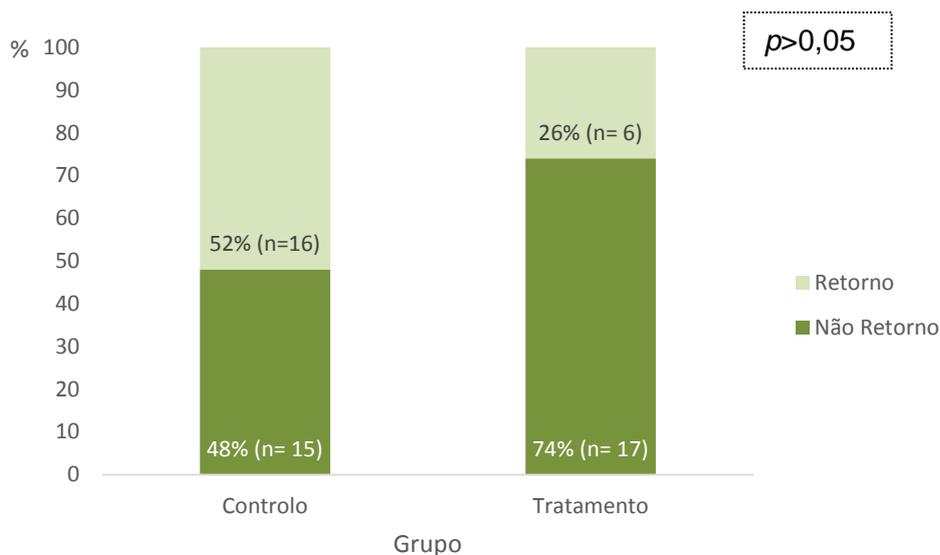
A Tabela 8 apresenta a caracterização geral do grupo “Tratamento” e do grupo “Controlo” relativamente às variáveis: “Intervalo parto-1ª IA”, que corresponde ao número de dias entre o parto e a 1ª IA após o parto, “Dias em leite”, correspondente ao número de dias em produção entre o parto e a IA do ensaio e, “Produção de leite à IA do ensaio”, relativa à produção em litros, no dia da IA do ensaio. Na análise estatística dos dados trabalhados através do teste Mann-Whitney U, verificou-se que as diferenças entre os dois grupos não eram significativas para nenhuma das variáveis ($p>0,05$). No entanto, em média, o grupo “Tratamento” apresentou um intervalo parto-1ª IA maior ($66,7 \pm 15,6$ dias) que o grupo “Controlo” ($60,5 \pm 16,9$ dias). O grupo “Tratamento” registou igualmente, um ligeiro aumento da média dos dias em leite, relativamente ao grupo “Controlo” ($142,5 \pm 24,5$ vs. $136,3 \pm 28,4$). Quanto à produção de leite no dia da IA do ensaio, o grupo “Controlo” produziu, em média, um pouco mais ($29,3 \pm 8,0$ L/dia) que o grupo “Tratamento” ($28,3 \pm 7,3$ L/dia).

Tabela 8. Apresentação do número médio (χ) e desvio padrão (σ) do Intervalo parto- 1ª IA (dias), número de dias em leite e da produção de leite à IA do ensaio (L/dia) nos dois grupos de vacas.

	Grupo		<i>p</i>
	Tratamento n= 23	Controlo n=31	
Intervalo Parto-1ª IA (dias) ($\chi \pm \sigma$)	$66,7 \pm 15,6$	$60,5 \pm 16,9$	0,08
Dias em leite	$142,5 \pm 24,5$	$136,3 \pm 28,4$	0,20
Produção de leite à IA do ensaio (L/dia) ($\chi \pm \sigma$)	$28,3 \pm 7,3$	$29,4 \pm 8,0$	0,63

Dos 54 animais que fizeram parte do ensaio clínico, 22 registaram retorno ao cio entre os 17 a 23 dias após a IA do ensaio, 16 dos quais pertenciam ao grupo “Controlo” [52% do grupo (16/31)] e os restantes 6 ao grupo “Tratamento” [26% do grupo (6/23)]. Apesar de haver uma maior percentagem de retornos no grupo “Controlo”, não foi estabelecida qualquer associação entre o tratamento e o retorno ao cio ($p=0,09$). No Gráfico 3 podemos analisar essa distribuição em ambos os grupos.

Gráfico 3. Percentagem de retornos ao cio ao longo do ensaio clínico.



Na Tabela 9, apresentam-se os dados relativos aos resultados dos diagnósticos de gestação das fêmeas que não fizeram retorno, dos dois grupos (“Tratamento” e “Controlo”). Os dados para o diagnóstico de gestação foram obtidos por ecografia (aos 28-32 dias) e palpação transrectal (primeiro, aos 50 dias e, uma segunda vez, aproximadamente aos 100 dias) e, para efeito estatístico, as fêmeas que retornaram ao cio foram consideradas como tendo diagnóstico de gestação negativo. Utilizando o Teste exacto de Fisher bilateral, verificou-se que apesar de haver 43% de animais tratados com diagnóstico de gestação positivo, comparativamente a 26% dos não tratados, os dados não evidenciaram diferenças significativas ($p=0,25$), não se podendo afirmar que o melhor resultado obtido com os animais sujeitos ao tratamento, se deveu ou não, a uma situação casual, não sendo igualmente possível qualquer extrapolação para a restante população. Verificou-se também que dos 15 animais do grupo “Controlo” sujeitos ao diagnóstico de gestação, 8 tiveram diagnóstico negativo aos 30 dias, enquanto que das 17 fêmeas do grupo “Tratamento”, apenas 6 tiveram diagnóstico negativo aos 30 dias. Também se verificou, ao segundo DG, que houve uma perda embrionária no grupo “Controlo”, e quando realizado o terceiro diagnóstico registaram-se mais duas perdas de gestação no grupo “Controlo” e uma no grupo “Tratamento”. Após o terceiro DG, a diferença percentual dos DG positivos entre os dois grupos foi ainda maior (39% no grupo “Tratamento” e 16% no grupo “Controlo”, $p=0,07$), mas os dados continuaram a não revelar qualquer associação entre o tratamento e o diagnóstico de gestação positivo. Logo, não foi possível relacionar o tratamento ao facto de neste grupo se ter registado uma menor mortalidade embrio-fetal.

Tabela 9. Resultados dos diagnósticos de gestação.

		DG (28-32 dias)		DG (45-60 dias)		DG (90-120 dias)	
		-	+	-	+	-	+
Grupo	Tratamento (n=23)	57% (13/23)	43% (10/23)	57% (13/23)	43% (10/23)	61% (14/23)	39% (9/23)
	Controlo (n=31)	74% (23/31)	26% (8/31)	77% (24/31)	23% (7/31)	84% (26/31)	16% (5/31)
<i>p</i>		0,25		0,14		0,07	

Na Tabela 10, são apresentados os resultados do diagnóstico de gestação, realizado por palpação transrectal, às fêmeas que fizeram retorno ao cio e que foram re-inseminadas. Como é possível verificar-se, nenhum dos animais do grupo “Tratamento” ficou gestante. Já no grupo “Controlo”, 37% das fêmeas (6/16) ficaram gestantes à 2^o IA ($p=0,13$). Após a análise dos dados através do Teste exacto de Fisher bilateral, constatou-se não haver diferenças significativas entre os dois grupos em estudo.

Tabela 10. Resultado do diagnóstico de gestação à 2^a IA.

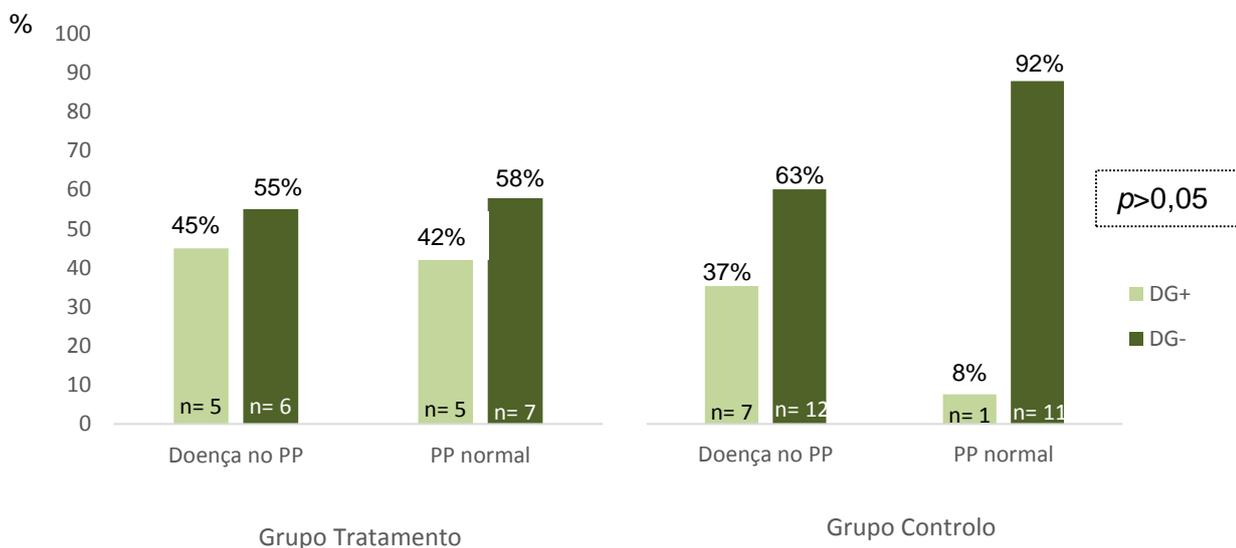
		DG (45-60 dias)	
		-	+
Grupo	Tratamento (n=6)	100% (6/6)	0% (0/6)
	Controlo (n=16)	63% (10/16)	37% (6/16)
<i>p</i>		0,13	

Na Tabela 11 apresentam-se os resultados do diagnóstico de gestação aos 30 dias, referenciados anteriormente na Tabela 9, considerando agora, os subgrupos das vacas que tiveram alguma(s) afecção(ões) durante o pós-parto (“Doença no pp”) e das que, aparentemente, tiveram um pós-parto normal (“Pp normal”). Verificou-se que, no subgrupo “Doença no pp”, 45% (5/11) das fêmeas do grupo “Tratamento” tiveram DG positivo em comparação com apenas 37% (7/19) das vacas do grupo “Controlo”, ($p=0,71$). Quanto ao subgrupo “Pp normal”, 42% (5/12) das fêmeas do grupo “Tratamento” e, apenas 8% (1/12) do grupo “Controlo” tiveram DG positivo ($p=0,15$). Após a análise dos dados pelo Teste exacto de Fisher bilateral, concluiu-se que, mais uma vez, os resultados obtidos não evidenciavam diferenças significativas, não se podendo, por isso, confirmar qualquer associação entre o efeito do tratamento com ozono e o facto de ter existido ou não doença pp. O Gráfico 4 faz a representação gráfica destes resultados.

Tabela 11. Resultados do diagnóstico de gestação, realizado aos 28-32 dias após a IA por exame ecográfico, em vacas que apresentaram doença pós-parto e nas que tiveram um pós-parto normal, tratadas e não tratadas.

		Doença no PP		PP normal	
		DG -	DG +	DG -	DG +
Grupo	Tratamento	55% (6/11)	45% (5/11)	58% (7/12)	42% (5/12)
	Controlo	63% (12/19)	37% (7/19)	92% (11/12)	8% (1/12)
<i>p</i>		0,71		0,15	

Gráfico 4. Representação gráfica dos resultados do diagnóstico de gestação em vacas que apresentaram doença pós-parto e um pós-parto normal, tratadas e não tratadas



5. DISCUSSÃO

Relativamente aos resultados obtidos ao longo do presente ensaio experimental, a amostra mostrou ser muito reduzida e a perda de poder estatístico foi inevitável. Uma justificação para o facto, ficou a dever-se à exigência dos critérios de selecção. Isto é, para serem incluídas no estudo foi obrigatório as vacas terem pelo menos duas IA, intervaladas por cios regulares e pertencerem todas a uma mesma exploração. Assim sendo, o grupo de animais estudado foi de 54 fêmeas, das quais 23, foram tratadas e 31 não, ou seja, funcionaram como grupo controlo. O primeiro ponto de discussão analisou o número médio de dias do intervalo parto-1ªIA pp, dos dias em leite até à IA do ensaio e da produção de leite no dia da IA do ensaio. Relativamente ao número médio de dias do intervalo parto-1ªIA, ele foi de 66,7 dias para o grupo “Tratamento” e de 60,5 dias para o grupo “Controlo”. Estes valores foram muito semelhantes ao considerado óptimo por Noakes et al. (2001b), que é de 65 dias. Trata-se de um aspecto positivo, já que mais de 50% destas vacas tiveram uma história de patologia uterina durante o puerpério. Para além disso, o grupo “Controlo” apresentou um valor médio inferior ao do grupo “Tratamento”, não esperado, dado este último grupo ter apenas 11 animais com história de patologia puerperal, em relação aos 19 casos do grupo “Controlo”. Em relação aos dias em leite até à IA do ensaio, o grupo “Tratamento” registou um valor médio de 142,5 dias. Já o grupo “Controlo” revelou um valor inferior (136,3 dias). Numa análise superficial, estes valores indiciam que estas fêmeas irão apresentar um valor muito superior ao considerado óptimo por Noakes et al. (2001b) para o intervalo parto-IA fecundante que é 85 dias. Ambas as variáveis, quer o “intervalo parto-1ªIA”, quer os “dias em leite”, através do Teste de Mann-Whitney U, não evidenciaram diferenças significativas entre os dois grupos ($p > 0,05$), daí poder sugerir-se que não influenciaram os resultados do ensaio. O mesmo pode afirmar-se sobre a produção de leite à IA, nos dois grupos ($p > 0,05$), que mostrou ser mais ou menos constante em todas as vacas, não havendo diferenças de produção de leite que pudessem influenciar a performance reprodutiva. É de salientar a referência na literatura que o melhoramento genético para a produção leiteira provocou uma quebra da fertilidade e aumentou a incidência dos problemas reprodutivos (Gröhn & Rajala-Schultz, 2000; Földi et al., 2006). Através da análise dos desvios-padrão para cada variável, verificou-se que entre os animais tratados e os não tratados, ele foi sempre inferior para o grupo de animais tratados, relativamente aos não tratados. Este registo parece indicar que houve uma menor variação de resultados no grupo de animais tratados, logo uma maior consistência nos dados. Dos 54 animais que fizeram parte do ensaio clínico, 22 (40%) fizeram retorno ao cio entre os 17 e os 23 dias, após a primeira IA do ensaio, 16 dos quais pertenciam ao grupo “Controlo” [52% do grupo (16/31)] e 6 ao grupo “Tratamento” [26% do grupo (6/23)]. Este dado dá-nos indicação que estas fêmeas ou não sofreram uma fertilização ou, tendo ocorrido a fertilização, foram alvo de mortalidade embrionária precoce. Humblot (2002), citado por Thatcher et al.

(2003) refere que a mortalidade embrionária precoce pode variar entre 20,5 a 43 %. Este valor é muito semelhante ao observado neste ensaio [40% (22/54)]. Diskin et al. (2012) sugerem que existe uma maior proporção de mortalidade embrionária antes do dia 16 pós-IA, o que mantém o ciclo éstrico da vaca dentro de períodos regulares, por não ter ainda ocorrido reconhecimento materno da gestação. Verificou-se, de acordo com os resultados obtidos, ter havido uma maior taxa de retorno ao cio nos animais do grupo “Controlo”, que no grupo “Tratamento”. Loste et al. (2011) referiram que o óleo ozonizado quando instilado por via intrauterina, melhorava a taxa de fecundação e posterior nidação, o que parece sugerir que a menor taxa de retorno ao cio do grupo “Tratamento” se possa dever às propriedades do tratamento. Apesar deste registo, os dados não evidenciaram qualquer associação entre o tratamento e retorno ao cio ($p=0,09$) pelo Teste exacto de Fisher, facto que não possibilita saber se o resultado foi casual ou não.

As restantes vacas, em que não foi registado o cio de retorno, foram sujeitas a exame ecográfico para diagnóstico de gestação, entre os 28 e os 32 dias. Destas, 43% (10/23) das fêmeas que receberam tratamento tiveram diagnóstico positivo, em comparação com apenas 26% (8/31) das fêmeas do grupo “Controlo”. Como podemos constatar, a partir da análise da Tabela 9, os resultados foram numericamente melhores para o grupo dos animais tratados, relativamente ao dos não tratados. Contudo, neste ensaio clínico, também não foi possível encontrar evidência estatística ($p>0,05$) de que as variáveis em estudo seriam dependentes, o que garantiria que os resultados não eram atribuídos ao acaso. No entanto, estes dados estão em concordância com os obtidos por Loste et al. (2011). Estes autores aplicaram o Ripromed® palhinhas em associação a um protocolo Ovsynch, por altura da segunda dose de GnRH (ou seja, 16h antes da IATF). O grupo Controlo foi sujeito unicamente ao Ovsynch. Os resultados obtidos foram de 35,6% de gestações para o grupo Tratamento vs. 21,3% gestações para o grupo Controlo ($p<0,05$). Estes dados foram também confirmados por Zobel (2013) que testou a eficácia do ozono intrauterino através de um ensaio com três grupos [grupo A (PGF_{2α}), grupo B (cefapirina+PGF_{2α}) e grupo C (ozono+PGF_{2α})] e, os melhores resultados foram obtidos com o grupo C ($p<0,05$). Segundo aquele investigador, o tratamento com ozono resultou num maior número de vacas que conceberam e também num menor número de dias em aberto, relativamente aos grupos tratados com cefapirina ou apenas PGF_{2α}.

No presente trabalho, foi ainda possível observar que 36 fêmeas (Grupo Tratamento $n= 13$ + Grupo Controlo $n= 23$) tiveram DG negativo aos 28-32 dias e, na confirmação do diagnóstico de gestação por palpação transrectal (45-60 dias), verificou-se mais um DG negativo [37 (Grupo Tratamento $n=13$ + Grupo Controlo $n=24$)]. Segundo Diskin et al. (2012) e Marques et al. (2007), quando a morte do concepto ocorre entre o dia 24 e o dia 42 designa-se por mortalidade embrionária tardia. Se se assumir não ter havido ineficiente detecção de cios durante o ensaio, ao diagnóstico por palpação transrectal (45 a 60 dias) registou-se uma

percentagem de 28% (15/54) de mortalidade embrionária tardia. Este valor (n=15) corresponde à subtracção do número de animais que registou retorno ao cio entre os 17 e os 23 dias após a IA do ensaio (22 animais) pela totalidade de DG negativos entre os 45-60 dias [37 (Grupo Tratamento n=13 + Grupo Control n=24)]. Este resultado é superior ao referido por Humblot (2002), citado por Thatcher et al. (2003) que afirmou que a incidência de mortalidade embrionária tardia variava entre 8% e 17,5%. O valor registado no presente trabalho pode dever-se ao facto destas vacas poderem estar em situação de inflamação endometrial.

Após o diagnóstico de gestação, por palpação transrectal, aos 90-120 dias, verificou-se que, segundo a definição proposta por Marques et al. (2007), ocorreu uma mortalidade fetal precoce no grupo “Tratamento” e duas no grupo “Controlo”. Novamente, registou-se melhor resultado no grupo submetido ao tratamento, o que poderá sugerir que uma vez estabelecida uma gestação, o ozono intrauterino favorece a sua continuação.

Realizou-se o diagnóstico de gestação das fêmeas que foram re-inseminadas, durante o ensaio, com o objectivo de se averiguar se a ozonoterapia teria algum efeito a longo prazo. Porém, nenhuma vaca do grupo “Tratamento” (0/6) ficou gestante, enquanto que 37% (6/16) do grupo “Controlo” tiveram diagnóstico positivo ($p>0,05$). Estes resultados podem sugerir que o Ripromed® palhinhas não terá qualquer efeito a longo prazo sobre a taxa de gestação. Todas as fêmeas que foram inseminadas pela 2ª vez foram sujeitas ao diagnóstico de gestação por palpação transrectal entre o dia 45 e 60, não tendo sido, entretanto, registado nenhum cio de retorno. Parece, à partida, ter havido uma falha na detecção de cios destes animais ou, porventura, mas menos plausível, a ocorrência de mortalidade embrio-fetal.

Trinta e quatro fêmeas da população em estudo (55,6%), segundo a sua história clínica, apresentaram algum tipo de afecção, isolada ou combinada, do foro reprodutivo, sendo as patologias mais prevalentes a retenção placentária [46,6% (14/34)] e a endometrite clínica [53,3% (16/34)]. Este registo vai de encontro às conclusões de Evans & Walsh (2012) e Földi et al. (2006), de que as infecções uterinas (específicas ou não) constituem um obstáculo ao estabelecimento de uma nova gestação. Segundo Gröhn & Rajala-Schultz (2000), vacas com RP e vacas com endometrite têm, respectivamente, uma redução da taxa de concepção de 14% e 15%, relativamente às sãs. Em relação ao registo “hipertermia” não foi possível atribuir esse sinal clínico a qualquer patologia, pois não se obteve um diagnóstico definitivo por parte do médico veterinário assistente. No entanto, esta situação foi assinalada nos cinco dias pós-parto e todas as fêmeas foram tratadas com uma dose terapêutica de ceftiofur (Naxcel®, Belgium), por via subcutânea, tendo-se verificado recuperação na totalidade dos casos. Poder-se-á sugerir que estes animais poderiam estar a fazer uma metrite que entretanto foi controlada. A divisão da população em estudo em subgrupos “Doença no pp” e “Pp normal” teve como objectivo avaliar se o tratamento teria uma maior eficácia nas vacas que apresentaram patologia durante o puerpério e, por isso, com maior propensão para serem sede de endometrite subclínica. Na Tabela 11, pode verificar-se que 45% (5/11) das fêmeas

que receberam tratamento e tiveram alguma doença no pós-parto estavam gestantes aos 28-32 dias pós-IA, enquanto que apenas 37% (7/19) das vacas do mesmo subgrupo mas não tratadas, tiveram um diagnóstico positivo ($p>0,05$). Relativamente ao subgrupo “Pp normal”, a percentagem de vacas gestantes e tratadas foi de 42% (5/12), mas quanto às fêmeas pertencentes ao grupo “Controlo” apenas um animal teve diagnóstico positivo, correspondendo a 8% (1/12) dos animais ($p>0,05$). Apesar de não ter havido uma diferença estatisticamente significativa, registou-se no grupo “Tratamento” uma ligeira melhoria na taxa de gestação, do subgrupo “Doença no pp”. Em relação ao grupo “Controlo” observou-se igualmente uma melhoria na taxa de gestação do subgrupo “Doença no pp” comparativamente ao subgrupo “Pp normal”. Barański et al. (2012) afirmaram que a endometrite subclínica deveria ser considerada sempre que há insucesso na gestação ou quando é registada uma repetição dos cios. Esta patologia é resultado de uma contaminação bacteriana, sendo mais provável sempre que ocorre uma infecção uterina (Couto et al., 2013). Para a realização deste ensaio clínico partiu-se do pressuposto que todas as vacas, sendo elas repetidoras e não tendo sido diagnosticada qualquer patologia no exame por palpação transrectal, no início do ensaio, poderiam padecer de endometrite subclínica. Zobel et al. (2011) constataram que, nos animais com endometrite subclínica que foram submetidos a um tratamento com ozono intrauterino, a inflamação foi notoriamente reduzida, devido ao seu poder antisséptico e capacidade imunomoduladora, quando em contacto com a mucosa uterina. Tendo este registo em consideração, poder-se-ia sugerir que as vacas do presente ensaio clínico seriam sede de uma inflamação uterina.

O objectivo primordial deste estudo experimental foi o de avaliar o efeito da aplicação intrauterina de ozono sobre a taxa de gestação, após IA, em vacas repetidoras. Após a análise de todos os pontos de discussão, parece haver alguma evidência de a aplicação do ozono ter trazido vantagens. No entanto e, provavelmente pelo facto do grupo em estudo ter sido muito reduzido, não foi possível a extrapolação dos resultados para a restante população. Teria sido necessário um período de registo de dados mais extenso para se conseguir uma amostra adequada. Outra justificação para os resultados não terem sido conclusivos, pode dever-se ao facto de o estudo experimental ter sido construído sobre algumas bases menos sólidas. Para tornar os resultados mais fidedignos teria sido desejável a realização de citologia endometrial a todas as vacas do ensaio experimental, de forma a comprovar que a endometrite subclínica era a causa da síndrome da vaca repetidora. Apesar de, inicialmente, estar presente no desenho experimental a realização de citologias endometriais por amostragem ($\pm 20\%$ por grupo) elas não se realizaram por indisponibilidade do médico veterinário.

Em alternativa, e com o objectivo de se poder obter resultados mais coerentes, poder-se-ia ter optado pela associação de um protocolo hormonal e IATF. Para Zobel (2013), o tratamento

da endometrite subclínica deve associar sempre a administração de um tratamento intrauterino a um tratamento hormonal, de forma a obterem-se resultados mais vantajosos.

O ozono tem sido empregado em medicina humana há muitos anos, para além da sua utilização na desinfecção de águas e alimentos (Zobel et al., 2011). O seu uso em medicina veterinária é recente, o que faz com que não existam muitos trabalhos publicados sobre a sua aplicação e eficácia.

A baixa fertilidade das vacas leiteiras de alta produção é um dos problemas mais importantes com que nos deparamos no nosso trabalho diário, que obriga a uma alta taxa de substituição por eliminação das vacas repetidoras, aumento dos dias em aberto e dias em leite e, conseqüentemente, com quebras de produção e gastos em sémen. Tentar avaliar o efeito do ozono como antisséptico, a nível intrauterino, como meio de melhoria da taxa de gestação, levou à realização deste ensaio clínico. Os resultados obtidos indicam que o uso de ozono, 10 horas antes da inseminação artificial, pode ajudar a melhorar a fertilidade, já que se registou uma diferença numérica de 17 pontos percentuais nos diagnósticos positivos no grupo “Tratamento”, em relação ao grupo “Controlo”.

6. CONCLUSÃO

Nenhuma das análises do presente estudo foi estatisticamente significativa, e por isso, não foi possível qualquer conclusão definitiva sobre o efeito do Ripromed® palhinhas, aplicado por via intrauterina, 10h antes da IA, em vacas repetidoras. No entanto, tal não invalida o facto de se terem registado melhores resultados, ainda que numéricos, com os animais tratados em relação ao grupo controlo. Também foi possível constatar que o Ripromed® palhinhas parece não ter qualquer efeito, sobre a taxa de gestação a longo prazo.

Outros estudos prospectivos deverão ser realizados com uma amostra maior e com um desenho experimental mais completo, para se avaliar com maior eficácia o efeito deste tratamento. Uma das propostas poderia ser a avaliação do efeito do ozono na redução da infecção e/ou inflamação, associando-se uma componente laboratorial ao ensaio de campo. Finalmente, este trabalho deixa em aberto a possibilidade de incluir o emprego do ozono em outros momentos (antes ou depois da IA), bem como a possibilidade da aplicação do ozono associada a protocolos hormonais, de forma a melhorar a sua eficácia.

V. BIBLIOGRAFIA

- Ayalon, N. (1984). The repeat breeder problem. In *The Reproductive Potencial of Cattle and Sheep*. (pp. 265-294). Israel: INRA Publ.
- Azawi, O. I. (2008). Postpartum uterine infection in cattle. *Animal Reproduction Science*, 105, 187-208.
- Barański, W., Podhalicz-Dziegielewska, M., Zduńczyk S. & Janowski, T. (2012). The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds. *Theriogenology*, 78, 1939-1947.
- Barlund, C. S., Carruthers, T. D., Waldner, C. L. & Palmer, C. W. (2008). A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*, 69, 714-723.
- Bartolini, V., Martínez, M., Zampatti, M, Puggia, C., Riquelme, C., Warcok M., Zannoni, V., Dománico, R. (2004). Ozono: Su aplicación en medicina veterinária. *Instituto Nacional de Tecnología Industrial*.
- Baruselli, P (sem data). Reprodução de bovinos. In M. Plaszyńska (Ed), *Compêndio de reprodução animal*. Intervet International (pp. 13-124).
- Batista, A. D., Mesa, M. G., Manresa, C. P. & Cepero, S. M. (2001). Efecto del ozono sobre la activación plaquetária en pacientes con enfermedades vasculares periféricas: informe preliminary. *Revista Cubana de Invertigación Biomédica*, 20, 42-44.
- Bocci, V. A. (2006). Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Archives of Medical Research*, 37, 425-435.
- Brick, T. A., Schuenemann, G. M., Bas, S., Daniels, J. B., Pinto, C. R., Rings, D. M. & Rajala-Schultz, P. J. (2012). Effect of intrauterine dextrose or antibiotic therapy on reproductive performance of lactating dairy cows diagnosed with clinical endometritis. *Journal of Dairy Science*, 95, 1894-1905.
- Cerón, L. L.; Eckersall, P. D.; Mertinez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34, 85-99.
- Couto, G. B., Vaillancourt, D. H. & Lefebvre, R. C. (2013). Comparison of leukocyte esterase test with endometrial cytology for diagnosis of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 79, 103-107.
- Del Vecchio, R. P., Matsas, D. J., Fortin., S., Sponenberg, D. P. & Lewis, G. S. (1994). Spontaneous uterine infections are associated with elevated prostaglandin F_{2α} metabolite concentration in postpartum dairy cows [abstract]. *Theriogenology*, 413.
- Departamento Técnico-Comercial Vitas Portugal (2013, Julho, Agosto e Setembro). Stress térmico em vacas leiteiras. Ruminantes: A Revista da Agroecuária, p.46.
- Diskin, M. G., Parr, M. H. & Morris, D. G. (2012). Embryo death in cattle: an update. *Reproduction, Fertility and Development* 24, 244-251.
- Djuricic, D., Vince, S., Ablondi, M., Dobranic, T. & Samardzija, M. (2012a). Effect of preventive intrauterine ozone application on reproductive efficiency in holstein cows. *Reproduction of Domestic Aniamals*, 47, 87-91.

- Djuricic, D., Vince, S., Ablondi, M., Dobranic, T. & Samardzija, M. (2012b). Intrauterine ozone treatment of retained fetal membrane in Simmental cows. *Animal Reproduction Science*, 134, 119-124.
- Dochi, O., Takahashi, K., Hirai, T., Hayakawa, H., Tanisawa, M., Yamamoto, Y. & Koyama, H. (2008). The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology*, 69, 124-128.
- Draper, J. C. & Wheal, T. J., (1989). *Uterine pathology in the bovine*. Ontario: Cambridge Veterinary Services.
- Drost, M., Thomas, P., G., Seguin, B. & Troedsson, M. H. (2002). Female reproductive disorders. In B. P. Smith, *Large Animal Internal Medicine* (pp. 1292-1332). St. Louis: Mosby.
- Eiler, H. (1997). Retained placenta. In R. S. Youngquist, *Current Therapy in Large Animal* (pp. 340-348). Philadelphia: W. B. Saunders CO.
- Evans, A. C. O., & Walsh, A. W. (2012). The physiology of multifactorial problems limiting the establishment of pregnancy in dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 24, 233-237
- Ferreira, R. M., Ayres, H., Chiaratti, M. R., Ferraz, M. L., Araújo, A. B., Rodrigues, C. A., Watanabe, Y. F., Vireque, A. A., Joaquim, D. C., Smith, L. C., Meirelles, F. V. & Baruselli, P. S. (2011). The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *Journal of Dairy Science*, 94, 2383-2392.
- Földi, J., Kulcsár, M., Pécsi, A., Huyghe, B., de Sá, C., Lohuis, J. A. C. M., Cox, P. & Huszenicza, G. (2006). Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Animal Reproduction Science*, 96, 265-281.
- Freitas, S. G. (2002). Anestro pós-parto em vacas de corte. Seminário apresentado na disciplina de reprodução do programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias. Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Gilbert, R. O. (2012). The effects of endometritis on the establishment of pregnancy in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 24, 252-257.
- Gilbert, R.O., Shin, S. T., Guard, C. L. & Erb, H. N. (1998) Incidence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows [abstract]. *Theriogenology*, 49, 251.
- Gilbert, R. O., Shin, S. T., Guard, C. L., Erb, H. N. & Frajblat, M. (2005). Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, 64, 1879-1888.
- Giuliodori, M. J., Magnasco, R. P., Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I. M., Risco, C. A. & de la Sota, R. L. (2013). Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive performance. *Journal of Dairy Science*, 96, 3621-3631.
- Goncagul, G., Seyrec, I. K., Kumru, I. H. & Seyrec I. D. (2012). Prevalence and accompanying signs of neovagina and urovagina in dairy cows in the Southern Marmara region [abstract]. *Tierarzti Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 40, 359.
- Gradil, C., Eaglesome, M. D., Stewart, B., Garcia, M. M. & Quimby, F. (1995). Bactericidal effects of ozone at nonspermicidal concentrations. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 59, 183-186.

- Groebner, A. E., Rubio-Aliada, I., Schulke, K., Reichenbach, H. D., Daniel, H., Wolf, E., Meyer, H. H. D. & Ulbrich, S. E. (2011). Increase of essential amino acids in the bovine uterine lumen during preimplantation development. *Society for Reproduction and Fertility*, 141, 685-695.
- Gröhn, Y. T. & Rajala-Schultz, P. J. (2000). Epidemiology of reproductive performance en dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 605-614.
- Inchaisri, C., Jorritsma, R., Vos, P. L. A. M., van der Weijden, G. C., Hogeveen, H. (2011). Analysis of the economically optimal voluntary waiting period for first insemination. *Journal of Dairy Science*, 94, 3811-3823.
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S. & Johnson, W. H. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 62, 9-23.
- Kendall, N. R., Flint, A. P. F. & Mann, G. E. (2008). Incidence and treatment of inadequate postovulatory progesterone concentrations in repeat breeder cows. *The Veterinary Journal*, 181, 158-162.
- Kindahl, H., Odensvik, K., Aiumlamai, S. & Fredriksson, G. (1992). Utero-ovarian relationship during the bovine postum period [abstract]. *Animal Reproduction Science*, 28, 363.
- LeBlanc, S. J. (2008). Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. *The Veterinary Journal*, 176, 102-114.
- LeBlanc, S. J. (2012). Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 18-30.
- LeBlanc, S. J., Osawa, T. & Dubuc, J. (2011). Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 76, 1610-1618.
- Lefebvre, R. C., Stock & A. E. (2012). Therapeutic efficiency of antibiotics and prostaglandin F_{2α} in postpartum dairy cows with clinical endometritis: an evidence-based evaluation. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28, 79-96.
- Leutert, C., von Krueger, X., Plöntzke, J. & Heuwieser, W. (2012). Evaluation of vaginoscopy for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95, 206-212.
- Loste, J. M., Zabala, J. A., Mendizabal, J. A. (2011). Empleo de ozono para la mejora de la fertilidad en un protocolo de sincronización en vacuno lechero. Acedido em 2013, disponível em: <http://www.anembe.com/empleo-de-ozono-para-la-mejora-de-la-fertilidad-en-un-protocolo-de-sincronizacion-en-vacuno-lechero-b74/>.
- Madoz, L. V., Giuliadori, M. J., Jaureguiberry, M., Plöntzke, J., Drillich, M. & de la Sota, R. L. (2013) The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96, 4333-4339.
- Marques, V. B., Bertan, C. M., de Almeida, A. B., Meirelles, F. V., Papa, P. C. & Binelli, M. (2007). Interferon-tau e o reconhecimento da gestação e bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31, 479-488.
- Marques Júnior, A. P., Martins, T. M. & Borges, Á. M. (2011). Abordagem diagnóstica e de tratamento da infecção uterina em vacas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35, 293-298.

- Mateus, L., Lopes da Costa, L., Bernardo, F. & Robalo Silva, J. (2002a). Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reproduction of Domestic Animals*, 37, 31-35.
- Mateus, L., Lopes da Costa, L., Carvalho, H., Serra, P. & Robalo Silva, J. (2002b). Blood and intrauterine leukocyte profile and function in dairy cows that spontaneously recovered from postpartum endometritis. *Reproduction in Domestic Animals*, 37, 176-180.
- Mateus, L., Costa, L. L., Diniz, P. & Ziecik, A. (2003). Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 76, 143-154.
- Meira Júnior, E. B. S. (2010). Estudo comparativo entre a vaginoscopia, a ultrassonografia e a histopatologia para o diagnóstico de endometrite em vacas de raça holandesa. Dissertação de Pós-Graduação em Clínica Veterinária. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo.
- Meira Júnior., E., B., S., Henriques, L., C., S., Sá, L., R., M. & Gregory, L. (2012). Comparison of ultrasonography and histopathology for the diagnosis of endometritis in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 95, 1-5.
- Mellado, M., Zuñiga, A., Veliz, F. G., de Santiago, A., Garcia, J. E & Mellado, J. (2012). Factors influencing pregnancy per artificial insemination in repeat-breeder cows induced to ovulate with CIDR-based protocol. *Animal Reproduction Science*, 134, 105-111.
- Noakes, D., Parkinson, T. & England, G. (2001a). The puerperium and the care of newborn. In D. E. Noakes, T. J. Parkinson, & G. C. England, *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, (8th ed.). (pp. 189-202). London, United Kingdom: Saunders, Elsevier.
- Noakes, D., Parkinson, T. & England, G. (2001b). Veterinary control of herd fertility. In D. E. Noakes, T. J. Parkinson, & G. C. England, *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, (8th ed.). (pp. 511-556). London, United Kingdom: Saunders, Elsevier
- Novagen website. (2013). Bio Ozotech™ O₃. Acedido em Agosto, 27, 2013, disponível em: www.novagen.info/index.aspx?m=53&did=81.
- Ogata, A. & Nagahata, H. (2000). Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. *Theriogenology*, 62, 681-686.
- Ohtsuka, H, Ogata, A., Terasaki, N., Koiwa, M. & Kawamura, S. (2006). Changes in leukocyte population after ozonated autohemoadministration in cows with inflammatory diseases. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 68, 175-178.
- Perez-Marin, C. C., Moreno, L. M. & Calero, G. V. (2012) Clinical approach to the repeat breeder cow syndrome. In C. C. Perez-Marin (Ed.), *A Bird's-eye View of Veterinary Medicine*. (pp.337-362). Acedido em Jun. 2, 2013, from *Intech* website: <http://www.intechopen.com/books/a-bird-s-eye-view-of-veterinary-medicine/clinical-approach-to-the-repeat-breeder-cow-syndro>
- Potter, T. J., Guitian, J., Fishwick, J., Gordon, P. J. & Sheldon, I. M. (2010). Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology*, 74, 127-134.
- Pursley, J. R., Me, M. O. & Wiltbank, M. C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows with PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology*, 44, 915-923

- Re, L., Mawsouf, M. N., Menéndez, S., León, O. S., Sánchez, G. M. & Hernández, F. (2008). Ozone therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential. *Archives of Medical Research*, 39, 17-26.
- Rodrigues, C. A., Teixeira, A. A., Ferreira, R. M., Ayres, H., Mancilha, R. F., Souza, A. H. & Baruselli, P. S. (2010). Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, 118, pp. 110-117.
- Santos, J. P. (2007). Impact of Nutrition on Dairy Cattle Reproduction. Mid-South Ruminant Nutrition, (pp. 35-48). Arlington, Texas. Acedido em Jan. 6, 2014, disponível em: <http://txanc.org/wp-content/uploads/2011/08/Santos-manuscript-final-2007.pdf>.
- Santos, T. M. A., Gilbert, R. O. & Bicalho, R. C. (2011). Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94, 291-302.
- Sakaguchi, M. (2011). Practical aspects of the fertility of dairy cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 57, 17-33.
- Scrollavezza, P., Ansaloni, F., Poliori, P., Ablondi, M., Pogliacani, B. (2002) Ozonized autohemotherapy, a new method to treat dairy cow acute interdigital phlegmon. Comparison with ceftiofur and oxytetracycline. *Italian Journal of Animal Science*, 1, 211-216.
- Sheldon, I. M., Barret, D. C., Boyd, H. (2008a). Período pós-parto. In A. H. Andrews, R. W. Blowey, H. Boyd, R. G. Eddy. *Medicina Bovina: Doenças e criação de bovinos* (2ed.), (pp. 448-466). São Paulo: Editora Roca Ltda.
- Sheldon, I. M. & Dobson, H. (2004). Postpartum uterine health in cattle. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 295-306.
- Sheldon, I. M., Lewis, G., LeBlanc, S. & Gilbert, R. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65, 1516-1530.
- Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. N., Pfeiffer, D. U. & Dobson, H. (2002). Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*, 123, 837-845.
- Sheldon, I. M., Williams, E., Miller, A., Nash, D. & Herath, S., (2008b). Uterine diseases in cattle after parturition. *The Veterinary Journal*, 176, 115-121.
- Silva, E., Gaivão, M., Leitão, S., Jost, B. H., Carneiro, C., Vilela, C. L., Lopes da Costa, L. & Mateus, L. (2008). Genomic characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolates recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical metritis. *Veterinary Microbiology*, 132, 111-118.
- Silva, E., Leitão, S., Tenreiro, T., Pomba, C., Nunes, T., Lopes da Costa, L. & Mateus, L. (2009). Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92, 6000-6010.
- Son, D. S., Choe, C. Y., Cho, S. R., Choi, S. H., Kim, H. J., Hur, T. Y., Jung, Y. G., Kang, H. G. & Kim, I. H. (2007). A CIDR-based timed embryo transfer protocol increases the pregnancy rate of lactating repeat breeder dairy cows. *Journal of Reproduction and Development*, 53, 1313-1318.

- Souza, A. H., Silva, E. P. B., Cunha, A. P., Gümen, A., Ayres, H., Brusveen, D. J., Guenther, J. N., Wiltbank, M. C. (2011). Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology*, 75, 722-733.
- Spencer, T. E. & Bazer, F. W. (2002). Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Frontiers in Bioscience*, 7, 1879-1898.
- Thatcher, W. W., Guzeloglu, A., Mattos, R., Binelli, M., Hansen, T. R. & Pru, J. K. (2001). Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology*, 56, 1435-1450.
- Thatcher, W. W., Guzeloglu, A., Meikle, A., Kamimura, S., Bilby, T., Kowalski, A. A., Badinga, L., Pershing, R., Bartolome, J & Santos, J. E. P. (2003). Regulation of embryo survival in cattle. *Reproduction Supplement*, 61, 253-266.
- Turner, M. L., Healey, G. D., & Sheldon I. M. (2012). Immunity and inflammation in the uterus. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 402-409.
- Vandeplassche, M. (1987). Immunité et metrite. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 163, 127-133.
- Vieira, R. J. (2011). Transtornos endócrinos e metabólicos na reprodução de vacas leiteiras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35, 286-292.
- Wentworth, P. Jr., McDunn, J. E., Wentworth, A. D., Takeuchi, C., Nieva, J., Jones, T., Bautista, C., Ruedi, J. M., Gutierrez, A., Janda, K. D., Babior, B. M., Eschenmoser, A., Lerner, R. A. (2002). Evidence of antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. [Abstract]. *Science*, 298, 2195.
- Williams, E., Fischer, D., Noakes, D., England, G., Rycroft, A., Dobson, H. & Sheldon, I.M. (2007). The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*, 68, 549-559.
- Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D. U., England, G. C. W., Noakes, D. E., Dobson, H. & Sheldon, I. M. (2005). Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, 63, 102-117.
- Yamashita, K., Miyoshi, T., Arai, T., Endo, N., Itoh, H., Makino, K., Mizugishi, K., Uchiyama, T. & Sasada, M. (2008). Ozone production by amino acids contributes to killing of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 16912–16917.
- Zobel, R. (2013). Endometritis in Simmental cows: incidence, causes, and therapy options. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 37, 134 -140.
- Zobel, R., Tkalčić, S., Štoković, I., Pipal, I. & Buić, V. Efficacy of ozone as a novel treatment option for urovagina in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 293-298.

VI. ANEXOS

Tabela 12. Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados (ponto 4. do trabalho experimental).

Grupo	nº da casa	Idade	nº de partos	Intervalo parto-1ª IA	DEL	Prod. de leite à IA do ensaio	Obs. Pós-parto	nº de serviços	Data última IA
Controlo	7134	5	2	52	181	28,7	RP	5	28/08/2012
Controlo	8193	3	2	47	112	23,6	PP normal	2	25/09/2012
Controlo	6173	6	3	49	113	35,9	Hipertermia	2	28/09/2012
Controlo	6124	6	4	68	131	41,5	Hipertermia	2	27/09/2012
Controlo	6163	6	4	45	129	17,8	EC	3	30/09/2012
Controlo	8171	4	2	47	113	21,6	PP normal	2	29/09/2012
Controlo	8004	4	2	98	203	28,7	EC	4	05/10/2012
Controlo	8094	4	3	51	114	38,8	EC	2	06/10/2012
Controlo	7096	5	3	46	109	33,2	PP normal	2	07/10/2012
Controlo	9135	3	1	61	166	28,6	EC	4	16/10/2012
Controlo	6159	6	3	79	168	41,2	EC	3	14/10/2012
Controlo	7144	5	2	46	109	29,4	RP	2	16/10/2012
Controlo	8012	4	3	50	112	35,9	RP	2	24/10/2012
Controlo	7147	5	3	86	149	42,5	RP + EC	2	23/10/2012
Controlo	7028	5	4	77	180	34,4	EC	4	28/10/2012
Controlo	9116	3	1	90	155	29	RP + EC	2	02/11/2012
Controlo	9029	4	2	65	125	30	PP normal	2	05/11/2012
Controlo	62	2	1	50	112	26,2	Hipertermia	2	30/10/2012
Controlo	9087	3	2	43	106	24,4	PP normal	2	09/11/2012
Controlo	8075	4	2	94	178	36,2	Hipertermia	3	26/11/2012
Controlo	9092	3	2	45	108	35	PP normal	2	23/11/2012
Controlo	6174	6	2	56	161	18,2	EC	4	30/11/2012
Controlo	8190	4	2	68	173	10,4	PP normal	4	07/12/2012
Controlo	6160	6	3	49	133	14,6	PP normal	3	13/12/1012

Tabela 12 (continuação). Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados (ponto 4. do trabalho experimental).

Grupo	nº da casa	Data IA+Tratamento	Touro	DG (28-32d)	DG (45-60d)	DG (90-120d)	Data cio de retorno + 2ª IA	DG Retorno (45-60d)
Controlo	7134	19/09/2012	Debutante	-	-	-	19/09/2009	Positivo
Controlo	8193	19/10/2012	Debutante	-	-	-	06/11/2012	Positivo
Controlo	6173	20/10/2012	Debutante	Positivo	Negativo	Negativo	-	-
Controlo	6124	21/10/2012	Debutante	Positivo	Positivo	Negativo	-	-
Controlo	6163	22/10/2012	Debutante	-	-	-	22/11/2012	Positivo
Controlo	8171	23/10/2012	Debutante	-	-	-	21/11/2012	Negativo
Controlo	8004	25/10/2012	Shoman	-	-	-	17/11/2012	Negativo
Controlo	8094	27/10/2012	Debutante	-	-	-	15/11/2012	Positivo
Controlo	7096	27/10/2012	Shoman	-	-	-	18/11/2012	Negativo
Controlo	9135	05/11/2012	Shoman	-	-	-	24/11/2012	Negativo
Controlo	6159	06/11/2012	Debutante	Positivo	Positivo	Positivo	-	-
Controlo	7144	06/11/2012	Shoman	-	-	-	28/11/2012	Negativo
Controlo	8012	16/11/2012	Debutante	Positivo	Positivo	Positivo	-	-
Controlo	7147	16/11/2012	Debutante	-	-	-	10/12/2012	Negativo
Controlo	7028	20/11/2012	Shoman	Positivo	Positivo	Negativo	-	-
Controlo	9116	21/11/2012	Debutante	-	-	-	21/12/2012	Positivo
Controlo	9029	21/11/2012	Debutante	-	-	-	11/12/2012	Negativo
Controlo	62	23/11/2012	Debutante	Positivo	Positivo	Positivo	-	-
Controlo	9087	01/12/2012	Shoman	Negativo	Negativo	Negativo	-	-
Controlo	8075	14/12/2012	Shoman	Negativo	Negativo	Negativo	-	-
Controlo	9092	16/12/2012	Debutante	Negativo	Negativo	Negativo	-	-
Controlo	6174	19/12/2012	Shoman	-	-	-	09/01/2013	Negativo
Controlo	8190	27/12/2012	Shoman	Negativo	Negativo	Negativo	-	-
Controlo	6160	02/01/2013	Shoman	Negativo	Negativo	Negativo	-	-

Tabela 12 (continuação). Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados (ponto 4. do trabalho experimental).

Grupo	nº da casa	Idade	nº de partos	Intervalo parto-1ª IA	DEL	Prod. de leite à IA do ensaio	Obs. Pós-parto	nº de serviços	Data última IA
Controlo	8063	5	2	47	110	23	EC	2	06/02/2013
Controlo	4	3	1	68	156	21,7	PP normal	3	08/02/2013
Controlo	116	2	1	89	152	34,6	PP normal	2	26/02/2013
Controlo	128	2	1	48	111	28,4	RP	2	04/03/2013
Controlo	9023	4	2	61	126	27,6	PP normal	2	01/03/2013
Controlo	147	2	1	58	121	35,3	PP normal	2	30/03/2013
Controlo	1006	2	1	43	110	34	RP	2	09/04/2013
Tratamento	4085	8	6	55	140	17,8	PP normal	3	15/09/2012
Tratamento	8021	4	2	62	187	30,2	Hipertermia	4	20/09/2012
Tratamento	6116	6	4	50	121	12,7	RP + EC	2	19/09/2012
Tratamento	6	2	1	84	147	36,5	EC	2	20/09/2012
Tratamento	5108	7	3	75	133	26,1	PP normal	2	23/09/2012
Tratamento	8059	4	2	83	167	30,2	PP normal	3	28/09/2012
Tratamento	7135	5	2	52	115	17,5	PP normal	2	29/09/2012
Tratamento	9102	3	1	55	139	24,1	PP normal	3	30/09/2012
Tratamento	7051	5	3	67	193	22	PP normal	5	02/10/2012
Tratamento	66	2	1	90	158	32	RP	2	28/11/2012
Tratamento	7045	5	4	78	141	24,5	EC	2	12/12/2012
Tratamento	8194	4	2	48	111	36,8	PP normal	2	08/01/2013
Tratamento	9025	4	2	81	148	39,1	RP + Piómetra	2	10/01/2013
Tratamento	6165	6	3	55	139	38,5	RP	3	05/02/2013
Tratamento	6198	6	4	75	138	34	PP normal	2	05/03/2013
Tratamento	2162	8	6	48	111	26,6	PP normal	2	13/03/2013

Tabela 12 (continuação). Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados (ponto 4. do trabalho experimental).

Grupo	nº da casa	Data IA+Tratamento	Touro	DG (28-32d)	DG (45-60d)	DG (90-120d)	Data cio de retorno + 2ª IA	DG Retorno (45-60d)
Controlo	8063	28/02/2013	Shoman	Negativo	Negativo	Negativo	-	-
Controlo	4	28/02/2013	Debutante	Positivo	Positivo	Positivo	-	-
Controlo	116	19/03/2013	Shoman	-	-	-	09/04/2013	Positivo
Controlo	128	25/03/2013	Shoman	-	-	-	15/04/2013	Negativo
Controlo	9023	25/03/2013	Shoman	-	-	-	18/04/2013	Negativo
Controlo	147	18/04/2013	Shoman	Negativo	Negativo	Negativo	-	-
Controlo	1006	29/04/2013	Shoman	Positivo	Positivo	Positivo	-	-
Tratamento	4085	07/10/2012	Debutante	Negativo	Negativo	Negativo	-	-
Tratamento	8021	10/10/2012	Debutante	-	-	-	03/11/2012	Negativo
Tratamento	6116	10/10/2012	Shoman	-	-	-	03/11/2012	Negativo
Tratamento	6	10/10/2012	Debutante	Positivo	Positivo	Positivo	-	-
Tratamento	5108	16/10/2012	Shoman	Positivo	Positivo	Positivo	-	-
Tratamento	8059	19/10/2012	Shoman	Negativo	Negativo	Negativo	-	-
Tratamento	7135	19/10/2012	Shoman	Positivo	Positivo	Positivo	-	-
Tratamento	9102	22/10/2012	Debutante	Negativo	Negativo	Negativo	-	-
Tratamento	7051	24/10/2012	Shoman	-	-	-	14/11/2012	Negativo
Tratamento	66	20/12/2012	Shoman	Negativo	Negativo	Negativo	-	-
Tratamento	7045	03/01/2012	Shoman	Negativo	Negativo	Negativo	-	-
Tratamento	8194	30/01/2013	Debutante	Positivo	Positivo	Positivo	-	-
Tratamento	9025	31/01/2013	Debutante	Positivo	Positivo	Positivo	-	-
Tratamento	6165	27/02/2013	Debutante	Positivo	Positivo	Positivo	-	-
Tratamento	6198	27/03/2013	Debutante	-	-	-	24/04/2013	Negativo
Tratamento	2162	03/04/2013	Shoman	Negativo	Negativo	Negativo	-	-

Tabela 12 (continuação). Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados (ponto 4. do trabalho experimental).

Grupo	nº da casa	Idade	nº de partos	Intervalo parto-1ª IA	DEL	Prod. de leite à IA do ensaio	Obs. Pós-parto	nº de serviços	Data última IA
Tratamento	140	2	1	49	115	28,4	EC	2	25/03/2013
Tratamento	9020	4	2	85	169	18,6	RP + Piómetra	3	23/05/2013
Tratamento	1003	2	1	50	113	37,6	PP normal	2	26/05/2013
Tratamento	121	2	1	54	117	30,9	PP normal	2	28/05/2013
Tratamento	9082	4	2	60	148	32,8	PP normal	3	01/06/2013
Tratamento	9021	4	2	94	181	26,4	RP + EC + Piómetra	3	02/06/2013
Tratamento	13	3	1	83	146	27,6	RP + EC	2	05/06/2013

Tabela 12 (continuação). Folha de Excel® que serviu de base de dados para a realização de cálculos, gráficos e tabelas, apresentados no capítulo dos resultados (ponto 4. do trabalho experimental).

Grupo	nº da casa	Data IA+Tratamento	Touro	DG (28-32d)	DG (45-60d)	DG (90-120d)	Data cio de retorno + 2ª IA	DG Retorno (45-60d)
Tratamento	140	15/04/2013	Debutante	Positivo	Positivo	Positivo	-	-
Tratamento	9020	14/06/2013	Debutante	Positivo	Positivo	Negativo	-	-
Tratamento	1003	17/06/2013	Debutante	Positivo	Positivo	Positivo	-	-
Tratamento	121	19/06/2013	Debutante	Positivo	Positivo	Positivo	-	-
Tratamento	9082	21/06/2013	Debutante	Negativo	Negativo	Negativo	-	-
Tratamento	9021	24/06/2013	Debutante	-	-	-	20/07/2013	Negativo
Tratamento	13	28/06/2013	Debutante	-	-	-	19/07/2013	Negativo

Legenda: DEL- dias em leite; EC- endometrite clínica; PP- pós-parto; RP- retenção placentária.