

Trabalho Conclusão Curso

CECÍLIA CONSTANTINO ROCHA

ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAÇÃO DA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE BOVINOS:

SUPLEMENTAÇÃO COM PROGESTERONA NO INÍCIO DO DIESTRO E DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO

CURITIBANOS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS

MEDICINA VETERINÁRIA



CECÍLIA CONSTANTINO ROCHA

**ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAÇÃO DA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE
BOVINOS: SUPLEMENTAÇÃO COM PROGESTERONA NO INÍCIO DO DIESTRO
E DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO**

Monografia submetida ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Bacharel em Medicina Veterinária. Orientador: Prof. Dr. Valério Valdetar Marques Portela Jr.

CURITIBANOS

2017

Ficha de identificação da obra

Rocha, Cecília Constantino Rocha ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAÇÃO DA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE BOVINOS : SUPLEMENTAÇÃO COM PROGESTERONA NO INÍCIO DO DIESTRO E DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO / Cecília Constantino Rocha Rocha ; orientador, Valério Valdetar Marques Portela Júnior, coorientador, Mario Binelli, 2017. 44 p. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, Graduação em Medicina Veterinária, Curitibanos, 2017. Inclui referências. 1. Medicina Veterinária. 2. Reprodução animal. 3. bovinos. 4. diagnóstico de gestação. 5. Doppler. I. Valdetar Marques Portela Júnior, Valério . II. Binelli, Mario . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Medicina Veterinária. IV. Título.

CECÍLIA CONSTANTINO ROCHA

Essa Monografia, foi julgada adequada para obtenção do título de Médica Veterinária e
aprovada em sua forma final

Curitiba, 4 de julho de 2017.

Alexandre de Oliveira Tavela
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Valério Valdetar Marques Portela Jr
Orientador

Prof. Luiz Ernani Henkes
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcos Henrique Barreta
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Denilce e minha irmã, Joana, grandes incentivadoras das minhas escolhas. Obrigada pela confiança, compreensão e pelos olhares atenciosos que jamais falharam.

Aos demais familiares que sempre se mostraram presentes, incentivando e confortando meus passos em especial minha avó Ersulina e meu avô Cecílio *in memoriam*.

A Universidade Federal de Santa Catarina, pela formação acadêmica e pelos conhecimentos adquiridos no decorrer do curso. A toda equipe do Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal, Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta pela oportunidade de estágio durante a graduação que, com certeza, foi decisivo para a escolha desse caminho e o Médico Veterinário André Goetten que auxiliou muito no meu aprendizado. Em especial, ao Prof. Dr. Valério Valdetar Marques Portela, por ter me acolhido em sua equipe de pesquisa e compartilhar suas experiências, pelos ensinamentos, pelo exemplo de dedicação à ciência, pela orientação e comprometimento com a formação profissional e científica de seus alunos.

Ao Prof. Dr. Luiz Hernani Henkes, por ter aceitado analisar este trabalho e contribuir com correções, críticas e sugestões. Ao Prof. Dr. Mário Binelli meus sinceros agradecimentos pela concessão e supervisão de estágio, pelos aprendizados e pela confiança depositada. A toda equipe da empresa Vale do Embrião pela oportunidade de acompanhamento das atividades. Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular da Universidade de São Paulo.

Agradeço carinhosamente meus colegas de graduação pelos momentos compartilhados, aos meus amigos, com os quais também dividi as angústias e dificuldades durante esses cinco anos. Enfim a todos que de alguma forma contribuíram, compartilho esse momento tão especial e de grande alegria.

E finalmente agradeço a Deus, por despertar o gosto pela Medicina Veterinária, por proporcionar este momento e tornar a vida mais afetuosa, com uma família maravilhosa e amigos sinceros.

Sou feita de retalhos...

Pedacinhos coloridos de cada vida que passa pela minha e que vou costurando na alma. Nem sempre bonitos, nem sempre felizes, mas me acrescentam e me fazem ser quem eu sou. Em cada encontro, em cada contato, vou ficando maior... em cada retalho, uma vida, uma lição, um carinho, uma saudade... que me tornam mais pessoa, mais humana, mais completa...

Portanto obrigada a cada um de vocês que fazem parte da minha vida e que me permitem engrandecer minha história com retalhos deixados em mim.

Que eu também possa deixar pedacinhos de mim pelos caminhos e que eles possam ser parte das suas histórias. E que assim de retalho em retalho, possamos nos tornar, um dia, um imenso bordado de nós.

(Cora Coralina, 1985)

RESUMO

A bovinocultura é uma das principais atividades produtivas do agronegócio brasileiro. Os bovinos estão presentes em cerca de 2,6 milhões de estabelecimentos no Brasil. O cenário atual tem exigido eficiência no sistema de produção de bovinos e para aumentarmos a eficiência reprodutiva do rebanho são necessárias melhorias nas biotecnologias aplicadas a reprodução. Como alternativas para essas melhorias se tem a suplementação com a progesterona no diestro e o diagnóstico precoce de gestação, este podendo ser pela ultrassonografia em modo Doppler e pela detecção de genes estimulados por interferon tau em células do sangue periférico. Outra metodologia para auxiliar no estudo do trato reprodutivo é o uso da citologia endometrial para detecção de transcritos facilitando o entendimento do ambiente uterino de um animal fértil ou infértil.

Palavras chave: biotecnologias, Doppler, interferon tau, citologia endometrial, reconhecimento materno.

ABSTRACT

Bovine farming is one of the main productive activities of Brazilian agribusiness. The cattle are present in about 2.6 million establishments in Brazil. The current scenario has required efficiency in the cattle production system and to improve the reproductive efficiency of the herd, improvements in the biotechnologies applied to reproduction are necessary. Alternatives to these improvements include supplementation with progesterone in the diestrus and early diagnosis of pregnancy, which may be by Doppler ultrasonography and the detection of interferon-stimulated genes in peripheral blood cells. Another methodology to aid in the study of the reproductive tract is the use of endometrial cytology to detect transcripts facilitating the understanding of the uterine environment of a fertile or infertile animal.

Key words: Biotechnologies, Doppler, interferon tau, endometrial cytology, maternal recognition.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVO GERAL	12
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 AMOSTRAS ENDOMETRIAIS DE CITOLOGIA	13
3.2 SUPLEMENTAÇÃO COM PROGESTERONA NO DIESTRO	14
3.3 DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO PELA FUNCIONALIDADE DO CORPO LÚTEO E EXPRESSÃO ISGS	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 AMOSTRAS ENDOMETRIAIS DE CITOLOGIA	22
4.2 SUPLEMENTAÇÃO COM PROGESTERONA NO DIESTRO	23
4.3 DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO PELA FUNCIONALIDADE DO CORPO LÚTEO E EXPRESSÃO ISGS	24
5 DISCUSSÃO	27
5.1 AMOSTRAS ENDOMETRIAIS DE CITOLOGIA	27
5.2 SUPLEMENTAÇÃO COM PROGESTERONA NO DIESTRO	29
5.3 DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO PELA FUNCIONALIDADE DO CORPO LÚTEO E EXPRESSÃO ISGS	31
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura é uma das principais atividades produtivas do agronegócio brasileiro. Os bovinos estão presentes em cerca de 2,6 milhões de estabelecimentos no Brasil, segundo o último Censo Agropecuário, totalizando algo próximo a 171 milhões de cabeças de bovinos (CEPEA-USP/CNA, 2009). O cenário atual tem exigido eficiência no sistema de produção de bovinos devido à crescente demanda por alimentos no mundo. E a lucratividade do sistema de produção de gado está intimamente relacionada com a eficiência reprodutiva do rebanho.

Para melhorarmos a eficiência reprodutiva do rebanho são necessárias melhorias nas biotecnologias aplicadas a reprodução. Precisamos desvendar qual o mecanismo de funcionamento do ciclo estral de bovinos, para podermos adequar outras tecnologias que sejam possíveis. Nos últimos anos, uma das técnicas mais utilizadas para refletir o que se passa no ambiente uterino, é a biologia molecular, porém as técnicas existentes para coleta de amostras resultam em baixa qualidade, ou impossibilitam uma avaliação ao longo do tempo, inviabilizando o desenvolvimento de estudos de certo período do ciclo estral. A partir dessa problemática é que se iniciou a coleta de amostras por citologia endometrial.

Além disso, apesar do Brasil ser líder na produção de embriões, a taxa de concepção ainda é baixa, somente 50% das fêmeas tornam-se prenhes quando é realizado transferência de embriões ou inseminação artificial em tempo fixo. Isso acontece em sua maioria por falhas no reconhecimento da gestação. A partir disso percebe-se primeiramente que é necessário reduzir essas perdas ao mínimo possível avaliando quais falhas reprodutivas podem acontecer nesse período e não tornar o animal gestante e a suplementação com progesterona no diestro é uma das alternativas a serem realizadas para melhora na taxa de prenhez.

Outro ponto importante sobre o reconhecimento da gestação é que se perdas embrionárias estão acontecendo nesse período em que se tem o reconhecimento materno, deve existir algum modo de utilizar a detecção dessas perdas, para diagnosticar a gestação e inseminar novamente esse animal. Uma vez que o reconhecimento da gestação acontece através da secreção de interferon-tau, a avaliação da expressão de genes estimulados por interferon (ISGs) é uma das alternativas de avaliar se o reconhecimento aconteceu ou não, e assim antecipar o diagnóstico de gestação. Outra possibilidade é a avaliação de perfusão sanguínea do CL no Doppler, e a partir disso identificar se a luteólise aconteceu.

Essas são algumas das alternativas existentes em pesquisas na reprodução animal, que tem por finalidade melhorar a taxa de gestação de bovinos, e assim aumentar a lucratividade do produtor.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi apresentar e discutir algumas biotecnologias da reprodução de bovinos, executadas durante o estágio curricular em medicina veterinária.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Apresentar uma nova metodologia de coleta de amostras endometriais, menos invasiva e de maior qualidade

-Discutir sobre os pontos positivos e negativos da suplementação com progesterona no diestro.

-Explicar sobre duas formas principais de diagnóstico precoce de gestação no dia 20 pós ovulação, presentes na literatura.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 AMOSTRAS ENDOMETRIAIS DE CITOLOGIA

O cytobrush é uma escova de citologia endometrial humana que pode ser realizado no trato reprodutivo de bovinos, sua utilização é muito frequente para avaliar possíveis lesões nos tecidos uterinos (GILBERT et al., 1998). Este exame frequentemente vem sendo utilizado como uma alternativa, substituindo, em alguns casos, técnicas de biopsias, ou lavagens endometriais, que serviam anteriormente para detectar problemas uterinos. As suas principais vantagens são a rapidez e praticidade comparada aos demais.

A técnica de escova citológica pode ser usada com sucesso e confiabilidade para obter amostras endometriais, resultando em uma porcentagem média de células polimorfonucleares significativamente maior que a técnica de lavagem, principalmente nas quatro semanas iniciais do puerpério (KASIMANICKAM et al., 2005).

Muitos estudos já comprovaram que a citologia endometrial, pode ser uma prova diagnóstica de utilidade para identificar vacas com inflamação uterina subclínica que não tem sido identificada por outras provas diagnósticas de rotina (GILBERT et al., 2005; KASIMANICKAM et al., 2005; SANTOS et al., 2006). Contudo recentemente essa técnica está sendo descrita com sucesso para detecção de mudanças moleculares que acontecem no ciclo estral, podendo ser usada na detecção e mensuração da abundância de genes expressos no endométrio (CARDOSO et al., 2017 dados submetidos para publicação).

Tanto em humanos como nos animais a citologia tem sido superior aos outros métodos para coleta de células cervicais e endometriais justificando seu uso (DONZO, 2007). Já foi demonstrado também que a citologia pode ser usada com confiabilidade para se obter amostras de endométrio em bovinos, pois resulta em menor distorção das células comparado ao lavado uterino, é mais sensível, consistente e produz resultados rápidos (KASIMANICKAM et al., 2005).

Diferente da técnica de biópsia uterina que possui uma maior porção de marcadores do estroma endometrial e de células vasculares, as amostras de endométrio obtidas através da citologia contêm uma maior quantidade de marcadores de células epiteliais e células imunes (CARDOSO et al., 2017 dados submetidos para publicação). Comprovando assim, que a citologia é útil para coleta de amostras de células superficiais do endométrio.

Já foi demonstrado que 70% das vacas em que foram realizadas citologia endometrial engravidaram após uma única inseminação artificial no estro subsequente (CARDOSO et al., 2017 dados submetidos para publicação). Isso indica que a técnica não interfere com a fertilidade imediata, reforçando sua segurança.

Outro fato importante é que as amostras citológicas possuem marcadores endometriais regulados por esteroides sexuais, como o receptor de progesterona, prostaglandina E e estradiol. Dessa forma a citologia endometrial pode ser considerada uma metodologia extremamente confiável em estudos do trato reprodutivo (CARDOSO et al., 2017 dados submetidos para publicação).

3.2 SUPLEMENTAÇÃO COM PROGESTERONA NO DIESTRO

O ciclo estral é o ritmo funcional dos órgãos reprodutivos da fêmea, composto de modificações morfofisiológicas ligadas à reprodução, este pode ser dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro (OLIVEIRA, 2006).

O diestro é a fase de maior duração e ocorre sob o predomínio de progesterona, dura cerca de 13 a 15 dias, terminando com a regressão fisiológica do CL e um novo ciclo se iniciando. Quando o animal se torna gestante o diestro será prolongado, e a vida útil do CL também. Assim são mantidos os altos níveis de progesterona durante a gestação.

São vários os hormônios que controlam o ciclo estral dos bovinos. De uma maneira geral, o GnRH é secretado pelo hipotálamo através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário e na hipófise e estimula a liberação das gonadotrofinas (hormônio luteinizante {LH} e hormônio folículo estimulante {FSH}). Via corrente circulatória, as gonadotrofinas chegam até o ovário, onde o FSH estimula o crescimento folicular e o LH estimula as células da teca a secretarem testosterona e androstenediona, que através da enzima aromatase é convertida em estradiol nas células da granulosa, por ação do FSH (OLIVEIRA, 2006). Então o estrógeno está diretamente ligado ao desenvolvimento dos folículos, e também a manifestação do estro.

O pico de LH é o responsável pelo crescimento final do folículo dominante, ovulação e início do processo de luteinização, onde as células foliculares diferenciam-se em células luteínicas secretoras de progesterona e que darão origem ao CL. A produção de progesterona alcança seu limite máximo e estabiliza-se por volta de cinco a sete dias após a formação do CL. Enquanto a progesterona permanecer em níveis elevados na circulação haverá redução na

liberação de GnRH e gonadotrofinas (OLIVEIRA, 2006), não havendo LH com frequência e amplitude adequada para que ocorra o estro e ovulação.

Vacas com folículos em desenvolvimento (antes da seleção), possuem baixas concentrações de estradiol no próestro, pois é o folículo dominante o responsável pela produção desse hormônio em níveis elevados. Esse folículo pequeno, dará origem a um corpo lúteo pequeno e conseqüentemente baixos níveis de progesterona no diestro, com baixas taxas de prenhez (PERRY et al., 2005).

Para corrigir alguns desses problemas, protocolos hormonais de sincronização utilizam a suplementação com cipionato de estradiol 24 ou 48 horas antes da IATF (SÁ FILHO et al., 2012). Essa suplementação tem como objetivo uma maior concentração de estradiol durante as fases de estro e próestro, modificando o ambiente embrionário o que auxilia no processo de fertilização, desenvolvimento embrionário inicial e estabelecimento da gestação (PERRY et al., 2008).

Embora a suplementação com cipionato de estradiol, 24 ou 48 horas antes da IA tenha sido implementada na rotina dos protocolos hormonais, o número de animais gestantes resultantes dessa metodologia ainda continua baixo.

Outra alternativa interessante para aumentar os níveis séricos de P₄ durante o início do diestro é a suplementação com progesterona. A progesterona é o hormônio responsável pela manutenção da gestação e sua secreção pelo CL durante o início da gestação pode ser influenciada pelo tamanho do folículo ovulatório e possui significativo efeito na sobrevivência do embrião em bovinos (GARRET et al., 1998; CARTER et al., 2008). Nesse contexto vacas estimuladas a ovular com folículos menores, terão CLs menores e produzirão pouca progesterona no diestro.

Sendo assim, altas concentrações de P₄ durante o diestro inicial dos bovinos são necessárias, pois estimulam as secreções endometriais, favorecem o desenvolvimento embrionário e a produção de interferon-tau pelo concepto (MANN & LAMMING, 2001). Além disso, baixas concentrações de progesterona até o dia 16 do ciclo estral estão associadas com embriões menores, que por sua vez produzem menores quantidades de IFN-t afetando a supressão da secreção endometrial de prostaglandina F_{2α}.

O aumento da P₄ circulante durante o período inicial da gestação aumenta em média 5% a taxa de gestação, mas quando essa for realizada após o dia 6 de gestação seu efeito não é benéfico (MANN & LAMMING, 1999). Outro fato importante é que a suplementação com P₄ antes do dia 2 pode comprometer o desenvolvimento do CL e reduzir a fertilidade (CLEEF et al., 1996). Partindo desse princípio, os melhores dias para suplementação com progesterona são do dia 3 ao dia 6 após a ovulação.

A suplementação com progesterona exógena é vantajosa em vacas que são sincronizadas durante o anestro pós-parto, pois aumenta em 20% a taxa de concepção (PUGLIESI et al., 2014). Já quando o status reprodutivo do animal sincronizado não é levado em consideração a suplementação com progesterona de longa ação não altera a fertilidade. Porém, vacas com CLs pequenos são beneficiadas resultando em maior taxa de gestação, independente do status reprodutivo no momento do protocolo (PUGLIESI et al., 2014).

3.3 DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO PELA FUNCIONALIDADE DO CORPO LÚTEO E EXPRESSÃO ISGS

A implantação do blastocisto junto ao útero materno é uma adaptação embrionária associada com a viviparidade, requerida para sustentar a nutrição e a proteção do concepto durante a gestação (SPENCER et al., 2004). Nas espécies mamíferas, diferentes estratégias estão envolvidas no processo de implantação. No caso dos ruminantes domésticos, o blastocisto evolui da forma esférica para tubular, alonga-se rapidamente, e as membranas embrionárias são formadas antes da implantação (SPENCER et al., 2004). Nessas espécies, o mecanismo de reconhecimento materno da gestação ocorre no período pré-implantação.

A expressão “reconhecimento materno da gestação” foi definida por Roger Short, em 1969, como o processo pelo qual o concepto sinaliza sua presença à mãe, com o objetivo de prolongar a vida do CL e manter a gestação (revisado por SPENCER & BAZER, 2004).

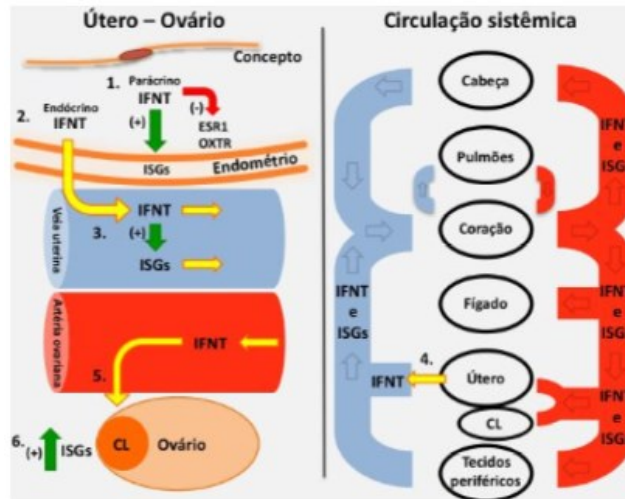
No início da década de 80, foi purificada uma proteína secretada pelo concepto ovino que expressava características antiluteolíticas, essa proteína, foi inicialmente denominada trofoblastina ovina (TP-1) (GODKIN et al., 1982). Em experimentos posteriores, a TP-1 foi sequenciada e renomeada como Interferon-tau (IFN- τ), com sua função antiluteolítica comprovada e associada ao reconhecimento materno da gestação em ruminantes (IMAKAWA et al., 1987).

Nos ruminantes a fase de reconhecimento materno ocorre entre o 12º e o 26º dia de gestação, quando a proteína IFN-t é secretada, com pico entre os dias 15 e 16 (ROBERTS et al., 1992).

O mecanismo geral pelo qual o IFN- τ inibe a regressão do CL é pela supressão da liberação pulsátil de PGF2 α endometrial. Sabe-se que o IFN- τ produzido pelas células do trofoderma do embrião atua de maneira parácrina no tecido materno, suprimindo a transcrição de genes para receptores de ocitocina (OTR) e de estradiol (ESR 1 e 2) no endométrio (Figura 1) (LAMMINING et al., 1995; SPENCER & BAZER, 1995).

Os receptores de interferon são expressos em todos os tecidos corporais e têm como função principal mediar respostas antivirais, estando localizados também no útero para mediar respostas maternas em função do IFN- t produzido pelo concepto (ROSENFELD et al., 2002). O IFN- t se liga a esses receptores a exerce sua função através da via de sinais de transdução Jack/STAT (BINELLI et al., 2001).

Quando o IFN- t se liga aos seus receptores ocorre a expressão de genes estimulados por interferon (ISGs) (HANSEN et al., 1999). Dentre os ISGs que aumentam sua expressão durante o início da gestação em resposta ao IFN-t, estão o 2',5' oligoadenilato sintetase (OAS) (MIRANDO et al., 1999), o gene de resistência ao myxovirus 1 e 2 (MX1 e MX2) (OTT et al., 1998) e o gene estimulado pelo interferon 15 (ISG15) (NAIVAR et al., 1995). O fato mais importante com relação aos ISGs, é que estudos recentes demonstraram sua expressão no útero, corpo lúteo, linfócitos do leite e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), essa última podendo ser isolada e usada como forma de comprovação do reconhecimento materno (PUGLIESI et al., 2014).



Fonte: Antoniazzi et al., 2011.

Figura 1: demonstração da função parácrina e endócrina do IFN-t

A células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) são definidas como qualquer célula sanguínea com um núcleo redondo (isto é, um linfócito ou um monócito). Estas células sanguíneas são um componente crítico no sistema imunológico para combater a infecção e se adaptar a intrusos e frequentemente são extraídas do sangue total utilizando o Ficoll®, um polissacárido hidrofílico que separa camadas de sangue, com monócitos e linfócitos formando um revestimento leucocitário sob uma camada de plasma. Este revestimento é o que contém as PBMCs (ZENBIO, 2016).

Ainda não existe o estabelecimento de níveis exatos de ISGs nas PBMCs que confirmem a gestação. Sabe-se que em alguns animais de um estudo, os níveis mais baixos de expressão individual para OAS1 e MX2 (ambos ISGs) em vacas gestantes foram 10 vezes maiores do que os menores valores medidos em vacas não gestantes (PUGLIESI et al., 2014). Porém quando estabelecido um ponto de corte para determinação de prenhez, apesar de resultar em uma sensibilidade moderada, teve uma especificidade baixa (PUGLIESI et al., 2014). Outra situação que dificulta o estabelecimento do ponto de corte é que o PCR será mensurado em desiguais condições, por profissionais diferentes dependendo do local a ser realizado, causando variabilidade na técnica utilizada e na experiência de quem realiza, na concentração dos *primers*, e da amostra no momento da validação, podendo alterar os resultados das análises.

Outra metodologia possível de ser utilizada no diagnóstico precoce de gestação é a avaliação da perfusão sanguínea do CL pela ultrassonografia em modo Doppler. A função luteal

é responsável pela duração e regularidade dos ciclos estrais, pelo controle da ocorrência de ovulações e pela manutenção da gestação. A avaliação do CL fornece informações importantes sobre o estado reprodutivo da fêmea bovina e possibilita a adequação de procedimentos de manipulação ou sincronização do ciclo estral. Identificar corretamente a presença de um CL e estimar o seu estado funcional são pontos importantes para o êxito da atividade reprodutiva (BATTOCCHIO et al., 1998).

O diagnóstico de palpação retal apresenta limitações como método de avaliação do CL (SPRECHER et al., 1989) pois, a projeção do CL nem sempre está associada ao tamanho do mesmo, ou seja, uma vaca que possui CL com pouca projeção pode apresentar a maior parte do mesmo dentro do estroma ovariano, enquanto outra com CL de maior projeção pode ter massa total pequena, dada a reduzida porção interna. Já análise da concentração de P4 no plasma é o padrão de referência para a avaliação da função luteal, porém possuem inconvenientes como o custo e o intervalo de tempo entre a coleta da amostra e o resultado (HERZOG et al., 2010).

A técnica de ultrassonografia se destaca como um método que permite a completa visualização do tecido luteal, possibilitando maior precisão na identificação e mensuração do CL (RIBADU et al., 1994), contudo a ultrassonografia em modo B, permite apenas a avaliação do tamanho do CL, e sabe-se que esse não é o parâmetro mais adequado para a avaliação do seu estado funcional (VERONESI et al., 2002). Os níveis de P4 basicamente dependem do fluxo sanguíneo ao CL, que pode ser quantificado de forma confiável por ultrassonografia transretal em modo Doppler (ACOSTA et al., 2002).

O corpo lúteo é uma glândula acessória que surge das células do folículo pré-ovulatório. O folículo pré-ovulatório produzirá grandes quantidades de estrógeno que irão desencadear o pico de LH e posterior ovulação (BERTAN et al., 2006). A luteinização se inicia antes da ovulação, através de mudanças na população de receptores de gonadotrofinas (MOURA, 2003). A parede do folículo recém ovulado é colapsada e sua cavidade é invadida por líquido, principalmente sangue e linfa, conseqüentemente tem-se a formação do corpo hemorrágico, que a partir da influência de fatores mitogênicos e angiogênicos formará o CL propriamente dito (BERISCHA et al., 2005). O desenvolvimento do CL e sua capacidade de produzir P₄, fatores de crescimento, fatores angiogênicos e substâncias vasoativas dependem de sua vascularização. Por isso, o fluxo sanguíneo para o CL é maior do que para qualquer outro

tecido do corpo. No diestro de 65 a 95% do fluxo sanguíneo do ovário é destinado ao CL (WILTBANK, 1994).

Aproximadamente 15 a 18 dias após a ovulação, na ausência da fertilização ou na incapacidade de sinalização do concepto, o reconhecimento de gestação não acontece e pulsos de $PGF2\alpha$ são liberados pelas células endometriais, para promover a falência funcional e estrutural do corpo lúteo determinando o término deste ciclo (KAWATE et al., 2000)

Durante a formação do CL há o desenvolvimento de uma rede de capilares responsáveis pela vascularização. Ao longo da fase lútea há o aumento dessa vascularização acompanhando a dinâmica de aumento da secreção de progesterona. Quando a luteólise se inicia nota-se a diminuição da irrigação do CL e da síntese de progesterona (MIYAMOTO et al., 2005)

A luteólise pode ser definida em três fases: pré luteólise, luteólise e pós luteólise. A pré luteólise é caracterizada por grandes oscilações de progesterona, entre 3 e 4ng/ml, seja aumentando ou diminuindo. A luteólise é a fase em que a P_4 diminui até as concentrações basais. E a pós-luteólise é quando a P_4 se mantém nas concentrações basais por mais de 24 horas de observação (GINTHER et al., 2010).

No momento da luteólise ocorre um breve aumento do fluxo sanguíneo seguido de um decréscimo e essa dinâmica é acompanhada por modificações semelhantes da secreção de progesterona (MIYAMOTO et al., 2005). O aumento no fluxo sanguíneo inicial é devido à ação da $PGF2\alpha$ seja ela administrada de forma sistêmica ou intrauterina (GINTHER et al., 2007).

Apesar da luteólise acontecer próximo dos 18 dias do ciclo estral, o diagnóstico pelo Doppler, não é confiável nesse período e sim no dia 20 (PUGLIESI et al., 2014), pois quando avaliado o CL pelo fluxo sanguíneo e área total, no dia 18, 20 e 22, o número de animais não gestantes detectados foi de 25% (3/12), 91,7 (11/12) e 91,7 (11/12) respectivamente. Demonstrando assim que no dia 18, 75% dos animais não gestantes não são identificados no diagnóstico, mas que a partir do dia 20 a avaliação do CL para o diagnóstico de gestação (91,7) tem uma boa acurácia (PUGLIESI et al., 2014).

O diagnóstico precoce de gestação foi implementado primeiramente em bovinos de leite, porém resultou em baixa sensibilidade, e acurácia. Contudo, quando utilizado em bovinos de corte sua acurácia foi alta e a sensibilidade de 100%.

Já foi demonstrado que o diagnóstico de gestação utilizando a ultrassonografia em modo Doppler no dia 20 da gestação, correlacionando a área do CL e os sinais de fluxo sanguíneo tem uma sensibilidade de 100%, uma especificidade de 85,5% e uma acurácia de 91% (PUGLIESI et al., 2014).

A maioria dos equipamentos de ultrassonografia Doppler atuais permitem três métodos de avaliação da perfusão sanguínea: modo Espectral, modo Power-Doppler e modo Color-Doppler. O modo Color Doppler é o mais utilizado, nele as diferenças de frequência são codificadas na forma de sinais coloridos na tela do equipamento sobre uma imagem em modo B (escala de cinza) convencional. Diferenças positivas (fluxo sanguíneo em sentido ao transdutor) e negativas (fluxo sanguíneo em sentido contrário ao transdutor) são indicadas por cores diferentes, que são geralmente em tons de vermelho a amarelo e azul a verde (PUGLIESI et al., 2017).

Sendo assim, a detecção da regressão estrutural do CL baseado no tamanho e vascularização com ultrassonografia em modo Doppler, pode ser usada para diferenciar animais gestantes de não gestantes, a partir do dia 20 pós IA. No entanto um recente estudo usando somente a avaliação visual do fluxo sanguíneo e desconsiderando a área com Doppler forneceu uma alta acurácia sobre as fêmeas não gestantes com 20 dias após a IA (SIQUEIRA et al., 2013) isso porque já se afirma que somente o fluxo sanguíneo do CL já é o suficiente para correlacionar positivamente com os níveis plasmáticos de P4 com a luteólise. Sabe-se que durante o desenvolvimento precoce do CL o fluxo sanguíneo aumenta paralelamente ao aumento da concentração circulante de progesterona, sendo então a vascularização associada com o potencial luteal em produzir progesterona (ACOSTA et al., 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS ENDOMETRIAIS DE CITOLOGIA

Na realização da citologia endometrial, uma anestesia epidural com lidocaína foi aplicada, fornecendo um bom relaxamento do trato reprodutivo do animal. Para obter as amostras, utilizou-se um aplicador convencional de IA de aço inoxidável, que na sua extremidade dianteira estava acoplado uma escova estéril utilizada na ginecologia humana (Figura 2). Tudo isso era protegido por uma bainha de plástico e camisinha sanitária, para evitar a contaminação com células da vagina e cérvix, rompendo essas duas proteções, quando a escova citológica adentrava o corpo do útero para coleta do material (CAMPERO, 2008). Depois de realizado a coleta, todo o aparato é retirado do aparelho reprodutor, e diferentemente da citologia onde a amostra é colocada em lâminas histológicas para avaliação celular, a escova era armazenada em um criotubo contendo TRIzol®, a -80°C para posterior processamento e PCR.

Alguns cuidados foram ressaltados durante a realização da coleta: todo o ambiente estava limpo e organizado, principalmente a mesa onde era montado o aplicador. Como as amostras são utilizadas para biologia molecular, todos os materiais e principalmente o criotubo de armazenamento, eram livres de DNase e RNase, bem como as luvas utilizadas na realização do procedimento.

Os animais submetidos a coleta da amostra deviam ser previamente higienizados na região da vulva e períneo com água e sabão para evitar infecções ascendentes. Vale ressaltar que muitas das vezes a coleta de amostra para citologia era realizada durante todo o período do ciclo estral, e nas fases onde o hormônio predominante não foi o estradiol o útero encontrava-se flácido, nesse momento a passagem do aplicador pela cérvix era dificultada e realizada cuidadosamente para que não ocorressem lesões e o entortamento da escova citológica.

Para se obter uma amostra com grande quantidade de células, bastava expor a escova citológica no ambiente uterino e roda-la duas vezes, depois recolher novamente dentro da palheta. Duas voltas com a escova já se obtêm células suficientes para realização da biologia molecular.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 2: Escova ginecológica (Cytobrush) acoplada ao inovulador para realização do exame ginecológico

4.2 SUPLEMENTAÇÃO COM PROGESTERONA NO DIESTRO

A suplementação com progesterona pode ser realizada com progesterona exógena injetável, oral e por implante intravaginal, ou endógena através da indução de corpos lúteos acessórios.

A indução de corpos lúteos acessórios pode ser feita através do seguinte protocolo hormonal: aplicação de GnRH, cinco dias após a inseminação artificial (D5), e de hCG no D12 (MACHADO et al., 2010). Hipoteticamente nesse protocolo, o GnRH deve causar a ovulação de um folículo em crescimento (primeira onda folicular) com a conseqüente formação de um corpo lúteo acessório e o recrutamento de outros folículos (segunda onda de desenvolvimento). A função do hCG é induzir uma ovulação na segunda onda folicular, formando assim um segundo corpo lúteo, que será acessório e também iniciando uma nova onda (terceira). Assim, o folículo em crescimento mantém-se pequeno (menor que 8mm), produz pouco estradiol e não é capaz de induzir a luteólise antes do D19.

A suplementação com a progesterona exógena injetável de longa ação foi a metodologia utilizada no estágio curricular, neste caso uma única aplicação intramuscular de 150 mg de progesterona com seringa e agulhas esterilizadas e descartáveis foi utilizada no protocolo. É importante ressaltar que a resposta a tratamentos hormonais é individualizada,

sendo assim algumas vezes as doses podiam ser ajustadas de acordo com o médico veterinário responsável pelo projeto de pesquisa. Esse medicamento foi criado para uso comercial com outros fins ligados a lactação, onde o importante era o aumento da concentração naquele momento. Portanto não se sabe ainda qual é o tempo de meia vida exato do medicamento.

4.3 DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO PELA FUNCIONALIDADE DO CORPO LÚTEO E EXPRESSÃO ISGS

O diagnóstico de gestação realizado no dia 20 pos IA foi feito através de avaliações ultrassonográficas com transdutor linear multi-frequencial. A partir da imagem visualizada foi realizada uma avaliação subjetiva do tamanho e perfusão sanguínea do CL. Considerava-se uma fêmea não gestante aquela que apresentasse a área do CL $< 2 \text{ cm}^2$ e perfusão sanguínea demonstrada no Doppler $< 25\%$ do total da área luteal (PUGLIESI et al., 2014), ou ainda outros autores consideram não gestante aquela fêmea que não apresente sinais coloridos indicando fluxo sanguíneo na região central do CL (SIQUEIRA et al., 2013).

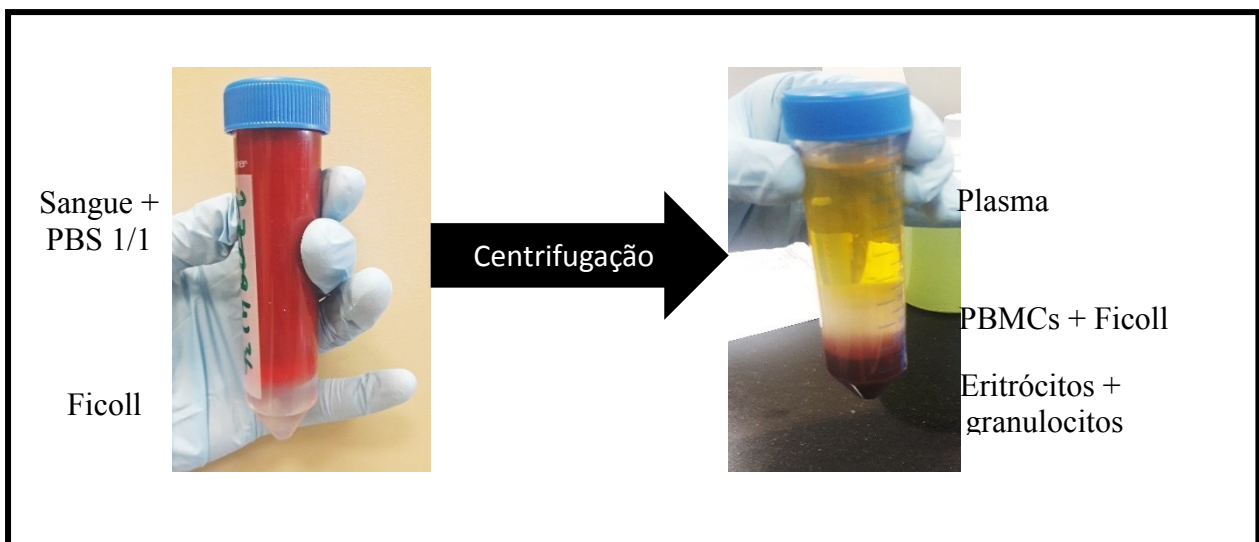
Para que a avaliação ocorresse da maneira certa a pessoa deveria estar devidamente treinada a mensurar a área do CL subjetivamente, bem como o seu fluxo. Contudo é extremamente diferente a vascularização de um CL no dia 20 de gestação entre uma vaca prenhe e vazia. Muitos autores já afirmaram que somente a avaliação da perfusão sanguínea sem o valor da área é o suficiente para o diagnóstico. Em situações onde o diagnóstico seja realizado para pesquisa ou análises estatísticas recomenda-se que a mesma pessoa realize a mesma avaliação durante todos os dias, pois a análise é extremamente subjetiva e pode mudar dentre avaliadores.

Para o diagnóstico de gestação pela expressão do mRNA dos ISGs, realizava-se o isolamento das PBMCs. As PBMCs são leucócitos e monócitos do sangue periférico, sendo assim para que possam ser obtidas amostras de sangue eram coletadas em tubos contendo heparina e encaminhadas ao laboratório. O método para o isolamento de PBMC foi o descrito por Repnik et al. (2003), e se realizava um gradiente de reagente Ficoll® (Figura 3), e sangue diluído em PBS (1/1).

São necessário 18 ml de sangue, que são adicionados e homogeneizados ao mesmo volume de PBS, o sangue diluído em PBS era despejado acima do Ficoll® (15 ml) para

realização do gradiente de Ficoll®, o tubo era centrifugado. O anel branco que se forma após a centrifugação devia ser retirado com a pipeta de Pasteur e despejado em um tubo *falcon*® de 50 ml completado com PBS até os 50ml. Uma nova centrifugação era realizada em uma velocidade de 1400 G. por 15 min a 20°C, e essa etapa era realizada duas vezes, porém na segunda antes de adicionar o PBS para lavagem incubava o pellet por 10 min com solução de lise. Logo após o sobrenadante deve ser descartado, restava apenas o pellet que era diluído em 2,5 ml de PBS em tubos livre de DNase e RNase. Para posteriormente serem armazenados a -80°C.

Para extração de RNA total da amostra de PBMCs, era utilizado TRIZol® seguido de tratamento com DNase I de acordo com as instruções do fabricante Invitrogen®. O RNA total era eluído em 30 µL de água ultra-pura DEPC, e sua concentração e pureza foram avaliadas respectivamente pela absorbância a 260nm e a razão 260/280nm mensurados no aparelho NanoVue. A síntese de cDNA foi realizada utilizando uma solução contendo 10 µl do mix “High Capacity cDNA Reverse Transcription” e 10 µL de RNA total previamente tratado com DNase, ressuspendido em água DPEC (1 µg). A solução era imediatamente incubada a 25 °C por 10 min, a 37 °C por 2 h e a 85 °C por 5 min para realização da transcriptase reversa. Essas amostras de cDNA eram armazenadas a -20 °C até análise de PCR.



Fonte: arquivo pessoal

Figura 3: Gradiente de Ficoll® antes e após centrifugação

Como as amostras eram utilizadas para a avaliação de transcritos todos os materiais utilizados eram livres de DNase e RNase. E durante a etapa de PCR existiam controles negativos para leitura além dos poços sem a amostra. Esses controles negativos eram produzidos a partir de alguma vaca que não se encontrava gestante pois, para poder determinar se a abundância de transcritos é compatível com o animal gestante, os ISGs devem estar sendo expressos 10 vezes mais que a amostra do animal não gestante, como ocorrem variações no PCR dependendo do local e de quem realiza esse controle negativo, deve ser feito em todas as placas de PCR.

5 DISCUSSÃO

5.1 AMOSTRAS ENDOMETRIAIS DE CITOLOGIA

A característica mais importante de uma amostra endometrial para realização de biologia molecular é a recuperação celular, uma vez que é a partir delas que o mRNA é extraído. Quando comparamos a citologia com a técnica de lavado que é a que possui a menor quantidade de células dentre as amostras existentes, sabe-se que nas fases iniciais do período pós-parto (20 a 30 dias) a técnica de citologia endometrial tem uma melhor recuperação, já a partir dos 30 dias pós-parto, a técnica de lavagem endometrial é a que tem uma melhor recuperação de células (KASIMANICKAM et al., 2005). Isso porque a diminuição do tamanho uterino nos estágios posteriores ao pós-parto pode auxiliar na recuperação do fluido do útero pela técnica de lavagem, resultando em maior recuperação das células em comparação com as fases iniciais do pós-parto (GILBERT et al., 1998). Porém apesar de o lavado apresentar uma maior quantidade celular nos 30 dias pós-parto, a técnica de citologia endometrial também possui uma quantidade celular aceitável para realização de análises moleculares.

Outro fator importante é a presença de eritrócitos na amostra, visto que eles além de contamina-las revelam que aconteceram lesões uterinas durante a coleta. E os eritrócitos tendem a ser maior na técnica de lavagem em comparação com a citologia, possivelmente pelos traumas decorrentes da manipulação do útero e da haste de infusão durante a tentativa de recuperar o fluido (THOMÉ, 2013).

É importante destacar que no momento da realização da citologia a escova ginecológica é exposta no útero e coletam-se amostras apenas daquele local, sendo assim as amostras apenas sugerem o que está acontecendo naquele ambiente endometrial, diferente da lavagem uterina que proporciona uma amostra diluída de conteúdos luminiais, representando uma maior superfície uterina e com maior abrangência celular. Essas diferenças nas duas técnicas levam a vantagens e desvantagens, por exemplo, quando o estudo tiver como objetivo abranger certa região do útero (apical, média...) seja a expressão de genes ou a citologia deste, é mais conveniente a utilização do cytobrush. Porém, casos onde o essencial é saber o que se passa no ambiente uterino como um todo, o mais adequado é a realização da lavagem endometrial.

A técnica de citologia endometrial se destaca por ser menos invasiva que as demais, quando avaliamos a hemodinâmica uterina através do Doppler após a coleta por cytobrush e de

lavado (Tabela 1) é possível perceber que 4 horas após a realização dos procedimentos apesar de não ocorrer uma diferença significativa, os valores de RI (índice de resistência) são menores nos animais que passam pelo lavado, indicando um subsequente processo inflamatório, uma vez que o processo inflamatório inicia com vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo (THOMÉ et al., 2016).

Tempo relacionado com o procedimento	RI (0-1)		VS (0-4)	
	EC	UL	EC	UL
	34 horas antes	0.66	0.69	2.36
4 horas depois	0.69	0.66	2.27	2.12
24 horas depois	0.71	0.77	2.02	1.87
48 horas depois	0.81	0.78	1.72	1.62

* Quanto maior o valor de VS maior a vascularização e quanto menor o valor de RI maior o fluxo sanguíneo do vaso.

Fonte: THOMÉ et al., 2016.

Tabela 01: Valores de índice de resistência (RI)* das artérias uterinas e escores de vascularização (VS) dos animais, obtidos por ultrassonografia Dopler, após as técnicas de citologia endometrial (EC) e lavado uterino (UL), em diferentes períodos de avaliação.

A citologia endometrial também se mostra vantajosa quando comparado com a biópsia endometrial, pois essa última é uma técnica extremamente invasiva e exige uma maior experiência para ser executada. Sendo assim se o objetivo é entender todo o ciclo estral ela não pode ser realizada, pois gera um processo inflamatório não podendo ser feita em todos os 21 dias do ciclo, além disso, uma única biópsia de endométrio já pode causar impactos na fertilidade imediata da fêmea (BONNETT, 1988; BEKANA et al., 1996; BOOS, 1998 e KASK et al., 1998). Na biópsia ocorre uma lesão do tecido uterino para que aquela amostra seja obtida, posterior a isso teremos um processo inflamatório e cicatrização. Quando um processo inflamatório é estabelecido, a enzima COX-2 tem um aumento na sua atividade e aumenta a

síntese de prostaglandinas que são mediadoras do processo inflamatório, porém também atuam no sistema reprodutivo (GRISWOLD & ADAMS, 1996). Consequentemente caso seja necessário avaliar a expressão de genes ligados as prostaglandinas (o que é muito comum em estudos do ciclo estral de bovinos) os resultados não serão mais confiáveis a partir da segunda coleta de amostra por biópsia, pois o processo inflamatório da primeira amostra já estará estabelecido e a síntese de prostaglandinas aumentada.

Contudo quando for necessária a avaliação em um único momento do ciclo estral do ambiente endometrial a biópsia uterina pode ser uma alternativa interessante, pois apesar da citologia endometrial ser mais prática, barata e menos invasiva, as amostras de biópsia vão conter todas as camadas do endométrio, podendo abranger o estroma endometrial e células vasculares enquanto as coletadas por cytobrush contém uma maior quantidade de células superficiais do útero (CARDOSO et al., 2017).

A partir disso é possível perceber que a técnica de citologia endometrial é extremamente vantajosa na coleta de amostras do endométrio pois, gera um processo inflamatório irrelevante comparado à biópsia endometrial e ao lavado, produzindo amostras de alta qualidade celular podendo ser usada em estudos de genômica do trato reprodutivo.

5.2 SUPLEMENTAÇÃO COM PROGESTERONA NO DIESTRO

Dentre as formas de suplementação com progesterona as únicas que podem ser utilizadas com bons resultados e de forma confiável é a suplementação com progesterona injetável, e com implantes intravaginais. A suplementação endógena não é uma metodologia recomendada, pois para que possa ser realizada é necessário esperar o início de outra onda folicular e induzir uma nova ovulação, ou seja, só é aplicado o GnRH no dia 5 após a ovulação e posteriormente a isso é que terá um CL acessório o que não será vantajoso, uma vez que a suplementação com P4 deve ser realizada entre os dias 3-6 após a ovulação.

A ingestão de progesterona exógena também não é uma metodologia recomendada, pois os animais em sua maioria andam em rebanhos e no momento da distribuição não será possível estabelecer quanto cada animal vai ingerir da mistura, dificultando assim o estabelecimento de uma concentração adequada que cada animal ingeriu. Além disso, ela deve ser realizada todos os dias, o que exige manejo e consequentemente gastos.

A suplementação com progesterona no diestro já é uma alternativa muito utilizada em protocolos hormonais para melhorar a taxa de prenhez. Devemos entender que a realidade dos protocolos hormonais em bovinos nas propriedades do Brasil é de pressionar para que todas as vacas ciclem concomitantemente e assim não se gaste tempo observando cio ou perdendo um ciclo por cio não demonstrado. Contudo no momento da realização do protocolo hormonal usualmente feito na maioria das propriedades que realizam IATF e TETF, as vacas não estão nas mesmas ondas foliculares e com a mesma situação sanitária. Então as vacas que entrarem em protocolos hormonais e no momento do estímulo da ovulação estiverem com um folículo pequeno pelos mais diversos fatores, vão ovular, porém vacas com folículos pequenos (menores que 12mm), possuem baixas concentrações de estradiol no proestro. Ainda se esse folículo pequeno ovular, ele dará origem a um CL pequeno que vai produzir concentrações menores de progesterona, causando consequências no estabelecimento da gestação.

Portanto são duas as alternativas que devem ser tomadas durante um protocolo hormonal. A primeira delas é saber se esse animal está ciclando da maneira correta e antes de protocolar avaliar o status reprodutivo, principalmente quando tratar-se de novilhas pois estas podem ainda não ter entrado na puberdade. E a segunda é avaliar o escore de condição corporal e a alimentação que esse animal recebe. Pois para que ele possa produzir um folículo maior que 12mm é necessária energia suficiente, caso contrário nenhum protocolo hormonal terá bons resultados. Sendo assim a suplementação com progesterona é vantajosa e auxilia no aumento da taxa de prenhez em até 20%, mas ela por si só não é o suficiente para gerar grandes aumentos na taxa de gestação e precisa estar aliada a um manejo adequado.

Alguns autores ainda questionam o uso da suplementação com P₄ no diestro, justificando que ela leva a um aumento na concentração plasmática de P₄, porém uma parcela dos animais tem uma luteólise antecipada em aproximadamente três dias (PUGLIESI et al., 2014). A justificativa para esse acontecimento é porque a progesterona em altas concentrações é responsável por causar um *downregulation* em seus receptores, quando isso ocorre, acontece um *upregulation* nos receptores de estradiol, e por sua vez nos receptores de ocitocina no endométrio (SPENCER & BAZER, 1996). O aumento nos receptores de ocitocina é um marco para a luteólise. Quando a suplementação com progesterona acontece os níveis plasmáticos de P₄ aumentam muito e causam um *dowregulation* nos receptores de P₄, aumentando os de estrógeno e consequentemente ocitocina, podendo levar a uma luteólise precoce (LAMMINING et al., 1995). Porém esse processo luteolítico observado por alguns autores em uma parcela dos animais pode acontecer em fêmeas que não abrigavam um embrião, pois o

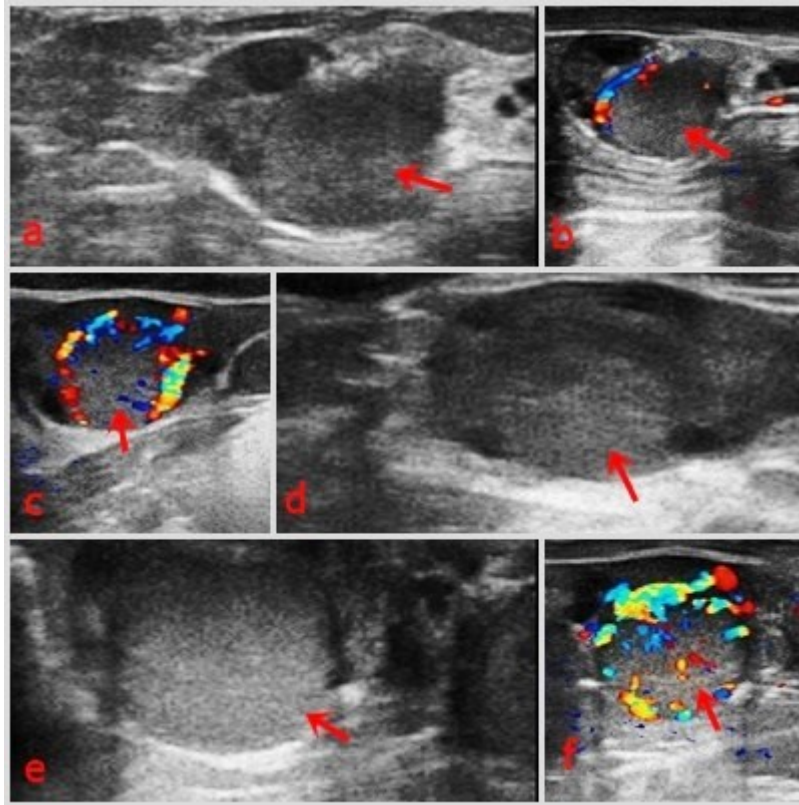
mesmo é fundamental para o funcionamento do CL, uma vez que ele irá secretar o IFN-t inibindo a liberação pulsátil de PGF2 α .

5.3 DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO PELA FUNCIONALIDADE DO CORPO LÚTEO E EXPRESSÃO ISGS

O diagnóstico de prenhez está sendo cada vez mais utilizado nas fazendas, não apenas para o controle do rebanho, mas principalmente para o aumento da produtividade. Hoje mais do que nunca se entende que em uma propriedade rural como em qualquer outra empresa o tempo deve ser bem utilizado, pois impacta diretamente nos custos de produção. Sendo assim logicamente que a idade do feto em que é realizado o diagnóstico de gestação tem influência no manejo do rebanho, quanto mais cedo for diagnosticado, menos gastos e perdas.

Partindo desse princípio e sabendo o quanto o Brasil é destaque na área de produção de bovinos, podemos concluir que a realização do método tradicional de diagnóstico pela ultrassonografia aos 30 dias de gestação está ultrapassado, pois o reconhecimento da gestação ocorre com aproximadamente 15-18 dias após a fertilização. Ou seja, a partir desse período a gestação já está estabelecida e deve ser identificada, visto que feto já liberou sinais do reconhecimento materno (IFN-t). Consequentemente, com essa nova metodologia de diagnóstico precoce, é possível adiantar em 10 dias o intervalo entre as inseminações e os protocolos hormonais, o que torna extremamente vantajoso, uma vez que o ciclo estral de uma vaca dura em média 21 dias, ou seja, o diagnóstico é realizado antes mesmo do animal manifestar sinais de retorno ao cio

Alguns autores já conseguiram 100% de acurácia utilizando somente a avaliação pela perfusão sanguínea do CL (SIQUEIRA et al., 2013), ignorando a sua área. Contudo alguns autores perceberam que nessas situações as porcentagens de falsos positivos e falsos negativos podem aumentar (PUGLIESI et al., 2014), pois em alguns casos em que o fluxo não está acima de 25%, se a área estiver maior que 2cm² o animal que seria diagnosticado como não gestante é diagnosticado como gestante. Assim, um animal só é considerado negativo se os dois padrões de avaliação não estiverem de acordo, diminuindo a chance de falsos diagnósticos (Figura 4). Esse ponto é fundamental para uso da técnica, pois as perdas econômicas com uma maior proporção de resultados falso-negativos podem sobrepor o ganho com a antecipação da re-inseminação e assim inviabilizar esse tipo de estratégia em programas de ressincronização (PUGLIESI et al., 2017)



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 4: Imagens ultrassonográficas de ovário bovino apresentando corpo lúteo (setas vermelhas). Os painéis a e b indicam, o mesmo animal, com área luteal menor que 2cm^2 e fluxo sanguíneo menor que 25%, portanto não gestante. Os painéis c e d, indicam o mesmo animal, com área luteal menor que 2cm^2 , mas fluxo sanguíneo maior que 25%, portanto um animal gestante. Os painéis e e f indicam um animal com área luteal maior que 2cm^2 e com fluxo sanguíneo maior que 25%, portanto gestante. (limite de detecção: $0,05\text{m/seg}$).

Apesar da avaliação do tamanho de tecido luteal estar positivamente correlacionada com as concentrações circulantes de P4 e servir assim como um indicativo da função luteal durante o período de regressão do CL, esta correlação é menor devido às taxas de decréscimo serem mais rápidas para P4 do que para o tamanho do CL (KASTELIC et al., 1990; ASSEY et al., 1993). Sendo assim, nem sempre um animal que está em luteólise terá baixas concentrações de progesterona e baixa perfusão sanguínea imediatamente, o que pode confundir em casos de perdas embrionárias tardias.

Outro diagnóstico errôneo que pode acontecer são os falsos positivos. Essa parcela de resultados pode ocorrer por diversos fatores que levam a presença de um CL funcional no dia do diagnóstico precoce, como: ovulação tardia ao protocolo de IATF e ciclo estral mais longo (>22 dias) de alguns animais. Entretanto, grande parte destes resultados falso-positivos

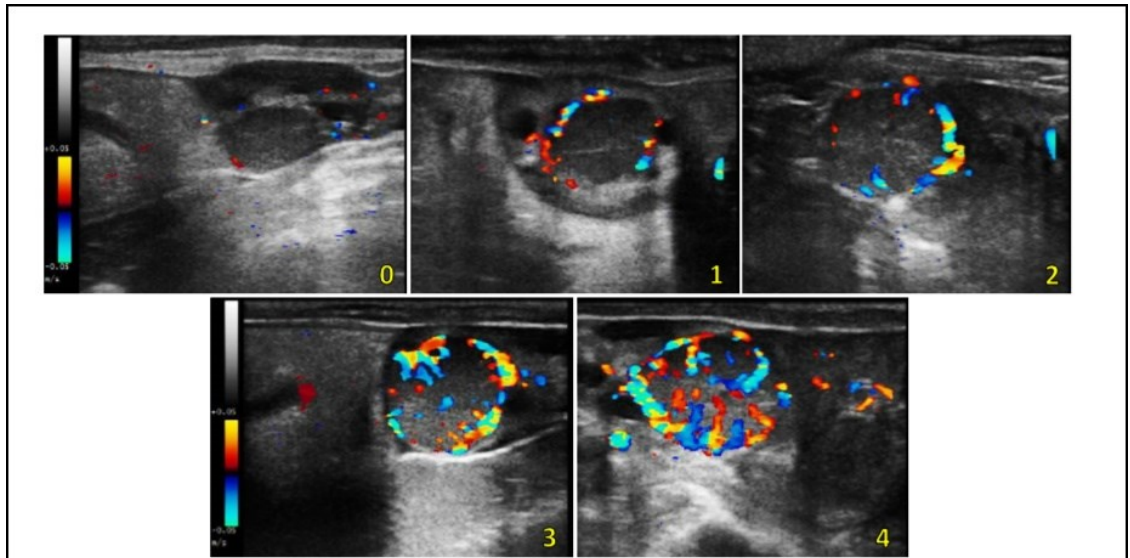
observados com a ultrassonografia Doppler pode ser oriunda de perdas embrionárias entre o diagnóstico precoce (dias 20-22) até o diagnóstico convencional (dia 30), visto que estes estudos usaram o diagnóstico no dia 30 para comparar a acurácia da técnica ultrassonográfica precoce (PUGLIESI et al., 2017). Desta forma, observa-se que estes 8 a 10 dias de intervalo entre as técnicas pode representar grandes perdas embrionárias que irão ocorrer neste período e assim ter vacas gestantes no diagnóstico precoce, mas que perderam a gestação até o Dia 30. Esta morte embrionária precoce também pode refletir a maior proporção de resultados falso-positivos e menor acurácia observada em vacas de leite (SIQUEIRA et al., 2013) se comparado a vacas de corte (PUGLIESI et al., 2014), já que a mortalidade embrionária chega a ser 2 a 4 vezes maior em vacas especializadas para produção de leite.

Outra situação importante de ser analisada é que no evento de luteólise, inicialmente ocorre um aumento da perfusão sanguínea para posteriormente acontecer um decréscimo, sendo assim durante o diagnóstico de gestação casos de luteólises iniciais podem acontecer e confundirem com um animal positivo, o que também pode dificultar a confiabilidade do diagnóstico.

Apesar de discretas estruturas anecóicas indicativas da vesícula embrionária já poderem ser observadas pela ultrassonografia em escalas de cinza, entre 12-14 dias de gestação e o embrião já poder ser identificado entre 19-24 dias (HANZEN & DELSAUX, 1987), o diagnóstico ultrassonográfico em modo B só é recomendado após 28-30 dias (PIETERSE et al., 1990). Isto porque a sensibilidade e acurácia na visualização do conceito só chegam a 100% se o diagnóstico for realizado a partir deste período (NATION et al., 2003). Isto permite que os veterinários sugiram um plano para ressincronização das vacas não-gestantes somente após o diagnóstico de gestação aos 30 dias pós-inseminação. Entretanto, em vacas não-gestantes, o estro irá retornar normalmente entre 18 e 24 dias após a inseminação e após a regressão do CL que normalmente ocorre entre os dias 15 e 18. Assim, é sugestivo que a avaliação do CL para o diagnóstico de gestação poderia permitir um acesso correto do status gestacional.

Para que possamos utilizar a avaliação do CL em modo Doppler, de forma aplicada ao cotidiano da produção de bovinos, é necessário que formas mais práticas de medidas de fluxo e área sejam criadas para facilitar o manejo e resultar em uma maior homogeneidade nos resultados dos profissionais. Partindo desse princípio algumas formas de medidas vêm sendo criadas, como de escores de 1 a 4. Nesse caso os escores de 0 e 1 são animais não gestantes, e

escores 2, 3 e 4 animais gestantes. Assim a avaliação da vascularização pode ser realizada de forma mais simples por veterinários à campo. (Figura 5) (PUGLIESI et al., 2017).



Fonte: PUGLIESI et al (2017).

Figura 5: Imagens ultrassonográficas de ovário bovino apresentando corpo lúteo. Os painéis 0 a 4 indicam, respectivamente, os escores 0, 1, 2, 3 e 4 para perfusão sanguínea periférica e central no tecido luteal dos animais avaliados (limite de detecção: 0,05m/seg). Painéis 0 e 1: vacas não-gestantes; Painéis 2, 3 e 4: vacas gestantes.

Para que possamos aumentar a produção de carne e leite nos sistemas pecuários brasileiros faz-se necessária uma maior eficiência em todos os setores de produção, incluindo o reprodutivo. Contudo um longo período entre o parto e a concepção contribui para índices reprodutivos mais baixos reduzindo a eficiência reprodutiva do rebanho. Sendo assim se o animal que estiver prenhe for diagnosticado antes de retornar ao cio, teremos um encurtamento do intervalo do parto à concepção e aumento na produtividade, por isso a detecção da perda embrionária que acontece entre os 8-17 dias de gestação o mais rápido possível é fundamental.

Apesar da utilização do Doppler no diagnóstico precoce de gestação ainda não estar amplamente disseminado na produção de bovinos, já existem trabalhos relatando seu uso em programas de ressincronização super-precoce da ovulação. Esses programas retiram a aplicação do benzoato de estradiol no início do tratamento, pois sua aplicação com 13-14 dias após a prévia IA induz a luteólise (VIEIRA et al., 2014). Dessa forma esses protocolos hormonais se baseiam no uso de uma alta dose de P4 injetável no momento da inserção do dispositivo (14 dias após a IATF) com o objetivo de induzir uma nova onda de crescimento folicular. Com 22

dias de gestação todas as vacas são avaliadas com Doppler para avaliação da vascularização do CL, e as que forem consideradas não gestantes dão continuidade ao protocolo hormonal com prostaglandina. Essa forma de protocolo aumenta consideravelmente a taxa de serviço a cada 21 dias de 66% para 87,5 % quando comparada a ressincronização iniciada com 22 dias de gestação (PENTADO et al., 2016). Isso demonstra que esse modelo de ressincronização superprecoce é consistente e possível de aplicação em larga escala. Porém é importante ressaltar que para que esse protocolo seja aplicável existem custos com mão de obra especializada, ultrassonografia Doppler, e a aplicação de P₄ injetável aliada ao dispositivo. Sendo assim o sistema de produção adotado pela fazenda deve ser avaliado para estabelecer qual modelo de ressincronização deve ser utilizado. Apesar dos gastos serem maiores nesse sistema de ressincronização, o manejo reprodutivo é extremamente intensivo, ou seja, você aumenta seus gastos em tecnologia, mas diminui os gastos em produção. Além disso, quando realizado 3 IATFs, em 48 dias a estação da monta é reduzida a ponto de possibilitar a adoção de estação de monta no inverno, em sistemas de integração lavoura pecuária (PUGLIESI et al., 2017).

Algumas técnicas foram desenvolvidas para inserir a ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF. Para estes fins, o equipamento ultrassonográfico deve ser adequadamente configurado para o modelo escolhido e para identificação da perfusão sanguínea em vasos pequenos e com baixo fluxo sanguíneo. Isso é fundamental visto que a quantidade de sinais coloridos no visor é altamente influenciada pelo tipo de configuração utilizada (frequência, quantidade de frames por segundo, potência usada, ganho do modo Doppler, e frequência de pulso). De forma geral, sugere-se uma configuração no equipamento que permita uma velocidade de detecção mínima ao redor de 4-6cm/seg (GINTHER, 2007).

Outra possibilidade de diagnóstico precoce de gestação é através da expressão de ISGs nas PBMCs, contudo essa metodologia precisa ainda de muitos estudos. Visto que sua aplicabilidade em propriedades é inviável. Seu uso ainda se limita a pesquisa, pois são necessárias várias etapas de biologia molecular e sequenciamento para a correta avaliação, etapas essas que levam dias e custam alto. Porém apesar de ser menos prática que a avaliação do CL por Doppler, sua acurácia também é alta, demonstrando ser confiável para o diagnóstico de gestação. Se mais estudos forem implementados, em alguns anos, por exemplo, testes rápidos podem ser desenvolvidos para detecção de ISGs. O que facilitaria muito o manejo do produtor.

Além da metodologia já mencionada nesse trabalho, à análise de ISGs pode ser mais precoce, nesse caso, é necessário utilizar duas amostras de sangue, uma coletada no dia 15 pós IA, e outra coletada no dia 18 de gestação. A confirmação da gestação se dá pela maior expressão relativa no dia 18 comparado ao dia 15 (PUGLIESI et al., 2014). Outra forma também possível é realizando uma coleta antes da IA ou da TE e outra no dia 18 (HAN et al., 2006). Isso seria possível porque vacas gestantes desenvolvem um aumento progressivo na abundância de ISGs do Dia 15 ao Dia 20 pós-IA, posteriormente ocorre uma acentuada diminuição no dia 22 e uma diminuição maior para os níveis basais do Dia 30 até o Dia 60 (PUGLIESI et al., 2014).

Estudos recentes já comprovam que todos os ISGs apesar de serem expressos em células mononucleares do sangue periférico também são expressos em quantidades muito maiores nos granulócitos, dessas mesmas amostras, possibilitando assim uma oportunidade diferente de isolamento de avaliação de ISGs (KIZAKI et al., 2013). A maior dificuldade nesse momento, é apenas desenvolver uma metodologia correta de isolamento desses granulócitos para avaliar a expressão de PBMCs.

Sendo assim a técnica de detecção da abundância de ISGs pode ser considerada com um excelente método de diagnóstico, podendo ser mais antecipado que o Doppler, precisa apenas uma adaptação para facilitar o protocolo de detecção da abundância de ISGs e o estabelecimento de concentrações que determinem se um animal está gestante ou não.

As ISGs além de serem expressas em células do sangue periférico, também tem sua expressão no útero (MIRANDO et al., 1999), CL (CHEN et al., 2006) e células do leite. Por isso além da implementação de testes diagnósticos através de células sanguíneas, uma boa alternativa a se realizar é a implementação da detecção de níveis de ISGs nas células do leite, principalmente em bovinos leiteiros, facilitando muito o manejo reprodutivo. Uma vez que hoje o teste rápido existente que possibilita um diagnóstico mais precoce é aos 25 dias de gestação, através da detecção das glicoproteínas associadas a gestação (PAGs).

Outro ponto importante a ser destacado, é que o reconhecimento da gestação e a secreção do interferon tau é consequência do tamanho e viabilidade do embrião, mas também do ambiente uterino. Sabe-se que vacas em lactação e vacas múltiparas, possuem um ambiente uterino comprometido afetando a qualidade do embrião (SARTORI et al., 2002), sendo assim a secreção de IFN-t pode ser menor e a expressão de ISGs também. Por isso, é necessário o

estabelecimento de níveis diferentes de expressão de ISGs em novilhas e vacas múltíparas, visto que a secreção de interferon- τ nesses animais ocorre de maneira diferente.

Além disso, quando associamos a análise de ISGs ao método Doppler, a sensibilidade do diagnóstico é aumentada, melhorando a detecção de fêmeas prenhes (PUGLIESI et al., 2014). Porém é importante ressaltar que os ISGs respondem a vários tipos de estímulos de IFN e a infecções virais (NAKAYA et al., 2001), portanto algumas vezes a alta abundância de ISGs não necessariamente pode estar relacionada a gestação e devemos cuidar para não diagnosticar erroneamente.

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados levantados acima, é possível concluir que a técnica de citologia, pode ser aplicada em rotinas laboratoriais para auxiliar em estudos do trato reprodutivo. Além disso, ela é uma técnica simples, prática e com baixo custo, o que possibilita sua utilização em vários projetos de pesquisa. Porém não se pode esquecer que a sua abrangência é apenas de tecidos superficiais, o que dificulta no entendimento de vias presentes a partir da musculatura do endométrio.

Dentre as estratégias implementadas para auxiliar na taxa de concepção, a suplementação com progesterona, demonstrou ser extremamente vantajosa e melhorar os índices reprodutivos em uma parcela da população. Porém mais estudos são necessários com relação a luteólise precoce causada pelo seu aumento plasmático na outra parcela de animais. A estratégia de suplementação pode ser aplicada em protocolos hormonais de IATF ou TETF, principalmente em bovinos leiteiros, onde o manejo é diário e facilita a aplicação.

Outra metodologia já utilizada em muitas propriedades é a utilização do Doppler no diagnóstico precoce de gestação, que facilita o manejo dos animais, diminui a estação de monta e possibilita um menor período entre o parto e a concepção, aumentando os lucros das propriedades. Essa técnica pode ser implementada facilmente em grandes propriedades que tenham a assistência de médicos veterinários especializados, e com uma ultrassonografia Doppler disponível. Sua utilização é extremamente confiável, visto que sua acurácia é de 100%.

Quanto a utilização de ISGs no diagnóstico gestacional, mais estudos são necessários, pois apesar de ser confiável e possível de realizar, sua aplicabilidade ainda é restrita ao meio científico, uma vez que a fase de processamento da amostra é demorada e com alto custo. Por isso estudos nessa área são necessário, para possibilitar uma metodologia fácil e aplicável á rotina das fazendas brasileiras.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T.J.; YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. *Biology of Reproduction*, v.66, p.651–658, 2002.
- ANTONIAZZI, A. Q.; HENKES, L. E.; COELHO, J. F. O.; HANSEN, T. R. Função do Interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes, *Ciencia Rural*, Santa Maria, v41, n1. P176-185, 2011.
- ASSEY, R. J.; PURWANTARA, B.; GREVE, T.; HYTTEL, P.; SCHMIDT, M. H. Corpus luteum size and plasma progesterone levels in cattle after cloprostenol-induced luteolysis. *Theriogenology*, v.39, p.1321-1330, 1993.
- BATTOCCHIO, M. G.; GABAI, A.; MOLLO, M. C.; VERONESI, F.; SOLDANO, G. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. *Theriogenology* 51:1059–1069, 1999.
- BEKANA, M., P.; JONSON, e KINGAHL, H. Intrauterine bacterial findings and hormonal profile in post-partum cows with normal puerperium. *Acta Vet. Scand.* 37: 251-263, 1996.
- BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 29, p. 305-317, 2005.
- BERTAN, C.M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E.H.; TRALDI, A. S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise- revisão de literatura. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 43, p. 824-840, 2006.
- BINELLI, M.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A.; BERTAN, C.M. Manipulation of ovarian and uterine function to increase conception rates in cattle. *Anim Reprod*; 6:125–34, 2008.
- BINELLI, M.; SUBRAMANIAM, P.; DIAZ, T.; JOHNSON, G. A.; HANSEN, T. R.; BADINGA, L.; THATCHER, W. W. Bovine interferon-tau stimulates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. *Biol Reprod*, v.64, n.2, p.654-665, 2008.
- BONNETT, B. The relationships of endometrial biopsy and rectal palpation findings to reproductive performance in postpartum cows. Tesis de PhD, University de Guelph, Canada, 1988.
- BOOS, A. Immunohistochemical assessment of prostaglandin H-synthase in bovine endometrial biopsy samples collected throughout the oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 51: 261–273, 1998.
- CAMPERO, C.; CONOSCIUTO, G.; ODRIOZOLA, E.; MOREIRA, A.; LODEIRO, R.; BOISSOU, R.G. Hallazgos clínicos bacteriológicos e histopatológicos en vacas lecheras asociados con problemas reproductivos. [En línea] 2008.

CARDOSO, B.; OLIVEIRA, M.; PUGLIESI, G.; BATISTA, E. O.; BINELLI, M. Cytobrush: a tool for sequential evaluation of gene expression. In bovine endometrium. *Reproduction in Domestic Animals*. 2017.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C.; KENNY, D. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod Fertil Dev*; 20:368–75, 2008.

CEPEA: PIB do Agronegócio Brasileiro- Universidade de São Paulo- ESALQ 2017.
Disponível em : <http://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>
Acessado em : 03/06/2017

CHEN, Y.; GREEN, J. A.; ANTONIOU, E.; EALY, A. D.; MATHIALAGAN, N.; WALKER, A. M. Effect of interferon- τ administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology*, 147, 2127–2137, 2006.

CLEEF, J.; MACMILLAN, K. L.; DROST, M.; LUCY, M. C.; THATCHER, W. W. Effects of administering progesterone at selected intervals after insemination of synchronized heifers on pregnancy rates and resynchronization of returns to service. *Theriogenology*; 46:1117–30, 1996.

DONZO, D. Z. Biopsias y citologías endometriales en bovinos: Trabajo final de graduación para optar por el grado académico de licenciatura em medicina veterinária. Facultad de ciencias de la salud universidad nacional, Benjamín Núñez, 2007.

DORNIK, P.; BAZER, F. W.; SPENCER, T.E. Prostaglandins Regulate Conceptus Elongation and Mediate Effects of Interferon Tau on the Ovine Uterine Endometrium. *Biol. Reprod.* 84:1119–1127, 2011.

GARRET, J. E.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; MORGAN, G. L. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J Reprod Fertil*;84:437–46, 1988

GILBERT, R. O. GUARD, C. L. FRAJBLAT, M. SCHIN, S. T. Incidence of endometritis and effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, v. 49, n. 1, p. 251, 1998.

GILBERT, R.; SCHIN, S. T.; GUARD, C. L.; ERB, H. N.; FRAJBLAT, M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*. 64: 1879–1888, 2005.

GINTHER, O.J. Producing color-flow images. In *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography*, Ed. O J Ginther. Cross Plains: Equiservices Publishing, 2007.

GINTHER, O.J.; SHREATHA, H.K.; BEG, M.A. Circulating hormone concentration within a pulses of a metabolite of prostaglandin F₂ α during preluteolysis and early luteolysis in heifer. *Animal Reproduction Science*, v.122, p.253-258, 2010.

GODKIN, J. D.; BAZER, F. W. Session F, Roberts RM. Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at days 13-21. *J Reprod Fertil*, v.71, p.57-64, 1982.

GRISWOLD, D.E.; ADAMS, J. L. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Research Veterinary*, v.16, p. 181-206, 1996.

HAN, H.; AUSTINS, K. J.; REMPEL, L. A.; HANSEN, T. R.; Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. *J Endocrinol*; 191:505–512, 2006.

HANSEN, T.R.; AUSTIN, K.J.; ADANS, J. L. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl*, v.54, p.329-339, 1999.

HANZEN, C. & DELSAUX, B. Use of transrectal B-mode ultrasound imaging in bovine pregnancy diagnosis. *Vet. Rec*, v.121, p.200-202, 1987.

HERZOG, K.; BROCKHAN, L. M.; KASKE, M.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology*, v.73, p.691-697, 2010.

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

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A.; GARTLEY, C. J.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Canadian Veterinary Journal*, v. 46, n. 3, p. 255-259, 2005.

KASK, K.; KIDAHL, IDAHL, H.; GUSTAFSSON, H. Bacteriological and histological investigation of the postpartum bovine uterus in two estonian dairy herds. *Acta Vet. Scand.* 39: 423-432, 1998.

KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, v.33, p.1269-1278, 1990.

KAWATE, N. MORITE, A. N. TSUJI, M. TAMADA, H. INABA, T. SAWASA, T. Roles of pulsatile release of LH in the development and maintenance of corpus luteum function in the goat. *Theriogenology*, v.54, p.1133-1143, 2000.

LAMMING, G. E.; WHATES, D. C.; FLINT, A. P. F.; PAYNE, J. H.; STEVESON, K. R.; VALLET, J. L. Local actions of trophoblast interferons in suppression of the development of oxytocin and oestradiol receptors in ovine endometrium. *J Reprod Fertil*, v.105, p.165-175, 1995.

- MACHADO, R.; FIGUEIREDO, R. A.; BERGAMASCHI, M. A. C. M.; BINELLI, M. Estratégias para reduzir a mortalidade embrionária em bovinos: I. Alternativas farmacológicas para otimizar a função luteínica de vacas de corte. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 23 p. 2010.
- MANN, G. E. & LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*; 121:175-80, 2001.
- MANN, G. E. & LAMMING, G. E. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Domestic Anim*; 34:269-74, 1999.
- MIRANDO, M.A.; SHORT, E. C.; GEISERT, R. D.; VALLET, J. L.; BAZER, F. W. Stimulation of 2',5'-oligoadenylate synthetase activity in sheep endometrium during pregnancy, by intrauterine infusion of ovine trophoblast protein-1, and by intramuscular administration of recombinant bovine interferon-alpha 1. *J Reprod Fertil*, v.93, n.2, p.599-607, 1999.
- MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA K.; WARDANE, M.P.B.; WATANABE S.; HAYASHI, M.; YAMAMOTO, D.; MATSUI, M.; ACOSTA, T.J. Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domestic Animal Endocrinology*, v.29, p.329-339, 2005.
- MOURA, C. E. B. Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos. São Paulo, SP, Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2003.
- NAKAYA, T.; SATO, M.; HATA, N.; ASAGIRI, M.; SUEMORI, H.; NOGUCHI, S.; TANAJA, N.; TANIGUCHI, T. Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem Biophys Res Commun*; 283:1150-1156, 2001.
- NATION, D. P.; MALMO, J.; DAVIS, G. M.; MACMILLAN, K. L.. Accuracy of bovine pregnancy detection using transrectal ultrasonography at 28 to 35 days after insemination. *Aust Vet J*, v.81, p.63-65, 2003.
- NISHIMURA, R.; KOMIYAMA, J.; TASAKI, Y.; ACOSTA, T.J.; OKUDA, K. Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum, *Biology of Reproduction*, v.78, p.529-536, 2008.
- OLIVEIRA, G. D. M. Fisiologia da Reprodução Bovina e Métodos de Controle do Ciclo Estral, Universidade Castelo Branco-UCB. Trabalho de Conclusão de Curso. Rio de Janeiro-RJ, 2006.
- OTT, T.L.; YIN, J.; WILEY, A. A.; KIM, H. T.; NAINI, B. G.; SPENCER, T. E.; BARTOL, F. F.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. Effects of the estrous cycle and early pregnancy on uterine expression of mx protein in sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod*, v.59, n.4, p.784-794, 1998.

- PERRY, G. A.; & PERRY, B. L.; Effects of standing estrus and supplemental estradiol on changes in uterine pH during a fixed-time artificial insemination protocol. *J. Anim. Sci.* 86:2928–644, 2008.
- PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; LUCY, M. C.; GREEN, J. A.; PARKS, T. E.; MAC NEIAL, M. D.; ROBERTS, A. J. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:5268–5273, 2005.
- PIETERSE, M. C.; TAVERNE, M. A.; KRUIP, T. A.; WILLEMSE, A. H. Detection of corpora lutea and follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. *Vet Rec*, v.126, p.552-554, 1990.
- PRATT, B. R.; BUTCHER, R. L.; INSKEEP, E. K. Antiluteolytic effect of the conceptus and of PGE2 in ewes. *J. Anim. Sci.* 45:784–791, 1977.
- PUGLIESI, G.; OLIVEIRA, M. L.; SCOLARI, S. C.; LOPES, E.; PINAFFI, F. V.; MIAGAWA, B. T.; PAIVA, Y. N.; MAIO, J. R. G.; NOGUEIRA, G. P.; BINELLI, M. Corpus luteum development and function after supplementation of long-acting progesterone during the early luteal phase in beef cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 49:85–91, 2014.
- PUGLIESI, G.; REZENDE, R. G.; SILVA, J. C. B.; LOPES, E.; NISHIMURA, T. K.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, H. E.; BINELLI, M. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.140-150, jan./mar. 2017.
- PUGLIESI, G.; MIAGAWA, B. T.; PAIVA, Y. N.; FRANÇA, M. R.; SILVA, L. A.; BINELLI, M. Conceptus-induced changes in the gene expression of blood immune cells and the ultrasound-accessed luteal function in beef cattle: how early can we detect pregnancy? *Biology of reproduction* 91(4):95, 1-12. 2014.
- REPNIK, U.; KNEZEVIC, M.; JERAS, M. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. *Journal of Immunological Methods*, 278, pp. 283-292, 2003.
- RIBADU, A.; WARD, W.; DOBSON, H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. *Vet Rec*, 135: 452-7, 1994.
- ROBERTS, R. M.; LEAMAN, D. W.; CROSS, J. C. Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.200, p.7-18, 1992.
- ROSENFELD, C.S.; HAN, C. S.; ALEXENKO, A. P. SPENCER, T. E. ROBERTS, M. R. Expression of interferon receptor subunits, IFNAR1 and IFNAR2, in the ovine uterus. *Biol Reprod*, v.67, n.3, p.847-853, 2002.
- SÁ FILHO, O.J.; MENEGHETTI, M.; PERES, R.; LAMB, G. VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*, v.72, p. 210-218, 2009.
- SANTO, N.R.; ROMAN, H.B.; GILBERT, R.O. The use of leukocyte esterase reagent strips for diagnosis of subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*. 66: 663– 687, 2006.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A.; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, 85, 2803–2812, 2002.

SIQUEIRA, L. G. B.; AREAS V. S. GHETTI, A. M. FONSECA, J. F. PALHAO, M. P.; FERNANDES, C. A.; VIANA, J. H. M. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *J Dairy Sci* v.96, p.6461-6472, 2013.

SPENCER, T. E., BAZER, F. W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*, v.2, p. 49, 2004.

SPENCER, T. E., BAZER, F. W. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod*, v.53, p.1527-1543, 1995.

SPENCER, T.E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction*, v.128, n.6, p.657-668, 2004.

SPRECHER, D. J.; NEBEL, R. L.; WHITMAN, S. S. The predictive value, sensitivity and specificity of palpation per rectum and transrectal ultrasonography for the determination of bovine luteal status. *Theriogenology* a:1 165-I 172, 1989.

THOMÉ H. E. et al., Métodos de diagnóstico da resposta inflamatório uterina em vacas. *Ver. Acad. Ciências Agrárias. Ambient, Curitiba* V. 11, n 1.p.11-16.jan/mar, 2013.

THOMÉ, H. E.; OLIVEIRA, B. M. M.; ARRUDA, R. P. GUIMARÃES, C. F.; THOMÉ, A. C. S.; BALIEIRO, J. C. C.; FERNANDES, C. B.; CELEGHINI, E. C. C. Comparação de técnicas para avaliar citologia endometrial em bovinos após inseminação artificial. In: *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Recife ANAIS, Recife* 2011. P. 123, 2001.

VERONESI, M.C.; GABAI, G.; BATTOCCHIO, M.; MOLLO, A.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Ultrasonographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows. *Theriogenology*, v.58, p.61-68, 2002.

VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.; PUGLIESI, G.; GUERREIRO, B. M.; CRISTALDO, M. A.; BATISTA, E. O. S.; FREITAS, B. G.; CARVALHO, F. J.; GUIMARÃES, L. H. C. BARUSELLI, P. S. Resynchronization in dairy cows 13 days after TAI followed by pregnancy diagnosis based on corpus luteum vascularization by color Doppler. *Anim Reprod*, v.11, p.378, 2014.

WILTBANK, M.C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid cycle corpus luteum function. *Journal of Animal Science*, v. 72, p. 1873-1883, 1994.

ZENBIO: Human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) manual, 2016.