

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita

Camila Cupper Vieira

Uruguaiana, dezembro de 2017

CAMILA CUPPER VIEIRA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Fernando Silveira Mesquita
Médico Veterinário, Msc, Dr.

**Uruguaiana
2017**

CAMILA CUPPER VIEIRA

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Fisiologia da Reprodução de Bovinos

Relatório apresentado e defendido em 04 de dezembro de 2017

Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita
Orientador

Prof.^a Dr.^a Francielli Weber Santos Cibir
Universidade Federal do Pampa - Unipampa

M. V. Hirya Fernandes Pinto
Universidade Federal do Pampa – Unipampa

AGRADECIMENTO

Aos meus pais, Silvia Vieira e Rafael Peixoto, e meus irmãos, Amanda e Felipe Vieira, obrigada pela compreensão, apoio e carinho que dedicam a mim, e por serem os maiores incentivadores dos meus sonhos.

Aos demais familiares, principalmente aos avós Marta Helena e Jesus Carlos e ao tio Ricardo, que estiveram sempre presentes incentivando e confortando meus passos.

À Universidade Federal do Pampa, pela formação acadêmica e profissional adquirida no decorrer do curso.

Ao Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita, que foi decisivo para a escolha deste caminho, por me acolher em equipe e compartilhar suas experiências. Pelo ensinamento, pela orientação e comprometimento com a formação profissional dos acadêmicos.

Aos Profs. Drs. Mário Binelli e Guilherme Pugliesi sinceros agradecimentos pela supervisão do estágio, pelos ensinamentos e pela confiança depositada. A toda a equipe do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular, pela excelente recepção, oportunidade de acompanhamento das atividades e aprendizados que proporcionaram.

Aos colegas de graduação, pelos momentos compartilhados. Aos amigos, em especial, Dilene Formentin e Emanoelli Santos, com as quais dividi dificuldades, angústias e muita alegria durante o curso, e agora compartilho esse momento especial.

ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA – ÁREA DE FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE BOVINOS

O presente relatório descreve as atividades executadas e/ou acompanhadas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária. Este foi realizado na área de fisiologia da reprodução de bovinos, no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular da Universidade de São Paulo, no campus de Pirassununga (SP). O estágio foi orientado pelo Prof. Dr. Fernando Mesquita e supervisionado pelo Prof. Dr. Mario Binelli durante o período de 24 de julho a 01 de novembro de 2017, totalizando 560 horas. Durante o estágio foram acompanhados os projetos de pesquisa em desenvolvimento no laboratório, as reuniões técnico-científicas, aulas de pós-graduação, palestras e cursos. Neste relatório, além de uma descrição geral das atividades acompanhadas, foram abordados e discutidos de forma mais aprofundada as atividades relacionadas a dois projetos que investigaram os seguintes assuntos: marcadores sanguíneos para diagnóstico de gestação superprecoce, e resincronização em protocolos de IATF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1:** Experimento 1 - Desenho Experimental. A ovulação de 30 novilhas da raça Nelore foi sincronizada e os animais foram inseminados em tempo fixo (IATF), foi considerado o dia da inseminação o Dia 0 do protocolo. As avaliações ultrassonográficas e as coletas de sangue para isolamento de PMN, PBMC e análise hormonal (progesterona) foram realizadas nos dias 0, 7, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 do protocolo. O DG definitivo foi realizado nos dias 25 e 28 através de avaliações ultrassonográficas, sendo considerados gestantes os animais que apresentavam corpo lúteo funcional (perfusão sanguínea luteal maior que 25% e área luteal maior que 2 cm²) associado à presença de líquido e membrana embrionária..... 15
- FIGURA 2:** Experimento 2 - Desenho Experimental. Novilhas da raça Nelore, foram submetidas à IATF. As avaliações ultrassonográficas e coletas de sangue para dosagem de P4 foram realizadas diariamente do 14º ao 22º dia após a IATF. Adicionalmente, no 14º e 18º dia pós IATF foi coletado sangue para o isolamento de células sanguíneas (PBMC e PMN). No 14º dia também foram realizadas coletas de sangue seriadas, a cada hora por 11 horas consecutivas, para a dosagem do metabólito de PGF2 α (PGFM). Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: controle (apenas implante de P4), grupo BE (implante de P4 mais a 1 mg de BE), e grupo 17 β +P4 (implante de P4 mais a aplicação de 17 β e 0,91 mg de P4 injetável). O diagnóstico de gestação definitivo foi realizado no dia 25 após a IATF através da identificação da vesícula embrionária e em fêmeas não gestantes foi identificada a ocorrência da ovulação no dia 23..... 16
- FIGURA 3:** Curral com sete troncos de contenção onde foram realizadas as atividades..... 18

FIGURA 4:	Medições realizadas em US. A. Volume do folículo dominante; linhas branca e verde tracejadas foram utilizadas para medir o diâmetro do folículo e posteriormente calcular o volume do mesmo. B. Área e perfusão sanguínea do CL; imagem da esquerda indica modo B, enquanto imagem da direita indica modo <i>Doppler</i> ; linha branca tracejada indica delimitação do CL; linha verde indica área de medição do fluxo sanguíneo por modo <i>Doppler</i>	19
FIGURA 5:	Laboratório para processamento de amostras, análises bioquímicas, moleculares e cultivo celular <i>in vitro</i>	21
FIGURA 6:	Processamento de amostra uterina coletada por meio de escova citológica (<i>cytobrush</i>).....	23

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Atividades acompanhadas no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular.....	14
TABELA 2:	Descrição dos resultados parciais do experimento 2. Cada grupo era composto por nove novilhas da raça nelore.....	16

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	9
2.	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	12
2.1	Descrição local de estágio.....	12
2.2	Atividades acompanhadas.....	12
2.3	Descrição dos experimentos.....	14
2.3.1	Experimento 1 – Diagnóstico precoce da gestação em bovinos através da expressão ISGs em neutrófilos.....	14
2.3.2	Experimento 2 – Efeitos da ressincronização da ovulação com estradiol aos 14 dias pós-IATF sobre as características morfofuncionais do corpo lúteo e útero em fêmeas Nelore.....	15
2.4	Atividades Técnico-científicas.....	17
2.5	Manejo dos Animais.....	18
2.5.1	Avaliação ultrassonográfica ovariana.....	18
2.5.2	Coleta de Sangue	19
2.5.3	Diagnóstico de Gestação	19
2.5.4	Exame Andrológico	20
2.5.5	Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)	20
2.6	Técnicas Laboratoriais	20
2.6.1	Preparo de plasma para ensaio hormonal	21
2.6.2	Isolamento Celular	21
2.6.3	Extração de RNA por <i>Trizol</i>	22
2.6.4	Processamento de tecidos	23
3.	DISCUSSÃO	25
3.1	Ciclo estral e manipulação farmacológica	25
3.2	Diagnóstico de gestação.....	29
4.	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35
	ANEXO	41
	Anexo A	41

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO, 2017), a população mundial alcançará 9,8 bilhões de habitantes em 2050, sendo que o maior crescimento deverá ser observado nos países desenvolvidos, chegando a 29%. Neste sentido, para atender a demanda por alimentos a produção de carnes deverá aumentar em mais de 200 milhões de toneladas por ano. A Índia possui o maior rebanho de bovinos sendo responsável por aproximadamente 30% do rebanho mundial (303,35 milhões de animais), enquanto o Brasil possui o segundo maior rebanho, com cerca de 226 milhões de animais (22,6% do total mundial), seguido por China com 100,08 milhões de animais, Estados Unidos e União Europeia, com 93,50 e 89,25 milhões de animais, respectivamente (DEPEC, 2017). No ranking dos maiores produtores de carne bovina o cenário se altera levemente, tendo em primeiro lugar os Estados Unidos (11,38 milhões de toneladas), seguido pelo Brasil (9,28 milhões de toneladas), União Europeia (7,85 milhões de toneladas), China (6,90 milhões de toneladas) e Índia (4,25 milhões de toneladas) (FORMIGONI, 2017). Neste contexto, o Brasil encontra-se em uma posição de destaque, tendo como aliados para aumentar sua produtividade o tamanho do rebanho e o potencial das raças zebuínas, caracterizado pela rusticidade e crescente incremento da precocidade e fertilidade alcançado em razão do trabalho de melhoramento genético realizado com este objetivo. Além disso, o perfil de pecuária extensiva, de relativo baixo custo, proporciona competitividade ao produto brasileiro, que atende às exigências cada vez maiores dos consumidores por uma carne de qualidade, sustentável, e com baixo impacto ambiental (LUCHIARI FILHO, 2006). Tais fatores, se bem explorados, geram oportunidades de crescimento junto ao mercado mundial.

O sucesso da produção bovina está diretamente ligado à combinação de fatores como manejo, nutrição, sanidade, genética e a reprodução animal (FERRAZ FILHO et al, 2002). Diversos estudos, tanto na pesquisa básica como na pesquisa aplicada à reprodução, têm o objetivo de suprir a necessidade de melhor entender a fisiologia reprodutiva de machos e fêmeas, a fim de otimizar a reprodução e aumentar a produção animal anual. Dados de 2014 mostram que apenas 11,9% do rebanho bovino nacional foi inseminado, indicando, portanto, que o potencial da pecuária brasileira está subutilizado (ASBIA, 2014). O período de anestro pós-parto e o longo intervalo entre o parto e a concepção reduzem a eficiência reprodutiva, gerando índices reprodutivos insuficientes. Neste sentido, a manipulação hormonal do ciclo

estral tem sido utilizada para sincronizar a ovulação, eliminando a necessidade de detecção do estro e sincronizando as inseminações, de forma a aumentar o volume de fêmeas inseminadas. As intervenções hormonais controlam o desenvolvimento de ondas foliculares, induzem a ovulação em vacas no anestro, regridem o corpo lúteo em vacas cíclicas e sincronizam o estro e/ou a ovulação ao final do tratamento (SENGER, 2003). Estes métodos hormonais associados à detecção precoce de fêmeas gestantes e/ou não gestantes permitem reduzir o intervalo entre o parto e a concepção aumentando a produtividade animal.

Os protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) foram desenvolvidos para suprir as falhas de detecção de estro, podendo também induzir a ciclicidade de fêmeas em anestro. Devido a falhas individuais na resposta à manipulação hormonal, algumas vacas que não se tornam gestantes necessitariam ser re-inseminadas o mais brevemente possível, para que ainda sejam capazes de produzir um produto por ano. Considerando que o retorno ao estro pode acontecer de forma tardia, ou ainda, não ser detectado, métodos alternativos ágeis e de maior precisão podem representar significativo avanço. O método de diagnóstico de gestação (DG) mais utilizado atualmente é a ultrassonografia transretal entre os dias 28 e 40 pós-inseminação (BARUSELLI et al., 2012). Este método, atualmente considerado precoce, não é capaz de identificar vacas que não se tornaram gestantes ou que perderam a gestação, antes do seu retorno ao estro. Um método de DG que seja mais precoce que o próprio retorno ao estro, possibilitando uma segunda inseminação precoce pode reduzir o impacto negativo das fêmeas que não responderam à manipulação hormonal ou que perderam a gestação. Neste sentido, Lucy et al. (2004) propuseram a associação entre o DG superprecoce seguido de re-inseminação, aos 18 e 21 dias após a primeira IATF, respectivamente. Assim, as vacas não gestantes seriam expostas a uma nova chance de concepção dentro do intervalo de um único ciclo estral. Com isso, se faz necessário o desenvolvimento de métodos que possibilitem detectar os animais não-gestantes mais precocemente e assim reduzir o tempo entre inseminações, diminuindo os custos de produção. As investigações científicas no campo do controle hormonal do ciclo estral e da detecção precoce de gestação tem potencial de estabelecer estratégias com impacto significativo na eficiência dos programas reprodutivos.

Com base no exposto, a área escolhida para a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) foi a Fisiologia da Reprodução de Bovinos, objetivando acompanhar especificamente projetos que investigam abordagens para diagnóstico precoce de gestação para fins de intensificação do sistema produtivo. Adicionalmente, o acompanhamento da rotina diária de um laboratório de pesquisa, a participação de reuniões técnico-científicas para discussão de experimentos e resultados,

assim como a exposição a diferentes linhas de pesquisa vão de encontro ao interesse de continuar na carreira acadêmica.

2. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

2.1 Descrição Local de Estágio

O Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), sob supervisão do Prof. Dr. Mário Binelli. O mesmo está localizado no Departamento de Reprodução Animal (VRA), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo, campus Pirassununga – SP. O estágio compreendeu o período de 24 de julho a 01 de novembro de 2017, totalizando 560 horas.

O Departamento de Reprodução Animal da FMVZ foi criado em 1988 e possui sedes em dois campi, São Paulo e Pirassununga – SP. No campus de Pirassununga encontra-se o Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA), composto por quatro laboratórios de pesquisa. Além do LFEM, conta com o Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA), Laboratório de Biotecnologia de Ovinos e Caprinos (LBOC) e Laboratório de Farmacologia e Endocrinologia da Reprodução (LFEER).

O CBRA possui uma área aproximada de 210.000 m², com área construída de 2.000 m². O Centro compreende quatro salas para docentes, secretaria, anfiteatro, sala para colheita de sêmen e embriões, sala de estudos, área de laboratórios, piquetes e pastagens para alojar os animais utilizados em experimentos. Para que o manejo reprodutivo seja realizado de forma segura e precisa há um curral coberto, sete troncos de contenção, e aparato para ultrassonografia.

O LFEM atua na elucidação dos mecanismos que controlam os processos reprodutivos em fêmeas bovinas. No período de ECSMV os projetos de pesquisa do LFEM estavam voltados ao diagnóstico de gestação precoce com o uso de biomarcadores sanguíneos estimulados pelo conceito. Em termos gerais, o projeto visa desenvolver um método de diagnóstico através da quantificação da abundância de genes conhecidamente estimulados por interferon-*tau* (IFN-*tau*), ou pela detecção de novos marcadores que possibilitem a identificação precoce dos animais não-gestantes, conforme avaliação da função luteal.

2.2 Atividades Acompanhadas

As atividades acompanhadas durante o ECSMV e descritas nesse relatório foram relacionadas aos projetos de pesquisa em andamento no LFEM. Neste contexto, buscou-se acompanhar todo o tipo de tarefa dos experimentos desenvolvidos durante o período de estágio. Tais atividades foram classificadas como: técnico-científicas (formulação e delineamento experimental, apresentação e discussão de resultados, discussão de artigos, aulas de pós-graduação e palestras); de manejo dos animais (seleção, acompanhamento, palpação retal, exame ultrassonográfico, coleta de amostras); laboratoriais (processamento das amostras para extração e quantificação de RNA e proteínas), conforme descrito na Tabela 1.

Os experimentos acompanhados visam o estudo endócrino e molecular de eventos fisiológicos envolvidos na reprodução animal, com ênfase na investigação de um método de diagnóstico gestacional baseado no monitoramento da expressão de genes estimulados por IFN-*tau* (ISGs) em bovinos. Estes experimentos fazem parte de um projeto que tem como objetivos: (1) a caracterizar da abundância de ISGs nas células imune polimorfonucleares (PMNs) entre os dias 12 e 20 de gestação, (2) a avaliar do impacto produtivo e econômico da utilização dos métodos diagnósticos propostos, e (3) recomendar de um protocolo de ressincronização precoce.

Tabela 1. Atividades acompanhadas no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular.

Atividades Técnico-científicas		
Atividade	Número de atividades	Frequência das Atividades¹
Treinamento em ultrassonografia <i>Doppler</i>	90	0,1
Reunião para discussão de projetos	9	1,4
Discussão de artigos	8	1,6
Palestras	4	3,2
Aulas de pós-graduação	3	4,3
Curso	1	13
Subtotal	115	8,8²
Atividades de Manejo dos Animais		
Atividade	Número de animais	Frequência das Atividades²
Avaliações ultrassonográficas ovarianas	794	61,1
Coleta de sangue	737	56,7
Inseminação artificial em tempo fixo	172	13,2
Diagnóstico de gestação	52	4
Exame andrológico	10	0,8
Subtotal	1765	135,8
Atividades Laboratoriais		
Atividade	Número de amostras	Frequência das Atividades²
Preparo de plasma para ensaio hormonal	674	51,8
Isolamento de células polimorfonucleares	296	22,8
Isolamento de células mononucleares	296	22,8
Processamento de tecido uterino, ovariano e oviduto	20	1,5
Extração de RNA por <i>Trizol</i>	11	0,8
Subtotal	1297	99,7
Total	3177	244,4²

¹- Intervalo em semanas entre cada atividade. ²- Número semanal de atividades.

2.3 Descrição dos experimentos

2.3.1 Experimento 1 – Diagnóstico precoce da gestação em bovinos através da expressão ISGs em neutrófilos

A tese do projeto baseia-se no fato de haver biomarcadores detectáveis a partir de amostras sanguíneas, oriundos da resposta de classes específicas de leucócitos ao interferon *tau* produzido pelo embrião bovino, que resulta no estímulo à expressão de ISGs em estágio precoce de gestação. O objetivo principal do projeto é desenvolver um método laboratorial de DG pela quantificação de ISGs em células imunes polimorfonucleares (neutrófilos).

O primeiro experimento do projeto teve por objetivo caracterizar e comparar o perfil de expressão de ISGs nas células imunes polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (PBMC), entre os dias 7 e 20 pós-inseminação em novilhas gestantes e não gestantes. Para tal, os animais foram manipulados de acordo com o desenho experimental ilustrado na Figura 1.

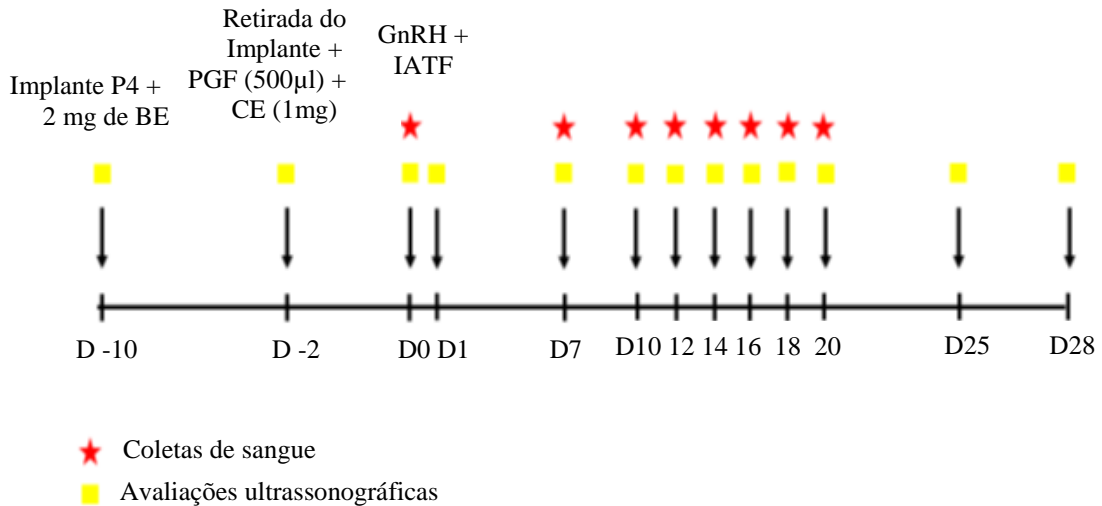


FIGURA 1. Experimento 1 - Desenho Experimental. A ovulação de 30 novilhas da raça Nelore foi sincronizada e os animais foram inseminados em tempo fixo (IATF), foi considerado o dia da inseminação o Dia 0 do protocolo. As avaliações ultrassonográficas e as coletas de sangue para isolamento de PMN, PBMC e análise hormonal (progesterona) foram realizadas nos dias 0, 7, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 do protocolo. O DG definitivo foi realizado nos dias 25 e 28 através de avaliações ultrassonográficas, sendo considerados gestantes os animais que apresentavam corpo lúteo funcional (perfusão sanguínea luteal maior que 25% e área luteal maior que 2 cm²) associado à presença de líquido e membrana embrionária.

2.3.2 Experimento 2 – Efeitos da ressincronização da ovulação com estradiol aos 14 dias pós-IATF sobre as características morfofuncionais do corpo lúteo e útero em fêmeas Nelore

A tese do projeto baseia-se na escassez de informações e conflito entre resultados acerca do efeito do estradiol-17 beta (17 β) e do benzoato de estradiol (BE) na ressincronização da ovulação precoce em fêmeas gestantes. O objetivo principal do projeto é estudar os efeitos do tratamento com BE ou 17 β associado à progesterona (P4) no Dia 14 após IATF na emergência de uma nova onda folicular, indução da luteólise e manutenção da gestação em novilhas Nelore. Os animais foram manipulados de acordo com o desenho experimental ilustrado na Figura 2.

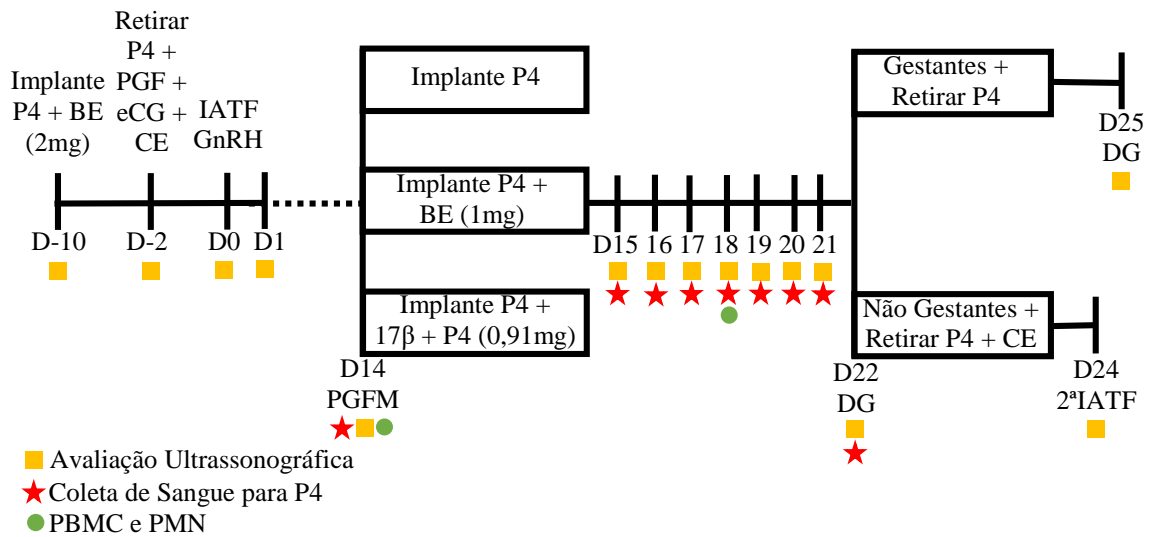


Figura 2. Experimento 2 - Desenho Experimental. Novilhas da raça Nelore, foram submetidas à IATF. As avaliações ultrassonográficas e coletas de sangue para dosagem de P4 foram realizadas diariamente do 14º ao 22º dia após a IATF. Adicionalmente, no 14º e 18º dia pós IATF foi coletado sangue para o isolamento de células sanguíneas (PBMC e PMN). No 14º dia também foram realizadas coletas de sangue seriadas, a cada hora por 11 horas consecutivas, para a dosagem do metabólito de PGF2α (PGFM). Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: controle (apenas implante de P4), grupo BE (implante de P4 mais a 1 mg de BE), e grupo 17β+P4 (implante de P4 mais a aplicação de 17β e 0,91 mg de P4 injetável). O diagnóstico de gestação definitivo foi realizado no dia 25 após a IATF através da identificação da vesícula embrionária e em fêmeas não gestantes foi identificada a ocorrência da ovulação no dia 23.

No experimento acompanhado foi possível resincronizar as fêmeas aos 14 dias após IATF, com a utilização de apenas o implante intravaginal, ou a associação do implante de P4 e 1 mg de BE, ou ainda o implante de P4 mais o 17β-estradiol e P4 injetável, sem diferença significativa entre os grupos. Os resultados do experimento estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos resultados parciais do experimento 2. Cada grupo era composto por 9 novilhas da raça Nelore.

		Controle (P4)	P4+BE	P4+17β
D22	Gestantes	7	5	5
	Luteólise	2	4	4
Emergência de onda folicular				
Gestantes	Apresentaram	3	4	3
	Não apresentaram	4	1	2
Não Gestantes	Apresentaram	1	3	2
	Não apresentaram	1	1	2
Folículo Dominante	Gestantes (D22)	6,35 mm	8,05 mm	7,8 mm
	Não gestantes (D24)	10,85 mm	10,42 mm	13 mm

O grupo controle foi resincronizado apenas com o dispositivo intravaginal de P4, foi considerado um controle negativo, onde não se esperava a sincronização da emergência da

onda folicular. Todavia, observou-se que três fêmeas gestantes e uma das fêmeas não gestantes apresentaram sincronia de emergência de uma nova onda folicular.

2.4 Atividades Técnico-científicas

Durante o ECSMV foi possível acompanhar as aulas da pós-graduação da disciplina de “Patologia e clínica médicas da reprodução”. O Prof. Rubens Paes de Arruda ministrou uma das aulas teóricas acompanhadas, com foco na fisiologia reprodutiva de garanhões. A Prof.^a Eneiva Carla Celeghini ministrou aula prática de andrologia em touros, onde realizou-se exames interno e externo do sistema reprodutivo, exame termográfico e ultrassonografia dos testículos, coleta de sêmen através de eletroejaculador e avaliação do sêmen. A Dr.^a Angela Maria Gonella-Diaza ministrou aula sobre “Os princípios da técnica de PCR” aos estagiários interessados, abordando conceitos básicos, funcionamento e fases da técnica.

No período de 17 a 19 de agosto de 2017 foi possível participar da 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (SBTE) em Cabo de Santo Agostinho em Pernambuco. Além de participar como ouvinte das palestras, apresentar o trabalho intitulado “Hematological profile and reproductive tract lactic acid bacteria during the estrous cycle in beef cattle”. Nos dias 7 e 8 de outubro de 2017, realizou-se o 2^o Curso Teórico-Prático de Ultrassonografia *Doppler* para Diagnóstico Superprecoce de Gestação em Bovinos. O curso foi realizado em parceria com Dr. Guilherme Pugliesi e os Professores Dr. Ed Hoffmann e Dr. Pietro Baruselli. No curso foram abordados os temas relacionados à fisiologia e endocrinologia da reprodução, bases teóricas do controle farmacológico do ciclo estral e da ovulação, e diagnóstico superprecoce de gestação por ultrassonografia (*Color Doppler*) em protocolos de ressincronização. Ainda foi possível participar como ouvinte de duas palestras ministradas pela Dr.^a Evelise Fonseca e Dr.^a Niamh Forde sobre a inserção do pós-graduando no mercado de trabalho, e do 2^o Encontro do Grupo de Estudos Avançados em Reprodução (GEAR) com tema “Efeito epigenético do corpo cetônico, ácido beta-hidroxibutírico, em células, oócitos e embriões bovinos” ministrado pelo Dr. Juliano Sangalli.

A equipe de pós-graduandos e estagiários do LFEM reunia-se semanalmente para discutir artigos científicos. Foi elaborado um cronograma de discussões, onde cada integrante do grupo deveria escolher e apresentar um artigo de seu interesse. Os artigos escolhidos eram enviados por e-mail com uma semana de antecedência, para que todos pudessem lê-lo. Nestes encontros semanais foi possível apresentar o artigo “Effects of intravaginal lactic acid bacteria on bovine endometrium: Implications in uterine health”. Ainda acompanhar as reuniões de

discussão de experimentos, durante as quais os pós-graduandos deveriam apresentar o experimento ou dados novos obtidos, discutir e avaliar os resultados, assim como decidir as próximas etapas.

Ainda, durante o período do ECSMV foi possível realizar palpação retal do sistema reprodutivo de fêmeas e machos. Treinar a utilização da ultrassonográfica em modo B e *Doppler* em fêmeas bovinas não gestantes e gestantes, sendo possível realizar o diagnóstico de gestação nos dias 25, 28 e 30 pós inseminação artificial.

2.5 Manejo dos Animais

As atividades desenvolvidas relacionadas ao manejo dos animais, bovinos da raça Nelore, foram realizadas no curral (Figura 3), instalação comum do CBRA. Os animais ficaram alojados em um dos três piquetes com cochos para alimentação e bebedouros do LFEM.



FIGURA 3 – Curral com sete troncos de contenção onde foram realizadas as atividades.

2.5.1 Avaliação ultrassonográfica ovariana

A ultrassonografia era realizada para acompanhar o desenvolvimento do folículo e do CL. Nos manejos realizados nos dias -10, -2, 0 do protocolo de IATF eram feitas as medições do maior folículo, considerado o folículo dominante (FD). Essa medição era realizada através da ferramenta “Distância” do aparelho de US onde eram feitas duas medidas perpendiculares (Figura 4A). Entre os dias 14 e 22 do ciclo estral era realizado o acompanhamento do desenvolvimento luteal, onde era medido a área do CL com a ferramenta “Traço”

contornando o CL, também era feita a avaliação da perfusão sanguínea pela utilização da ultrassonografia em modo *Doppler* (Figura 4B).

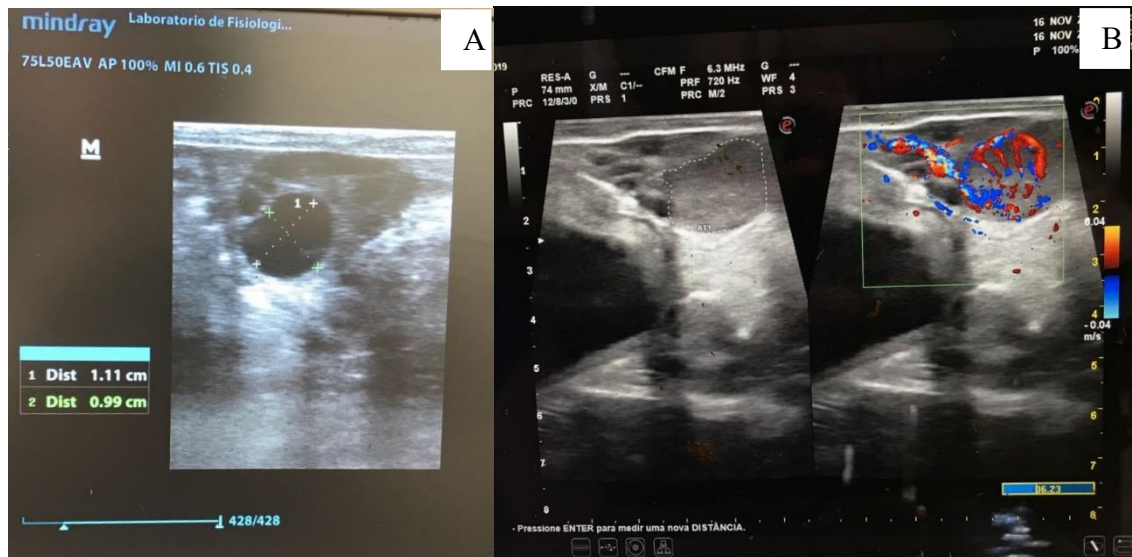


Figura 4. Medições realizadas em US. A. Volume do folículo dominante; linhas branca e verde tracejadas foram utilizadas para medir o diâmetro do folículo e posteriormente calcular o volume do mesmo. B. Área e perfusão sanguínea do CL; imagem da esquerda indica modo B, enquanto imagem da direita indica modo *Doppler*; linha branca tracejada indica delimitação do CL; linha verde indica área de medição do fluxo sanguíneo por modo *Doppler*.

2.5.2 Coleta de Sangue

As coletas de sangue eram realizadas através da punção da veia jugular, com a utilização de agulha 25x8 para coleta a vácuo em tubos com anticoagulante (heparina). Conforme o experimento e os fins de utilização eram coletados 6 ml de sangue para ensaios hormonais (P4 ou PGFM) e 25 ml para isolamento de células sanguíneas.

2.5.3 Diagnóstico de Gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado nos dias 22 e 25 após a IATF, por ultrassonografia via transretal do útero e ovários. Foi considerada gestante a fêmea que apresentava corpo lúteo (CL) funcional, ou seja, com perfusão sanguínea luteal maior que 25% e área maior a 2 cm², associado à presença de líquido e membrana embrionária, sendo em alguns casos possível identificar o batimento cardíaco do embrião.

2.5.4 Exame Andrológico

Durante o estágio foi possível acompanhar o exame andrológico de touros utilizados em experimentos. O exame consistia na avaliação testicular de simetria, mobilidade dentro do escroto, consistência (1- muito flácido a 5- firme) e perímetro. Na avaliação do epidídimo foram palpados a cauda e o corpo do mesmo, não sendo possível palpar a cabeça do epidídimo.

O prepúcio foi avaliado por palpação em busca de aderências, o mesmo foi preparado para a coleta de sêmen com a retirada de pelos próximos ao orifício prepucial e a lavagem interna com a adição de 20 ml solução fisiológica a 37°C, após a adição da solução o prepúcio era ordenhado e seco.

O exame dos órgãos internos foi realizado por palpação transretal, onde foi possível avaliar a próstata, as ampolas e as vesículas seminais, anotando a consistência, simetria e lobulação. O sêmen foi coletado por eletroejaculador, e foi avaliado quanto ao seu aspecto (cremoso, leitoso, opalescente ou aquoso), motilidade (0 a 100%), volume (5 a 8 ml), turbilhonamento (0 a +++) e vigor (1 a 5).

2.5.5 Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)

As novilhas utilizadas nos experimentos tiveram sua ovulação sincronizada pela inserção do implante intravaginal de progesterona (P4), administração intramuscular (IM) de 2 ml de benzoato de estradiol (BE) e 2 ml de análogo de prostaglandina F2 α (PGF2 α) no dia considerado D-10. Após 8 dias (D-2), os implantes foram retirados e foi administrado IM a dose de 2 ml de análogo de PGF2 α , 1 ml de gonadotrofina coriônica equina (eCG, 300 UI) e 0,5 ml de cipionato de estradiol (CE). A inseminação artificial e a administração de 2 ml de análogo de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) foi realizada 2 dias após a retirada do implante, sendo considerado o dia 0 do protocolo. No dia 1 foi verificada a ovulação dos animais.

2.6 Técnicas Laboratoriais

As técnicas laboratoriais desenvolvidas no LFEM (Figura 5) envolvem, além das atividades descritas a seguir, a realização de *Western Blotting*, eletroforese em gel de Agarose e qPCR.

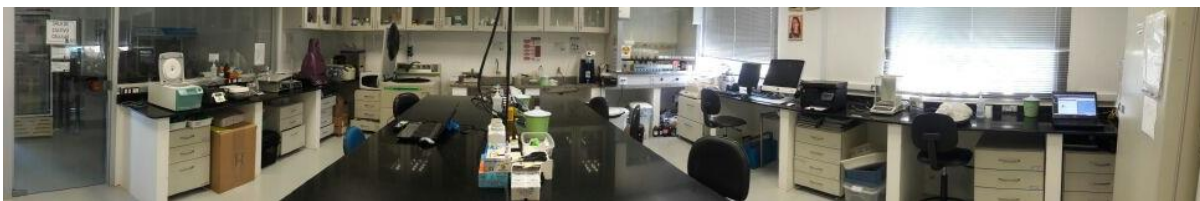


FIGURA 5. Laboratório para processamento de amostras, análises bioquímicas, moleculares e cultivo celular *in vitro*.

2.6.1 Preparo de Plasma para Ensaio Hormonal

Os tubos de sangue com heparina foram centrifugados a $2.700 \times g$, a 4°C por 15 min, após a centrifugação o plasma de cada amostra foi transferido para dois microtubos de 1,5 ml, para armazenamento a -20°C até seu envio para a dosagem de P4 ou PGFM.

2.6.2 Isolamento Celular

As células mononucleares (PBMC) são células sanguíneas com núcleo não lobulado (monócitos e linfócitos) e as células polimorfonucleares (PMN) são as células que possuem núcleo lobulado (neutrófilos). Ambas as populações celulares podem ser obtidas a partir de sangue periférico por separação em gradiente de densidade.

Para o isolamento de células imunes, 25 ml de PBS foram misturados a 25 ml de sangue total, esta solução é depositada sobre 15 ml de solução de Ficoll em tubos de 50 ml (qsp). A solução foi centrifugada a $1.100 \times g$, por 30 minutos a 20°C , a fim de obter a separação das camadas (plasma, PBMC e PMN). Para o isolamento de cada camada, primeiramente, foi coletada a camada de células mononucleares (PBMC), anel branco na superfície do Ficoll, a qual foi transferida a um segundo tubo cônico. O plasma sanguíneo foi desprezado, e a última camada, correspondendo às células polimorfonucleares (PMN), foi armazenada.

2.6.2.1 Protocolo para Extração de PBMCs

O protocolo de isolamento das PBMCs, segue a metodologia descrita por Pugliesi et al. (2014). Os tubos contendo o anel de PBMCs, receberam 50 ml PBS (qsp), foram homogeneizados e centrifugados a $900 \times g$ por 15 minutos. Após a centrifugação formou-se um *pellet* contendo células, as quais foram processadas após descarte do sobrenadante. Para lisar os glóbulos vermelhos, um contaminante comum da amostra, utilizou-se 15 ml de uma

solução hipertônica e incubação por 10 min a temperatura ambiente. Ao final do período de incubação a isotonicidade dos monócitos e linfócitos foi restaurada com PBS, a amostra novamente centrifugada a 900 X g por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* ressuscitado com 2 ml de PBS. A suspensão de células foi transferida para dois microtubos de 1,5 ml livres de DNase e RNase. A suspensão foi novamente centrifugada, a 3.300 X g, 4°C por 8 minutos, descartando-se o sobrenadante para posterior armazenamento da amostra a -80°C até a extração de RNA.

2.6.2.2 Protocolo para Extração de PMNs

O protocolo de isolamento das PMNs, segue a metodologia adaptada da descrita por Jiemtaweeboon et al. (2011). Nos tubos contendo a última camada do gradiente de densidade (PMNs), foram realizadas duas lavagem para lisar os glóbulos vermelhos. As lavagens foram realizadas da seguinte maneira: adicionou-se água destilada (hipotônica) em volume igual ao da amostra, incubando a suspensão celular por aproximadamente 10 segundos; imediatamente, completou-se com 50 ml de PBS concentrado duas vezes (qsp), homogeneizou-se a amostra, seguido de centrifugação a 900 X g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado novamente. Após descartar o sobrenadante da segunda lavagem, foi realizada lavagem com solução de lise hipertônica, por meio de incubação com 10 ml da solução de lise por 10 minutos, e posteriormente completando-se com 40 ml de PBS (qsp). A amostra foi centrifugada a 900 X g por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* ressuscitado em 2 ml de PBS e transferido para dois microtubos de 1,5 ml livres de DNase e RNase. A suspensão foi novamente centrifugada, a 3.300 X g, a 4°C por 8 minutos, descartando-se o sobrenadante e armazenando a amostra a -80°C até a extração de RNA.

2.6.3 Extração de RNA por *Trizol*

Esta atividade estava relacionada a um projeto de mestrado realizado anteriormente ao período de estágio, por esse motivo foi acompanhado apenas a extração do RNA. Foram utilizadas amostras de células epiteliais do colo uterino coletas por *cytobrush* (Figura 6). Conforme descrito por Cardoso et al. (2017), as amostras foram armazenadas em criotubos com 1 ml de reagente *Trizol* mantidas a -80°C até o seu processamento. O protocolo de

extração de RNA por *Trizol* utilizado foi adaptado da metodologia descrita por Chomczynski (1993).

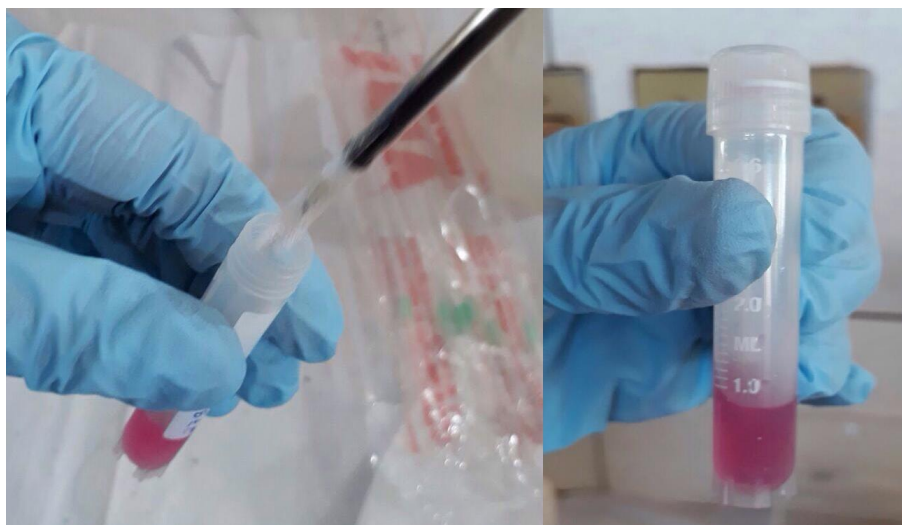


FIGURA 6. Processamento de amostra uterina coletada por meio de escova citológica (*cytobrush*).

As amostras são retiradas do freezer e colocadas no gelo, para que descongelarem lentamente. A fim de auxiliar o processo de lise celular, os tubos com as amostras são homogeneizados no vórtex em velocidade máxima por 5 minutos. Após a lise as amostras são transferidas para microtubos de 1,5 ml e a escova citológica (*cytobrush*) é descartada. Para separar o RNA do DNA e das proteínas coloca-se 266 μ l de clorofórmio na amostra, mistura-se por 15 segundos em vórtex, incuba em temperatura ambiente por 5 minutos e centrifuga a 12.000 X g a 4°C por 15 minutos. Após a centrifugação o RNA suspende formando uma fase aquosa, essa fase é transferida para outro microtubo onde é adicionado 333 μ l de isopropanol, as amostras são incubadas por 10 minutos e armazenadas em -80°C *overnight*.

No dia seguinte as amostras são descongeladas em gelo e centrifugadas a 15.000 X g a 4°C por 8 minutos, ao final da centrifugação o RNA precipita formando um *pellet* branco. Descarta-se o sobrenadante. Começa então as lavagens do RNA com 600 μ l de etanol 75%, homogeneíza rapidamente no vórtex e centrifuga-se a 15.000 X g a 4°C por 5 minutos, descarta o sobrenadante e repete a lavagem. Após descartar o sobrenadante adiciona-se 12 μ l de água livre de nucleases, as amostras são mantidas a 55°C por 15 minutos. Para a quantificação do RNA as amostras são colocadas no gelo e é feita a quantificação em equipamento específico, as amostras são armazenadas a -80°C até a síntese de cDNA.

2.6.4 Processamento de tecidos

Durante o ECSMV foi possível acompanhar o experimento do pesquisador Juliano Coelho da Silveira em conjunto com a Dr.^a Niamh Forde. Foi realizado o diagnóstico de gestação das fêmeas bovinas por meio da ultrassonográfica no dia 19 após o serviço (inseminação artificial, transferência de embriões ou transferência de clones) e 20 fêmeas gestantes foram abatidas, sendo que o trato reprodutivo (ovários, ovidutos e útero) foi coletado. Realizou-se a lavagem uterina para se obter o embrião. Após a lavagem e retirada do embrião, foi confirmado em qual dos ovários estava o CL e as coletas foram realizadas ipsilaterais ao CL. Dos ovários coletou-se o corpo lúteo, do oviduto coletou-se fragmentos do istmo e ampola, e do corno e corpo uterino foram coletados fragmentos de carúnculas e tecido intercaruncular. Os segmentos foram armazenados na parafina para posterior realização das lâminas histológicas, ou em microtubos para realização de PCR.

3. DISCUSSÃO

3.1 Ciclo estral e manipulação farmacológica

As fêmeas bovinas são consideradas poliéstricas anuais, ou seja, a atividade cíclica (ciclo estral) ocorre durante todo o ano, sendo interrompida quando a fêmea apresenta um quadro de gestação, lactação e/ou condições patológicas (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012). O ciclo estral é o intervalo entre dois períodos de receptividade sexual (estro), sendo que em vacas os ciclos estrais duram aproximadamente 21 dias (variam de 17 a 24 dias). O ciclo estral é dividido de acordo com a estrutura e o hormônio predominante no ovário em fase folicular que dura de 3 a 6 dias e fase luteínica com duração de 16 a 17 dias (BALL; PETERS, 2006).

A fase folicular começa com a regressão do corpo lúteo (luteólise) na redução marcante de progesterona. O efeito de retroalimentação negativa que a P4 vinha exercendo no hipotálamo sob a produção de GnRH é retirado, assim o hipotálamo aumenta a liberação de GnRH, que estimula a liberação de FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante). As gonadotrofinas estimulam o crescimento folicular e com isso a produção de estradiol (E2) pelos folículos (SENGER, 2003). O estradiol é o hormônio predominante nesta fase sendo responsável por alterações do trato reprodutivo e pela receptividade sexual.

A fase folicular, como o próprio nome sugere, está relacionada à foliculogênese e para o melhor entendimento dessa fase é necessário entender como ocorre a dinâmica folicular, processo este que abrange quatro etapas, sendo elas: o recrutamento, a seleção, a dominância e a atresia. A primeira etapa consiste no recrutamento de um grupo de folículos pequenos que começam a crescer e produzir E2 em doses baixas, nessa etapa as concentrações de FSH estão altas e de LH estão baixas. Na seleção em bovinos apenas um folículo é selecionado para tornar-se dominante. Na dominância o folículo selecionado exerce um efeito inibitório sobre os demais folículos, através da produção de inibina que exerce uma retroalimentação negativa na liberação de FSH, essa etapa é caracterizada pela alta concentração de LH, E2 e inibina. A última etapa é chamada de atresia, nela ocorre a degeneração dos folículos causada pela inibina que bloqueia seletivamente a liberação de FSH culminando em atresia folicular (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Proestro e estro são subdivisões da fase folicular. O proestro compreende da luteólise ao início do estro, cerca de 2 a 5 dias, e é caracterizado pela alternância de dominância dos hormônios esteroides, ocorrendo a diminuição de P4 e aumento de E2 sendo que os responsáveis por essa transição são o FSH e o LH, pode-se dizer que os principais eventos que ocorrem nessa fase são a formação do folículo pré-ovulatório e a preparação do trato reprodutivo para o estro. O estro dura aproximadamente 15 horas (6 a 24 horas), é nessa fase que acontece a receptividade sexual, onde as fêmeas apresentam sinais estro (vocalização, nervosismos, diminui ingestão de comida) e aceitam a monta, o principal evento que acontece no estro é a ovulação resultante de um pico de E2 que leva a um pico de LH. Bovinos é a única espécie em que a ovulação acontece de 24 a 32 horas após o estro (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Em resumo, na fase folicular ocorrem os seguintes eventos, liberação de gonadotrofinas pela hipófise anterior, o folículo é preparado para a ovulação, há receptividade sexual e ocorre a ovulação que marca o final dessa fase.

A fase luteínica tem início com a ovulação, inclui o desenvolvimento do CL e termina com a sua luteólise causada pela PGF2 α liberada pelo endométrio das fêmeas não gestantes. Nessa fase há crescimento folicular e produção de baixas concentrações de E2 porém os folículos sofrem atresia, o ciclo estral pode ter de duas a três ondas foliculares sendo que apenas uma onda produz o folículo ovulatório. O hormônio predominante nessa fase é a progesterona produzida pelo CL, que exerce funções como a retroalimentação negativa no hipotálamo sobre a liberação de GnRH e prepara o útero para receber o embrião com a estimulação de secreção das glândulas endometriais e o efeito inibitório sobre o miométrio, reduzindo suas contrações (BALL e PETERS, 2006). Metaestro e diestro são subdivisões dessa fase. O metaestro inicia após a ovulação quando as células do folículo rompido sofrem uma remodelação estrutural e celular que resulta na formação do CL. As células foliculares passam pelo processo de luteinização, que inicia algumas horas antes da ovulação e continua no metaestro pelo efeito contínuo de LH. As células da granulosa após a luteinização diferem-se em células luteais grandes que possuem um grande número de grânulos secretores de ocitocina e relaxina, e as células da teca interna formam as células luteais pequenas que possuem numerosas gotículas de lipídeos no citoplasma, ambos os tipos celulares são esteroideogênicos, ou seja, possuem a habilidade de produzir P4 (SENGER, 2003). O LH causa diferenciação celular que resulta na alternância de dominância entre os hormônios esteroides, diminui as concentrações de E2 e aumenta as de P4, as concentrações de LH se mantêm baixas apenas o suficiente para fazer a manutenção da função do CL. São necessários de três a cinco dias para que o CL produza quantidade significativas de P4.

O diestro inicia quando o CL atinge sua função plena (platô de P4) e finaliza com a luteólise, durando de 10 a 14 dias, no final do diestro o corpo lúteo perde função e reduz de tamanho. Nos onze primeiros dias de diestro, as glândulas endometriais atingem seu máximo de produção, essa secreção em fêmeas gestantes promove ao embrião uma nutrição histotrófica (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012). Em ruminantes a luteólise está associada a um fator luteolítico a $PGF2\alpha$ que é produzida durante todo o ciclo estral em três a quatro pulsos por dia mas para causar luteólise são necessários cinco pulsos de $PGF2\alpha$ por dia (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Luteólise é causada pela liberação de ocitocina pelo CL que atua no endométrio, na ausência de embrião há produção de $PGF2\alpha$ pelo endométrio, com a luteólise há diminuição das concentrações de P4 removendo o bloqueio da liberação de GnRH, iniciando assim o desenvolvimento folicular. Em resumo, na fase luteínica ocorrem os seguintes eventos, transformações das células foliculares em luteais, desenvolvimento do CL e luteólise.

Vários métodos para sincronizar o estro têm sido desenvolvidos e utilizados para facilitar e tornar mais eficiente o manejo reprodutivo. A utilização de análogos de $PGF2\alpha$ foi um dos protocolos mais utilizados para sincronização de estros em bovinos (ODDE, 1990). A $PGF2\alpha$ induz a regressão do CL levando à diminuição das concentrações circulantes de P4, desbloqueio do eixo hipotalâmico-hipofisário, e resultando no pico de GnRH seguido do pico de LH, aproximadamente três a cinco dias após sua aplicação. Martineza et al. (1999) descreveram que o intervalo entre a administração de $PGF2\alpha$ e a ovulação variam de acordo com o dia do tratamento no ciclo estral, sendo que quando aplicada no dia cinco do ciclo eram necessários três dias para a ovulação, no 12º dia a ovulação ocorreu em cinco dias e quando aplicado no 8º dia ocorreu em quatro dias. A utilização da $PGF2\alpha$ não se aplica às fêmeas em anestro devido à falta do CL, e em fêmeas que ovularam a menos de 5 dias, uma vez que nestes casos o CL não apresenta receptores para $PGF2\alpha$. No protocolo Ovsynch, que consiste na associação de GnRH e $PGF2\alpha$, o GnRH é aplicado IM e sete dias após aplica-se $PGF2\alpha$, e uma segunda aplicação de GnRH 48 horas após a $PGF2\alpha$ (BÓ et al., 2003). Pursley et al. (1995) observaram que a ovulação do folículo dominante ocorre após a primeira aplicação de GnRH, e o início de uma nova onda folicular ocorre de dois a três dias após a aplicação. Assim a $PGF2\alpha$ provoca luteólise e a ovulação ocorre entre 24 e 32 horas após a segunda aplicação de GnRH. Resultados inconstantes são apresentados nos protocolos que utilizam GnRH principalmente relacionadas a falhas na indução da emergência de uma nova onda folicular após o primeiro tratamento com GnRH (BÓ et al., 2003; COLAZO et al., 2014). Adicionalmente, o implante intravaginal de P4 é um método amplamente utilizado para a

sincronização de estros. O implante libera P4 de forma lenta e constante, mantendo a retroalimentação negativa ao hipotálamo e hipófise e, conseqüentemente, reduzindo a taxa de crescimento folicular e inibindo a ovulação. Após a retirada do implante o estro leva de dois a três dias para se manifestar em resposta ao estradiol produzido pelo folículo dominante que, ausência de P4, desenvolve-se a taxas de crescimento mais elevadas. A associação entre o implante intravaginal de P4 e uma aplicação de estrógenos na colocação do implante causa ovulação de um possível folículo dominante e inicia uma nova onda folicular (BÓ et al., 2003). Um protocolo amplamente utilizado para a sincronização de estros consiste na associação de P4, estrógenos e a $PGF2\alpha$. Normalmente, no momento da inserção do implante de P4 aplica-se o estradiol (MARTÍNEZ et al., 2005). Todavia, na retirada do implante de P4 (sete a oito dias após sua inserção) aplica-se também uma dose baixa de estradiol para induzir o pico de LH. Neste caso, a ovulação ocorre entre 24 a 32 após a aplicação (BARUSELI et al., 2012). A investigação científica acerca da manipulação farmacológica do ciclo estral levou ao desenvolvimento de protocolos hormonais de sincronização da ovulação que possibilitaram a disseminação do uso de diversas biotécnicas da reprodução animal.

No Brasil a primeira inseminação artificial (IA) foi realizada em 1940, porém sua utilização comercial só foi difundida a partir da década de 70. A IA consiste em depositar o sêmen no trato reprodutivo feminino, permitindo que o espermatozoide fecunde o oócito. Quando comparamos a IA com a monta natural, a IA apresenta algumas vantagens como: melhoramento genético rápido e eficiente, controle de doenças venéreas (tricomoníase e campilobacteriose), aumento do número de descendentes por reprodutor, padronização de rebanho, utilização de reprodutores post-mortem, impedidos de realizar a monta, ou fisicamente distantes, e melhora controle zootécnico de rebanhos. Os fatores limitantes da IA estão relacionados à intensificação do manejo, a necessidade de mão de obra qualificada, em especial no tocante à detecção de cio. Devido à dificuldade de realizar manejos diários nos rebanhos, a fim de atingir a máxima eficiência na detecção de cios, e com base nos princípios da manipulação hormonal do ciclo estral, foi desenvolvida e tem sido implementada de forma crescente no Brasil, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Entre as principais vantagens da IATF cita-se: a ausência da necessidade de observação de cio, alto percentual de fêmeas gestantes no início da estação de monta, e concentração do uso da mão de obra (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Na busca contínua pela intensificação dos programas reprodutivos, a ideia de um protocolo de ressincronização da ovulação busca aumentar a eficiência da IATF, por meio da redução no intervalo entre tentativas de tornar as fêmeas gestantes. Considerando que o ciclo estral de vacas inseminadas por IATF que não se

tornaram gestantes encontra-se sincronizado, a ressinchronização para uma segunda IA é plenamente viável. Segundo Bartolome et al. (2005) a ressinchronização pode ser realizada aos 23 dias após a primeira IATF, utilizado GnRH ou cipionato de estradiol (CE) sem diferença significativa entre os tratamentos. Sá Filho et al. (2014) descrevem que a ressinchronização pode ser realizada com sucesso e sem prejuízos as fêmeas gestantes mais cedo, aos 22 dias após a primeira IA com a utilização de 1 mg de benzoato de estradiol (BE). Todavia, a administração de estradiol no período de reconhecimento materno da gestação é controverso, uma vez que estudos anteriores relataram que aplicação de estradiol nos dias 13 e 14 após a IA, poderia comprometer a habilidade do corpo lúteo em produzir progesterona e consequentemente a manutenção da gestação (EL-ZARKOUNY e STEVENSON, 2004). A ressinchronização realizada aos 19 dias após a primeira IATF com a utilização GnRH não causa perda embrionária, porém apresenta taxas de gestação inferiores aos protocolos iniciados nos dias 26 e 33 (FRICKE, 2013).

3.2 Diagnóstico de gestação

Em fêmeas gestantes é necessário que o embrião sinalize sua presença para evitar a luteólise e a gestação possa se manter, esse período é conhecido com reconhecimento materno de gestação. A presença de um CL funcional no início da gestação é essencial para ruminantes sustentarem a gestação (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Em ruminantes o alongamento do embrião permite maior contato entre o trofoblasto e o endométrio aumentando a eficiência da sinalização que ocorre quando o embrião se sobrepõe e adere-se ao endométrio. Neste contexto, os interferons são glicoproteínas não específicas produzidas por leucócitos, fibroblastos, linfócitos e pelas células do trofoblasto, dentre suas funções pode-se citar a função antiviral e imunomoduladora além da sua ação em fêmeas gestantes. Em bovinos as células trofoblásticas do blastocisto sintetizam o IFN-*tau* que atua no reconhecimento materno de gestação, que ocorre entre o 16º ao 19º dia de gestação. O IFN-*tau* atua no endométrio inibindo a síntese dos receptores de ocitocina, hormônio responsável por estimular a produção de PGF2 α pelo endométrio. Neste contexto, sem a prostaglandina não há luteólise (SPENCER et al., 2004). O IFN-*tau* juntamente com a P4, atua aumentando a produção de histotrofo pelas glândulas uterinas.

O IFN-*tau* encontra-se localizado no útero não sendo possível encontrá-lo na circulação periférica. Todavia, o IFN-*tau* induz a expressão de genes estimulados por interferons (ISGs) em células endometriais e sanguíneas que passam pelo útero (YANKEY et al., 2001). Estudos

demonstraram que a maior expressão de ISGs ocorre após a liberação de IFN-*tau* pelo concepto em fêmeas bovinas gestantes (HAN et al., 2006), sugerindo que a função endócrina do IFN-*tau* está diretamente ligado às ISGs. Segundo Bott et al. (2010) o IFN-*tau* atua através de ISGs em tecidos extrauterinos, sendo que pode estar relacionado a resistência do CL à ação luteolítica da PGF2 α .

O diagnóstico de gestação (DG) é uma ferramenta utilizada na detecção da existência e determinação do período de gestação no momento da avaliação. O diagnóstico precoce de gestação permite diminuir o intervalo entre as inseminações, diminuindo assim o intervalo entre partos e as perdas com vacas não gestantes no final da estação de monta. Entre os métodos utilizados como diagnóstico de gestação há a observação do comportamento de estro. A técnica presume que as fêmeas estão gestantes quando 21 dias após a inseminação artificial (IA) ou monta natural elas não retornam ao estro. A confiabilidade dessa técnica depende do método utilizado para detectar o estro, e em bovinos a confiabilidade é afetada pelo anestro (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Adicionalmente, desde o século XX, a palpação retal vem sendo utilizada como diagnóstico de gestação em bovinos aos 45 dias, por ser um método prático e preciso. O método consiste na palpação uterina para detectar o aumento de volume causado pela gestação, porém no início da gestação e em não gestantes o diâmetro dos cornos uterinos são semelhantes só há diferenciação a partir do 40º dia de gestação (BALL e PETERS, 2006). Aos 40 dias de gestação, o útero encontra-se relaxado sendo possível realizar a técnica de beliscamento (deslizamento do corio-alantóide sobre a parede do útero), a partir dos 4 meses já é possível palpar os placentomas (carúnculas e cotilédones). É importante associar o aumento de volume uterino com os outros sinais como: presença de vesícula amniótica, efeito de parede dupla, placentomas e/ou feto, a observação desses sinais variam de acordo com a fase gestacional. O ideal é associar mais de um método de diagnóstico a fim de reduzir falsos positivos gerados pela repleção vesical ou presença de conteúdo uterino não fisiológico, por exemplo piometra e hidrométrio (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

No início da gestação bovina o concepto produz diversas substâncias, possibilitando o desenvolvimento de um método imunológico para identificação da gestação, baseando-se na detecção dessas substâncias presentes no sangue, urina ou leite. A proteína específica de gestação B (bPSPB) tem sido rotineiramente mensurada através de radioimunoensaio em soro de vacas gestantes a partir do 28º dia (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Por ser uma proteína de tecido placentário, sua presença confirma a gestação por isso o teste é considerado definido, chegando a 90% de eficácia. O diagnóstico de gestação pode ser realizado através da mensuração de P4 entre os dias 17 e 24 de gestação, visto que em vacas não gestantes a P4

diminui significativamente sua concentração aos 17 dias pós serviço (IA ou monta natural) e em gestantes as concentrações devem permanecer altas devido à persistência do CL. Este método é considerado definitivo para vacas não gestantes (100% de precisão). As causas para a ocorrência de falsos positivos podem estar relacionadas a ciclos estrais mais longos (28 dias) ou curtos (17 dias), a realização da IA no diestro (fase luteínica) onde as concentrações de P4 estarão elevadas, ou a mortalidade embrionário entre a data da amostragem e a confirmação da gestação por palpação retal ou ultrassonografia (BALL e PETERS, 2006). Os erros podem ser minimizados com a repetição do teste, sendo realizado no momento da IA e no DG ou no DG e aos 42 dias de gestação.

Desde 1980 a ultrassonografia (US) tem sido utilizada para avaliar os tecidos moles quanto ao tamanho, forma, localização e consistência, sendo considerada um marco importante para o entendimento dos eventos fisiológicos envolvidos no ciclo estral e gestação. A US instantânea em modo B, consiste na avaliação bidimensional de cortes transversais dos tecidos. Em bovinos o modo B permite acompanhar o desenvolvimento embrionário sendo possível observar entre os dias 17 e 19 pós serviço a vesícula embrionária, área não ecogênica e esférica no lúmen uterino, aos 22 dias o embrião está visível, entre os dias 20 e 25 a viabilidade do batimento cardíaco fetal (184 a 188 bpm). O DG por este método é usualmente realizado aos 28 dias de gestação, mas também é considerado preciso (100%) aos 25 dias pós serviço quando é fácil a visualização do embrião, porém já vem sendo realizado aos 22 dias (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008), conforme observado nos experimentos acompanhados durante o ECSMV.

A ultrassonografia em modo *Doppler* é utilizada para avaliar o fluxo sanguíneo dos órgãos. Ao avaliar, por exemplo, o batimento cardíaco e fluxo sanguíneo (cordão umbilical) do feto ou a circulação materna (artéria uterina) a onda de alta frequência que o transdutor emite é alterada, essa onda alterada é refletida ao transdutor e convertida em imagens coloridas, que podem ser avaliadas pelo modo convencional, ou *Color Doppler*, ou pelo modo *Power Doppler* (HERZOG et al., 2011). A utilização do *Color Doppler* permite avaliar a direção do fluxo em relação ao transdutor, normalmente tons de vermelho indicam fluxo em direção ao transdutor e azul aqueles que se afastam do transdutor (MCDICKEN; ANDERSON, 2002). O *Power Doppler* é uma técnica utilizada para avaliar o fluxo em pequenos vasos, portanto, fornece imagens mais completas de vascularização do que o *Color Doppler*. O *Doppler* é considerado uma técnica de primeira linha que vem sendo utilizada tanto na medicina veterinária como na medicina humana. Sua utilização na medicina humana passa primeiramente pela avaliação em modelos animais, principalmente ovelhas. Mourier et

al. (2017) utilizaram o *Doppler* para avaliar o fluxo sanguíneo uteroplacentário de ovelhas a fim de desenvolver um modelo de circulação uteroplacentária que se aplique a gestação humana. As mudanças no fluxo sanguíneo da artéria uterina avaliada com a US *Doppler* em ovinos e caprinos permite prever a data do parto, além de fornecer um mapeamento da fisiologia do fluxo sanguíneo uterino durante a gestação (ELMETWALLY; ROHN; MEINECKE-TILLMANN, 2016). A literatura descreve vários métodos de DG, e sugere a associação de mais de um método para aumentar a precisão do diagnóstico. Nos experimentos acompanhados foi possível visualizar o DG por US em modo B e *Doppler*, sendo que foram coletadas amostras de sangue para a mensuração de P4 e amostras para estabelecer um método de DG precoce através da expressão das ISGs em PMN e PBMC.

O IFN-*tau* estimula a expressão de IGSs em tecidos intra e extrauterinos, e por ser uma citocina pode estimular a atividade de leucócitos (GIFFORD, 2007). Estudos anteriores, indicam que a medição da atividade de ISGs em leucócitos pode ser usada como um método de DG alternativo e precoce aos 18 dias, porém essa medição não se aplicada a outros fluidos corporais, como o leite (KÖSE, 2014). Garcia-Sastre e Biron (2006) relataram que o IFN-*tau* induz a expressão de mais de 100 ISGs. Todavia Austin et al. (2004) descreve que apenas alguns sofrem aumento nos leucócitos devido à gestação. A fim de comparar a precisão da técnica de DG pela expressão das ISGs, durante o manejo animal foi realizado a US em modo B e *Doppler*.

A ultrassonografia *Doppler* tem sido utilizada na reprodução bovina como ferramenta de avaliação da perfusão sanguínea das estruturas ovarianas (CL e folículos) para verificar a funcionalidades das mesmas e diferenciar os padrões encontrados em gestantes e não gestantes (PUGLIESI et al., 2014). Nos experimentos era feito o acompanhamento das fêmeas todos os dias para verificar o desenvolvimento do folículo e do CL. As fêmeas foram consideradas gestantes quando o CL apresenta área maior que 2 cm² e perfusão sanguínea luteal maior que 25% (PUGLIESI et al., 2014) aos 22 dias, associando as características do CL com a presença de líquido no útero. O DG realizado aos 25 dias considerou gestantes as fêmeas que apresentavam o CL funcional associado à presença do embrião e visualização do batimento cardíaco. Kelley et al. (2017) descrevem que fazer o DG somente pela perfusão sanguínea do CL não é um método eficiente em bovinos leiteiros, principalmente quando se quer avaliar o risco de perda embrionária aos 34 dias após IA, condizendo com o que foi visualizado em um dos animais acompanhados, onde a novilha foi considerada gestante aos 25 dias e ao repetir o DG aos 30 dias havia ocorrido a perda embrionária, sendo que o CL apresentava perfusão de 25%. Estudos realizados por Brogan et al. (2016) em éguas,

confirmou que há uma correlação positiva entre a área e o fluxo do CL com as concentrações circulantes de P4, fato esse que se espera confirmar em bovinos de corte ao relacionar a mensuração da curva de P4 com as características do CL levantadas durante a realização dos experimentos.

4. CONCLUSÃO

Há diversos métodos de DG para cada fase da gestação, sendo possível associá-los para aumentar a precisão do diagnóstico. Cada vez mais tem se estudado alternativas para diagnósticos precoces a fim de diminuir as perdas relacionadas a fêmeas não gestantes, de modo a realizar uma nova IATF o mais cedo possível e possibilitar que as fêmeas não gestantes tenham uma nova oportunidade de concepção.

Na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) o ECSMV é um dos requisitos para o acadêmico receber o título de Bacharel em Medicina Veterinária. O estágio objetivou conceder ao acadêmico uma conciliação da teoria vista nos anos de graduação com a vivência e desenvolvimento da prática do exercício profissional na área de atuação de preferência do acadêmico, preparando-o para o mercado de trabalho. O ECSMV realizado na área de fisiologia da reprodução de bovinos no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular, foi a oportunidade do acadêmico de acompanhar projetos em desenvolvimento pelo laboratório, assim como acompanhar a rotina diária de um laboratório de pesquisa e de seus pós-graduandos, participar das reuniões técnico-científicas, aumentando o interesse da acadêmica pela pós-graduação e a incentivando na direção da continuidade da carreira acadêmica.

REFERÊNCIAS

ASBIA. **INDEX ASBIA MERCADO 2014**. Associação Brasileira de Inseminação Artificial, v.3, p. 30, 2014. Disponível em: < <http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/> >. Acesso em: 14 nov. 2017.

AUSTIN, K. J.; CARR, A. L.; PRU, J. K.; HEARNE, C. E.; GEORGE, E. L.; BELDEN, E. L.; HANSEN, T. R. Localization of ISG15 and Conjugated Proteins in Bovine Endometrium Using Immunohistochemistry and Electron Microscopy. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 967–975, 2004. Disponível em: < <https://academic.oup.com/endo/article/145/2/967/2500831/Localization-of-ISG15-and-Conjugated-Proteins-in> >. Acesso em: 08 nov. 2017.

BALL, P. J. H; PETERS, A. R. **Reprodução em Bovinos**. 3ª edição. São Paulo: Roca, 2006.

BARTOLOME, J. A.; SOZZI, A.; MCHALE, J.; SWIFT, K. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows III . Administration of GnRH 23 days post AI and ultrasonography for nonpregnancy diagnosis on day 30. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1643–1658, 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04002559?via%3Dihub#bib5> >. Acesso em: 27 out 2017

BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N. S.; SALA, R. V; VIEIRA, L. M.; FILHO, M. F. S. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 139–152, 2012. Disponível em: < [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v9n3/pag139-152%20\(AR536\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v9n3/pag139-152%20(AR536).pdf) >. Acesso em: 23 nov. 2017.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 307-326, 2003. Disponível em: < <file:///C:/Users/Itautec/Documents/Medicina%20Veterinaria/10%C2%BA%20estagio%20curricular/Refer%C3%8Ancias/B%C3%B3%202003%20protocolos.htm> >. Acesso em: 23 nov. 2017.

BOTT, R. C.; ASHLEY, R. L.; HENKES, L. E.; ANTONIAZZI, A. Q.; BRUEMMER, J. E.; NISWENDER, G. D.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; SMIRNOVA, N. P.; ANTHONY, R. V; HANSEN, T. R. Uterine Vein Infusion of Interferon *Tau* (IFNT) Extends Luteal Life Span in Ewes. **Biology of Reproduction**, v. 82, p. 725–735, 2010. Disponível em: < <https://academic.oup.com/biolreprod/article/2557911> >. Acesso em: 05 nov. 2017

BROGAN, P. T.; HENNING, H.; STOUT, T. A.; DE RUIJTER-VILLANI, M. Relationship between color flow Doppler sonographic assessment of corpus luteum activity and progesterone concentrations in mares after embryo transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 166, p. 22-27, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432015300907?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

COLAZO, M. G.; MAPLETOFT, R. J. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 55, n. 8, p. 772-780, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4095965/>>. Acesso em: 18 out. 2017.

CARDOSO, B.; OLIVEIRA, M.; PUGLIESI, G.; BATISTA, E.; BINELLI, M. Cytobrush: A tool for sequential evaluation of gene expression in bovine endometrium. **Reproduction in Domestic Animals**, n. June, p. 1-5, 2017. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.13037/full>>. Acesso em: 17 out. 2017.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-537, 1993. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/15506061_A_Reagent_for_the_Single-step_Simultaneous_Isolation_of_RNA_DNA_and_Proteins_from_Cell_and_Tissue_Samples>. Acesso em: 17 out. 2017.

DEPEC. **Carne Bovina**. Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos do Banco Bradesco, v. 6, p. 65, 2017. Disponível em: <https://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_carne_bovina.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2017.

ELMETWALLY, M.; ROHN, K.; MEINECKE-TILLMANN, S. Noninvasive color Doppler sonography of uterine blood flow throughout pregnancy in sheep and goats. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1070-1079.e1, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.018>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

EL-ZARKOUNY, S. Z.; STEVENSON, J. S. Resynchronizing estrus with progesterone or progesterone plus estrogen in cows of unknown pregnancy status. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3306-3321, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030204734670>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Representante da FAO Brasil apresenta cenário da demanda por alimentos**. Brasília, Brasil, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/901168/>>. Acesso em: 08 Set. 2017.

FERRAZ FILHO, P. B.; RAMOS, A. D. A.; SILVA, L. O. C. Da; SOUZA, J. C. De; ALENCAR, M. M. De; MALHADO, C. H. M. Tendência Genética dos Efeitos Direto e Materno sobre os Pesos à Desmama e Pós- Desmama de Bovinos da Raça Tabapuã no Brasil. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 31, n. 2, p. 635–640, 2002.

FORMIGONI, I. **Rebanho mundial: confirma evolução do estoque de gado no mundo!** São Paulo: Farmnews, 2017. Disponível em: < <http://www.farmnews.com.br/gestao-pecuaria/rebanho-mundial/> >. Acesso em: 08 set. 2017

FRICKE, P. M.; CARAVIELLO, D. Z.; WEIGEL, K. A.; WELLE, M. L. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 12, p. 3941-3950, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203020374003X?via%3Dihub>>. Acesso em: 17 nov. 2017.

GARCIA-SASTRE, A.; BIRON, C. A. Type 1 interferons and the virus-host relationship: A lesson in detente. **Science**, v. 312, p. 879-882, 2006. Disponível em: < <http://science.sciencemag.org/content/312/5775/879.long> >. Acesso em: 08 nov. 2017.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Roca, 2008.

GIFFORD, C. A.; RACICOT, K.; CLARK D. S.; AUSTIN, K. J.; HANSEN, T. R.; LUCY, M. C.; DAVIES, C. J.; OTT, T. L. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 90, p. 274-280, 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030207726280?via%3Dihub> >. Acesso em: 08 nov. 2017.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª edição. Barueri, SP: Manole, 2004.

HAN, H.; AUSTIN, K. J.; REMPEL, L. A.; HANSEN, T. R. Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. **Journal of Endocrinology**, v. 191, n. 2, p. 505–512, 2006. Disponível em: <<http://joe.endocrinology-journals.org/content/191/2/505.full.pdf+html>>. Acesso em: 05 nov. 2017

HERZOG, K.; VOSS, C.; KASTELIC, J. P.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 75, n. 3, p. 549–554, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.024>>. Acesso em: 17 out. 2017.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia Veterinária**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

JIEMTAWEEBOON, S.; SHIRASUNA, K.; NITTA, A.; KOBAYASHI, A.; SCHUBERTH, H.-J.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A. Evidence that polymorphonuclear neutrophils infiltrate into the developing corpus luteum and promote angiogenesis with interleukin-8 in the cow. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 9, n. 1, p. 79, 2011. Disponível em: <<http://www.rbej.com/content/9/1/79>>. Acesso em: 16 out. 2017.

KELLEY, D. E.; GALVÃO, K. N.; MORTENSEN, C. J.; RISCO, C. A.; EALY, A. D. Using Doppler ultrasonography on day 34 of pregnancy to predict pregnancy loss in lactating dairy cattle. **J. Dairy Sci**, v. 100, n. 4, p. 3266-3271, 2017. Disponível em: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(17\)30127-3/fulltext](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(17)30127-3/fulltext)>. Acesso em: 12 nov. 2017.

KÖSE, M.; GÖRGÜLÜ, M.; KAYA, M. S.; AYDILEK, N.; BOZKAYA, F.; BAYRIL, T.; KURAR, E.; KIYMA, Z.; GÜZELOĞLU, A.; ATLI, M. O. Expression Profiles of Interferon-*Tau* Stimulated Genes (ISGs) in Peripheral Blood Leucocytes (PBLs) and Milk Cells in Pregnant Dairy Cows. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 20, n. 2, p. 189–194, 2014. Disponível em: < <http://vetdergikafkas.org/abstract.php?lang=en&id=1522>>. Acesso em: 21 ago. 2017.

LUCHIARI FILHO, A. Produção de Carne Bovina no Brasil Qualidade, Quantidade ou Ambas? In: Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte, 2, 2006, Brasília. Anais... Brasília: Faculdades Integradas – UPIS, 2006. Disponível em: <<http://www.trabalhosfeitos.com/ensaios/Produ%C3%A7%C3%A3o-De-Carne-Bovina-No-Brasil/664025.html>>. Acesso em: 10 set. 2017.

LUCY, M. C.; MCDUGALL, S.; NATION, D. P. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. **Animal Reproduction Science**, 82–83:495–512, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432004000934?via%3Dihub>>. Acesso em: 17 nov. 2017.

MARTINEZA, M. F.; ADAMSA, G. P. BERGFELTA, D. R. KASTELICB, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 57, n. 1-2, p. 23-33, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432099000573?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

MARTÍNEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; BÓ, G. A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Effect of estradiol and some of its esters on gonadotropin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Health Advance**, v. 86, n. 1-2, p. 37-52, 2005. Disponível em: <[http://www.journals.elsevierhealth.com/article/S0378-4320\(04\)00161-7/pdf](http://www.journals.elsevierhealth.com/article/S0378-4320(04)00161-7/pdf)>. Acesso em: 23 nov. 2017.

MCDICKEN, W. N.; ANDERSON, T. The difference between Color Doppler velocity imaging and Power Doppler Imaging. **European Journal of Echocardiography**, v. 3, n. 3, p. 240–244, 2002. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/02c0/fff5f2f2c739c906fc11d3841cfa49834766.pdf>>. Acesso em: 09 nov. 2017

MOURIER, E.; TARRADE, A.; DUAN, J.; RICHARD, C.; BERTHOLDT, C.; BEAUMONT, M.; MOREL, O.; CHAVATTE-PALMER, P. Non-invasive evaluation of placental blood flow: Lessons from animal models. **Reproduction**, v. 153, n. 3, p. R85–R96, 2017. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/153/3/R85.long#sec-12>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

ODDE, K. G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 3, p. 817–830, 1990. Disponível em: <<https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/articles/68/3/817>>. Acesso em: 23 nov. 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?1. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 4, p. 1–12, 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.114.121525>>. Acesso em: 16 out. 2017.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995. Disponível em: <[http://www.theriojournal.com/article/0093-691X\(95\)00279-H/pdf](http://www.theriojournal.com/article/0093-691X(95)00279-H/pdf)>. Acesso em: 23 nov. 2017.

SÁ FILHO, M. F.; MARQUES, M. O.; GIROTTO, R.; SANTOS, F. A.; SALA, R. V.; BARBUIO, J. P.; BARUSELLI, P. S. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 284–290, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.027>>. Acesso em: 17 nov. 2017.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2ª edição. Pullman, WA: Current Conceptions, 2003.

SPENCER, T. E.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F. W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 83, p. 537-550, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432004000703?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 nov. 2017.

YANKEY, S. J.; HICKS, B. A.; CARNAHAN, K. G.; ASSIRI, A. M.; SINOR, S. J.; KODALI, K.; STELLFLUG, J. N.; OTT, T. L. Expression of the antiviral protein Mx in peripheral blood mononuclear cells of pregnant and bred, non-pregnant ewes. **Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 7–11, 2001. Disponível em: <<http://joe.endocrinology-journals.org/content/170/2/R7.full.pdf+html>>. Acesso em: 05 nov. 2017.

ANEXO

ANEXO A: Certificado de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL

CERTIFICADO

Certifico que a acadêmica **CAMILA CUPPER VIEIRA**, graduanda no Curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, concluiu seu Estágio Curricular Supervisionado junto ao Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, área de **Fisiologia da Reprodução Animal**, no período de 24 de julho de 2017 a 01 de novembro de 2017, com frequência regulamentar nos dias letivos e carga horária de 560 horas, sob minha supervisão.

Pirassununga, 01 de novembro de 2017.

Prof. Dr. Mário Bínelli
Supervisor do Estágio

Av. Duque de Caxias - Norte, 225
Pirassununga/SP - Brasil
13635-900

Fone / Fax: +55 19 3565-4060
+55 19 3565-4235