

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**FUNÇÃO LUTEAL INICIAL EM OVELHAS SUBMETIDAS A
PNEUMOPERITÔNIO DURANTE O ESTRO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline Flores Zielinski

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**FUNÇÃO LUTEAL INICIAL EM OVELHAS SUBMETIDAS A
PNEUMOPERITÔNIO DURANTE O ESTRO**

por

Caroline Flores Zielinski

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Marcelo da Silva Cecim

Santa Maria, RS, Brasil.

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**FUNÇÃO LUTEAL INICIAL EM OVELHAS SUBMETIDAS A
PNEUMOPERITÔNIO DURANTE O ESTRO**

elaborada por
Caroline Flores Zielinski

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Marcelo da Silva Cecim, PhD.
(Presidente/Orientador)

João Francisco Coelho de Oliveira, Dr. (UFSM)

José Carlos Ferrugem Moraes, Dr. (EMBRAPA/Pecuária Sul)

Santa Maria, 29 de agosto de 2008

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela qualidade e excelência no ensino;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo ao longo do curso;

À Agropecuária São Francisco por permitir o uso dos animais e de suas instalações, pela mudança na rotina e no manejo da propriedade em prol da pesquisa;

Ao LEMA e à Clínica de Grandes Animais, pela vivência prática, por todos os ensinamentos adquiridos ao longo de mais de 7 anos, e a todos que fizeram e fazem parte desse lugar;

Ao meu orientador Marcelo da Silva Cecim, por tudo que aprendi durante nossa convivência;

À Adelina Aires Rodrigues, pela disponibilidade e valorosa ajuda, e pela disposição mesmo após horas de trabalho exaustivo;

À Andreane Rosa Filappi e ao Ricardo Xavier da Rocha, por terem me acompanhado em todos os momentos, abrindo mão muitas vezes dos seus assuntos pessoais, do descanso e da companhia de suas famílias para me ajudarem. Sem vocês este trabalho não seria possível, obrigada por todas as horas de conversa, pelos conselhos, pela “co-orientação” e principalmente pela amizade.

Aos amigos Juliana Argenta, Igor Carlotto, Fabiana Barichello, Aline Corrêa e Marcelo Weiss, pela amizade e cumplicidade que, mesmo que o tempo passe e já não seja possível nos vermos como antes, continuam sempre iguais, obrigada por fazerem parte da minha trajetória;

À Caroline Krueel, por tudo o que a nossa amizade representa pra mim, e à Mariana Isa Tonelotto Borges, pelo carinho e apoio, por eu ter sempre a certeza que posso contar com vocês, e à Anna Laura Krueel, por tornar nossos dias mais felizes;

Aos meus irmãos Gustavo e Fernando Flores Zielinski, simplesmente pelo amor que nos une;

Ao meu pai, Paulo Roberto Zielinski, pelo exemplo de vida;

À minha mãe, Vera Flores Zielinski, pelo amor incondicional, por me apoiar em tudo, por ser meu porto-seguro;

Ao Luiz Felipe Krueel Borges, por ser do jeito que és, por estar ao meu lado durante todos esses anos e por esse amor que move a minha vida.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

FUNÇÃO LUTEAL INICIAL EM OVELHAS SUBMETIDAS A PNEUMOPERITÔNIO DURANTE O ESTRO

AUTOR: CAROLINE FLORES ZIELINSKI

ORIENTADOR: MARCELO DA SILVA CECIM

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de agosto de 2008.

Ovelhas submetidas à inseminação artificial por laparoscopia têm um incremento nos níveis séricos de cortisol. A dor induzida pelo pneumoperitônio parece ser a causa deste aumento e pode estar relacionada com as baixas taxas de concepção da técnica. O objetivo deste estudo foi investigar os níveis de progesterona em ovelhas submetidas a pneumoperitônio durante o estro. Cento e dezenove fêmeas ovinas foram sincronizadas com pessário vaginal por 12 dias. Após a remoção do pessário os animais foram expostos a rufiões (GR) ou carneiros (GCa), e as ovelhas marcadas foram imobilizadas em maca de inseminação e submetidas a pneumoperitônio (GT) ou não (GC). Amostras de sangue foram colhidas nos dias três, seis e nove após os tratamentos para análise de progesterona (P4). Não houve interação entre P4 e os grupos GCa e GR ou entre P4 e os grupos GT e GC. Valores de P4 foram maiores no GCa que o GR nos dias três, seis e nove ($p < 0.0001$). Não houve diferença nas taxas de prenhez entre GT e GC nas ovelhas cobertas por carneiros, nem interação entre prenhez e os níveis de P4 nos dias três, seis e nove. As taxas de prenhez foram baixas, 43 e 64% para GT e GC, respectivamente. Conclui-se que o pneumoperitônio no dia do estro não afeta os níveis subsequentes de P4 em ovelhas.

Palavras-chave: ovelhas, progesterona, pneumoperitônio, laparoscopia.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EARLY LUTEAL FUNCTION IN EWES SUBMITTED OF PNEUMOPERITONEUM DURING ESTRUS

AUTOR: CAROLINE FLORES ZIELINSKI
ORIENTADOR: MARCELO DA SILVA CECIM
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de agosto de 2008.

Ewes submitted to artificial insemination by laparoscopy have an increase in serum cortisol levels. Pain induced by pneumoperitoneum appears to be the cause of such increase and may be related to the low conception rates of the technique. The objective of this study was to investigate progesterone levels in ewes following pneumoperitoneum during estrus. One hundred nineteen ewes were synchronized with vaginal pessaries for 12 days. After pessary removal animals were exposed to testosterone primed teaser wethers (GR) or rams (GCa), marked ewes were immobilized in a insemination cradle and submitted (GT) or not to pneumoperitoneum (GC). Blood samples were collected on days three, six and nine after treatment for progesterone (P4) analysis. No interaction was found between P4 and GCa, GR or between P4 and GT and GC. P4 values were higher on GCa on days three and six than in GR ($P < 0.0001$). There were no differences in pregnancy rates between GT and GC in ram served ewes, nor interaction between pregnancy and P4 levels on days three, six and nine. Pregnancy rates were low, 43 and 64% for GT and GC groups respectively. It is concluded that pneumoperitoneum per se on the day of estrus does not affect subsequent P4 levels in sheep.

Key words: ewes, progesterone, pneumoperitoneum, laparoscopy.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Níveis de progesterona nos dias três, seis e nove após o dia do estro nos diferentes tratamentos.....	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

AVP: arginina-vasopressina

CL: corpo lúteo

cm: centímetro

CO₂: dióxido de carbono

CRF: fator liberador de corticotrofina

E2: estradiol

FSH: hormônio folículo estimulante

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas

HPA: hipotalâmico-pituitário-adrenal

HPG: hipotalâmico-pituitário-gonadal

IA: inseminação artificial

IFNT: interferon tau

IL-1: interleucina tipo 1

IL-6: interleucina tipo 6

LH: hormônio luteinizante

MAP: acetato de medroxi-progesterona

mg: miligrama

mm: milímetro

mmHg: milímetro de mercúrio

ng/ml: nanograma por mililitro

oTP-1: proteína trofoblástica ovina

PCO₂: pressão de CO₂

PIA: pressão intra-abdominal

PIC: pressão intracraniana

PGF_{2α}: prostaglandina

PMN: polimorfonucleares

P4: progesterona

ROS: espécies reativas ao oxigênio

spz: espermatozóide

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF- α : fator de necrose tumoral tipo α

μ m: micrometro

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE TABELAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
SUMÁRIO	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Cirurgia laparoscópica e efeitos adversos	13
2.2 Inseminação artificial por laparoscopia em ovinos	18
2.3 Estresse	22
2.3.1 Estresse e reprodução	22
2.3.2 Estresse e laparoscopia	26
2.4 Função ovariana e reconhecimento da gestação	27
3 CAPÍTULO 1.....	32
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

A espécie ovina foi a primeira a ser domesticada e acompanha o homem desde os primórdios da civilização. A ovinocultura está presente na história da humanidade como sendo a atividade que proporciona a maior fonte de alternativas para subsistência, pois fornece a lã e pele para vestuário, carne e leite para alimentação (FERNANDES, 1999), além de ser uma atividade explorada em todos os continentes, estando presente em áreas com as mais diversas características edafoclimáticas. No entanto, apenas em alguns países apresenta expressão econômica, adotando, na maioria dos casos, baixos níveis de tecnologia e, conseqüentemente, obtendo baixa rentabilidade (NOGUEIRA FILHO, 2003).

Segundo Fonseca (2005), a ovino-caprinocultura está apresentando um ciclo de crescimento mundial. Este crescimento intensificou nas últimas décadas, sobretudo em países em desenvolvimento, atualmente, detentores dos maiores rebanhos. Até a década de 90 do século passado, o consumo de carne ovina no mercado brasileiro era pequeno e restrito às fazendas e/ou épocas definidas do ano (Páscoa e Natal). Atualmente, a divulgação das qualidades típicas da carne ovina, pelo seu sabor e qualidade nutritiva, promoveu um aumento considerável no consumo deste produto em regiões não tradicionais, o que tem ocasionado um incremento considerável em sua demanda (COUTO, 2003). Acompanhando esta tendência mundial, projeta-se uma multiplicação da ordem de cinco vezes o rebanho brasileiro atual para os próximos vinte anos. Serão mais de 100 milhões de cabeças de ovinos e 50 milhões de cabeças de caprinos (FONSECA, 2005). Neste contexto, o incremento na eficiência de produção de carne ovina exige a seleção e a obtenção de animais com uma composição corporal dentro das especificações de mercado, o que está na dependência da precisão dos métodos utilizados para identificar os animais superiores dentro de seus próprios rebanhos e na abrangência em que estes serão disseminados ao rebanho comercial (COUTO, 2003). Haverá ampla necessidade de se assistir a reprodução destes animais, seja para permitir o aumento da eficiência reprodutiva e/ou produtiva dos rebanhos, seja para a multiplicação mais eficiente dos genótipos (FONSECA, 2005).

O fato de que a maioria das ovelhas nos países de produção agropecuária é reprodutora sazonal e em geral produz menos cordeiros que os criadores desejariam colher, faz dessa espécie um alvo óbvio para a atenção reprodutiva dos fisiologistas. Nas últimas duas décadas o manejo reprodutivo das ovelhas tem mudado drasticamente, através do melhoramento nutricional e da assistência veterinária. Entretanto, apesar destas melhorias, a inseminação artificial (IA) é a única tecnologia reprodutiva aplicada em programas de

seleção. A IA é um facilitador essencial da melhoria genética na indústria bovina, mas a ausência de uma tecnologia igualmente eficaz em ovelhas é uma restrição importante para os programas de melhoramento (FAIR et al., 2007). A IA em ovelhas tem sido pobremente implementada e é realizada principalmente com sêmen fresco e refrigerado por causa dos baixos resultados de fertilidade obtidos ao usar o sêmen congelado (ANEL et al., 2005).

Um dos principais fatores na eficácia da IA usando sêmen congelado é o local da deposição deste sêmen. Uma fertilidade perceptivelmente mais alta se obtém com IA laparoscópica que após IA transcervical ou cervical com sêmen congelado de carneiro. Mas os altos custos envolvidos em termos de pessoal especializado, trabalho e equipamentos e o fato de estar sendo menos aceita nos argumentos de bem-estar não justificariam os resultados variáveis obtidos, limitando o uso dessa biotecnologia (FAIR et al., 2007).

Muitos fatores já foram estudados na tentativa de conhecer as causas desses resultados inconsistentes de fertilidade após IA por laparoscopia, como o sêmen (origem, qualidade e preservação; FUKUI & ROBERTS, 1978; EPPLESTON & MAXWELL, 1995; EHLING et al., 2003), a raça da ovelha utilizada (FAIR et al., 2005; FAIR et al., 2007; DONOVAN et al., 2000), o protocolo de sincronização empregado (NEVES & LUZ, 1994; MOSES et al., 1997), mas sem uma resposta definitiva até o momento.

Estudos com laparoscopia em humanos apontam a técnica como causadora de estresse, devido à dor durante e após o procedimento. A dor deve-se ao estiramento do peritônio, causado pela distensão do abdômen com gás (MARTIN et al., 1981; STAFFORD et al., 2006), fato que implica em anestesia geral nos pacientes (LEMOS et al., 2003) e que muito provavelmente ocorra de igual forma nas ovelhas (STAFFORD et al., 2006). Segundo Dobson & Smith (1998), o estresse é revelado pela inabilidade de um animal em desempenhar com sucesso o potencial genético para sua característica produtiva, como produção de leite, ganho de peso ou fertilidade. Os agentes estressantes reduzem a fertilidade interferindo com os mecanismos que regulam o perfeito sincronismo dos eventos dentro da fase folicular. Fatores estressantes agudos como transporte e hipoglicemia (DOBSON & SMITH, 2000) ou isolamento e contenção (TURNER et al., 2002) atribuídos em horas precisamente definidas têm sido investigados para os efeitos sobre diferentes partes do mecanismo de controle reprodutivo. Dolorosos, e, portanto estressantes, eventos no período de reprodução também têm efeitos deletérios na fertilidade.

A hipótese deste estudo é que o estresse induzido pelo pneumoperitônio impeça a ovulação em ovelhas, ou provoque a luteinização deficiente das células do folículo ovulatório, resultando em um corpo lúteo com baixa capacidade de secretar progesterona, ou um corpo

lúteo com meia-vida curta. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do pneumoperitônio, causado pela técnica de laparoscopia, sobre o perfil hormonal de progesterona e taxas de prenhez em ovelhas na fase de transição da estação reprodutiva.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cirurgia laparoscópica e efeitos adversos

A cirurgia laparoscópica é menos traumática e menos invasiva que a laparotomia e parece estar associada a uma menor resposta neuroendócrina, metabólica e imunológica (ISHIZUKA et al., 2000). O pneumoperitônio é um dos passos necessários para a realização dos procedimentos laparoscópicos (LEMOS et al., 2003). A insuflação com gás é uma técnica provada para criar espaço na cavidade peritoneal para a laparoscopia (ISHIZUKA et al., 2000).

O amplo uso do pneumoperitônio em cirurgia laparoscópica, e a observação frequente de pressão intra-abdominal elevada nos pacientes, expõem ao problema de hipertensão intra-abdominal. Ainda que a severidade do problema ou de suas consequências clínicas não sejam sempre evidentes, a pressão abdominal é um parâmetro importante na instabilidade hemodinâmica ou na disfunção orgânica. Evidências demonstram que mais do que a pressão local no abdômen, é a pressão que se transmite a outros compartimentos distantes a responsável por muitos dos efeitos que se observam. Efeitos adversos sobre o sistema cardiovascular, sistema respiratório, função renal e mais recentemente sobre a circulação esplâncnica, diminuindo o fluxo arterial hepático, gástrico, renal e mesentérico (BRASESCO et al., 2002), o que lidera a formação de radicais livres (GLANTZOUNIS et al., 2001; SARE et al., 2002), já foram descritos.

O Dióxido de Carbono (CO_2) tem sido o gás mais utilizado para a insuflação da cavidade abdominal, devido as suas características: ser transparente, não comburente, de fácil acesso, baixo custo e altamente solúvel em água, o que reduz o risco de embolia gasosa fatal. Além disso, é um produto endógeno natural que é eliminado pelos pulmões durante a respiração (LEMOS et al., 2003).

Os efeitos da distensão abdominal com CO_2 são complexos e podem associar-se de forma direta com os efeitos da compressão mecânica, resposta neurohumoral e mudanças induzidas pela absorção do CO_2 (O'LEARY et al., 1996). O CO_2 é facilmente absorvido até a circulação geral e isto junto com a redução na ventilação resulta em um incremento na Pressão de CO_2 (PCO_2) e em acidose respiratória. A redução da ventilação/minuto devido à elevação diafragmática também contribui para reduzir a liberação de CO_2 (BRASESCO et al., 2002). A hipercapnia geralmente é considerada como um potente estimulador da ativação da resposta adrenosimpática. Então, um fator chave do estresse devido à laparoscopia com

insuflação de CO₂ é um incremento da pressão de CO₂ (ISHIZUKA et al., 2000). A elevação do diafragma e o aumento na pressão intra-abdominal (PIA) produzem um incremento da pressão intratorácica e da pressão nas vias aéreas, o que diminui a amplitude e a capacidade funcional residual. Além disso, o aumento da PIA juntamente com a compressão mecânica exercida pelas vísceras diminui o retorno venoso e o débito cardíaco (BRASESCO et al., 2002).

O aumento da pressão intra-abdominal também afeta o próprio peritônio. O fluxo arterial ao peritônio parietal diminui 60%, sendo um dos órgãos intra-abdominais mais atingidos durante a elevação da pressão intra-abdominal (BRASESCO et al., 2002). O fluxo sanguíneo da artéria uterina também diminuiu significativamente em ovelhas prenhes assim que foram insufladas com CO₂ e permaneceu diminuindo no decorrer do tempo, retornando ao normal após a exsuflação (CURET et al., 1996).

A elevação da PIA em cirurgia laparoscópica está associada com incremento do fluxo arterial cerebral, ainda que isto possa também estar relacionado com um aumento da PCO₂ e não unicamente com o aumento da pressão central. A elevação da PCO₂ produz vasodilatação cerebral como mecanismo de auto-regulação, que resulta em um incremento no fluxo sanguíneo cerebral e incremento na pressão intracraniana (PIC). Em estudos experimentais a correlação entre a pressão intra-abdominal e a pressão intracraniana sempre se mostrou significativa e linear. Além dos mecanismos primários que incrementam a PIC podem existir outros fatores que contribuam para elevá-la. A posição do corpo tem um efeito importante, tendo-se demonstrado que a elevação da cabeça reduz a PIC e melhora a pressão de perfusão cerebral (ROSENTHAL et al., 1998; BRASESCO et al., 2002).

A elevação da PIA gera resposta de estresse, elevando os níveis dos hormônios de estresse, como hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), cortisol, prolactina e hormônio do crescimento. Isto foi demonstrado em cirurgia laparoscópica utilizando-se pneumoperitônio, ainda que alguns autores não tenham encontrado nenhum efeito da elevação da PIC sobre os hormônios de estresse, ou ainda uma resposta reduzida, comparada com cirurgia convencional não laparoscópica (BRASESCO et al., 2002).

O trauma cirúrgico ativa uma resposta de estresse constituída de fatores neurohumorais, imunológicos e metabólicos. Tem sido demonstrado que a magnitude da resposta ao estresse é proporcional ao grau do trauma sofrido. A respeito da cirurgia laparoscópica, acreditava-se que a resposta ao trauma deveria ser menos acentuada que a cirurgia aberta, mas não é isto que tem sido verificado (ODEBERG et al., 1998). Durante o pneumoperitônio, as concentrações plasmáticas de dopamina, vasopressina, adrenalina,

noradrenalina, renina e cortisol aumentam significativamente (O'LEARY et al., 1996). Joris & Lamy (1992), por exemplo, detectaram um aumento no nível de cortisol plasmático logo após quinze minutos de pneumoperitônio. Cortisol, prolactina, glicose e epinefrina aumentaram significativamente no decorrer da cirurgia em todos os humanos adultos estudados (ao acaso ou não) e a resposta foi similar tanto na laparoscopia quanto na cirurgia aberta.

Bozcurt et al. (2000) comparando a laparoscopia e a laparotomia em crianças, concluíram que os incrementos no cortisol, prolactina, glicose, insulina, lactato e epinefrina durante ambas as técnicas indicam que ocorre uma ativação considerável do eixo neuroendócrino durante a laparoscopia, mesmo na ausência substancial de uma incisão de pele. Estudos em adultos têm postulado que além do estímulo aferente neurogênico oriundo do ferimento (motivo da intervenção), que modula a resposta adrenocortical, outro estímulo aferente visceral como a distensão abdominal causada pelo pneumoperitônio também pode representar um importante papel na resposta ao estresse (JORIS & LAMY, 1992).

Foi demonstrado que a técnica do pneumoperitônio e da elevação mecânica da parede abdominal tem uma resposta similar ao estresse cirúrgico, ainda que somente a técnica do pneumoperitônio tenha alterado os parâmetros hemodinâmicos, e que o dano na parede abdominal, causado pela penetração e elevação do subcutâneo, possa não contribuir para aumentar o estresse cirúrgico (NINOMIYA et al., 1998). Da mesma forma, Ishizuka et al., (2000) obtiveram níveis de cortisol circulantes aumentados continuamente durante a laparoscopia, tanto no grupo com pneumoperitônio quanto no grupo com elevação mecânica da parede abdominal, permanecendo a concentração média aumentada até 60 minutos após a extubação. Isso nos faz acreditar que existe um fator comum entre as duas técnicas (laparoscopia com gás e sem gás), muito provavelmente a posição do corpo e da cabeça, que é capaz de provocar uma resposta de estresse. O'Leary et al. (1996) pesquisando em humanos as respostas hemodinâmicas e neuroendócrinas após pneumoperitônio e as mudanças de posição durante o procedimento de laparoscopia observaram que o cortisol sofreu um incremento no momento da inversão da posição Trendelenburg e triplicou após a exsuflação do CO₂.

É conhecido que CO₂ reduz o pH da superfície peritoneal, provocando mais dor quando comparado com outros gases, fato que também implica na utilização de anestesia geral (LEMOS et al., 2003). Tem sido mostrado que a técnica anestésica é importante na extensão da resposta ao trauma. Em pacientes submetidos tanto à anestesia intravenosa quanto à anestesia inalatória houve uma diminuição do cortisol na primeira hora de pneumoperitônio.

No pós-operatório, os valores retornaram aos valores pré-operatórios. Além do mais, a resposta hormonal de estresse ao trauma cirúrgico, avaliada através do cortisol e de catecolaminas, foi quase nula, assim indicada pelos baixos valores durante a cirurgia. Esses parâmetros são creditados a uma adequada anestesia, que promove um ótimo bloqueio contra o estresse cirúrgico, ou seja, a atenuação da resposta hormonal durante a anestesia, com uma gradual ativação durante a cirurgia, assim como no período pós-operatório (ODEBERG et al., 1998). Em alguns estudos, a resposta adrenossimpática não estava nem reduzida nem aumentada durante laparoscopia abdominal (ISHIZUKA et al., 2000).

Respostas neuroendócrinas e inflamatórias ao estresse durante e após a laparoscopia abdominal com insuflação de CO₂ são geralmente menores que aquelas após cirurgia aberta (ISHIZUKA et al., 2000). West et al. (1997) propuseram que a acidificação extra e intracelular induzida pela insuflação peritoneal com CO₂ contribuiria para “cegar” a resposta inflamatória durante cirurgia laparoscópica. Macrófagos incubados em CO₂ produziram significativamente menos interleucina tipo 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral tipo α (TNF- α) comparados com incubação em Ar ou hélio. No entanto, Ure et al. (2002) perceberam que a resposta inflamatória induzida pelo trauma cirúrgico pode ser minimizada ou excluída quanto menor a incisão cirúrgica, menor a pressão do gás empregada e menor o tempo de exposição ao gás, tanto com CO₂ ou Ar ambiente, quanto na laparoscopia ou laparotomia. Com uma pressão de 8mmHg, a liberação de IL-6 foi semelhante e não significativa após CO₂ ou Ar em ambos os procedimentos, laparoscopia e laparotomia.

Em ratos, os efeitos do pneumoperitônio por CO₂ na formação de radicais livres e peroxidação lipídica em tecido pulmonar e hepático são dependentes da pressão utilizada (SARE et al., 2002). A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma, um indicador da produção de radicais livres, aumentou significativamente cinco minutos após a exsuflação do pneumoperitônio, em comparação aos níveis pré-operatórios e em relação aos pacientes submetidos à cirurgia convencional (GLANTZOUNIS et al., 2001). A produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) aumentou quatro vezes mais após o uso de Ar comparada com o uso de CO₂, em ambos os procedimentos, mas sem diferença estatística (URE et al., 2002).

Apesar de ter sido amplamente usado no passado, o Ar atualmente não tem sido opção de escolha para a insuflação da cavidade em procedimentos laparoscópicos. Uma possível ocorrência de embolia gasosa, o provável favorecimento de contaminação bacteriana e de bacteremia e a ausência de relatos sobre combustão com o uso de Ar são os motivos alegados

para a sua não utilização, já que em condições normais o CO₂ mostrava-se uma opção segura (LEMOS et al., 2003).

A observação de que as intervenções abertas, assim como as laparoscópicas com suspensão mecânica, são realizadas na presença de Ar ambiente, com o benefício da menor alteração no equilíbrio ácido básico que o Ar oferece e possivelmente menor dor no per e pós-operatório, o Ar tem sido novamente alvo de estudos (LEMOS et al., 2003). Mas os resultados são variados. Ikechebelu et al. (2005), comparando CO₂ e Ar ambiente em laparoscopia diagnóstica preventiva em mulheres, concluíram que o CO₂ ofereceu melhor visibilidade durante o procedimento e os pacientes tiveram melhor recuperação devido ao menor grau de infecção (2,7% vs 15,3%), menor desconforto abdominal (sensação de gás retido no abdômen; 6,9% vs 84,7%) e dor (0% vs 77,8%), retornando mais rapidamente às suas atividades. Mesmo assim, os autores ponderaram que o Ar ambiente é seguro, barato e disponível, podendo ser recomendado para cenários com baixos recursos. Já Daphan et al. (2003) observaram que a atividade bacteriana peritoneal em ratos alterou-se somente após 60 minutos de insuflação com Ar, mas 24 horas após não havia diferença entre os grupos laparotomia ou laparoscopia, com CO₂ (30 e 60min) ou insuflação com Ar (30 e 60min). O número de polimorfonucleares (PMN) no peritônio estava significativamente maior no grupo laparotomia do que nos demais grupos. No estudo de Ure e colaboradores (2002), também não houve alteração em nenhum dos grupos (laparoscopia e laparotomia com ar e com CO₂) nos níveis peritoneais de IL-1 e TNF- α , assim como na contagem de glóbulos brancos e PMN. Todos os cultivos oriundos de fluido peritoneal, sangue e linfonodos foram negativos para crescimento bacteriano.

O Ar no pneumoperitônio de suínos, com pressões de 10 e 16mmHg, não provocou alterações no equilíbrio ácido-básico. O CO₂ utilizado com pressão de 10mmHg teve o mesmo comportamento, o que não ocorreu quando utilizado com pressão de 16mmHg após 1 hora, havendo neste caso nítida tendência a hipercapnia e acidose. Assim, neste modelo animal, a acidose e hipercapnia foram complicações do pneumoperitônio que dependeram da duração do mesmo, pressão empregada e também do tipo de gás utilizado, e o Ar revelou ser uma opção segura para insuflação de cavidade nos procedimentos laparoscópicos de suínos (LEMOS et al., 2003).

Assim, frente à necessidade de uma melhor alternativa em substituição ao CO₂, com a finalidade de produzir pneumoperitônio com menos efeitos adversos, várias opções foram experimentadas. Além da já mencionada suspensão mecânica da cavidade e do Ar ambiente, pode-se citar a utilização de outros gases para insuflação da cavidade, como o hélio, o argônio, o xénon e o óxido nitroso (IKECHEBELU et al., 2005).

2.2 Inseminação artificial por laparoscopia em ovinos

A espécie ovina vem ganhando cada vez mais destaque na agropecuária mundial, destacando-se, sobretudo, na produção de carne e pele, deixando, já algum tempo, de constituir-se numa criação de subsistência (COUTO, 2003). Dentro da indústria pecuária, a inseminação artificial (IA) é usada para realçar a produção de descendentes melhorados via introdução de genótipos superiores, maximização do uso de carneiros superiores e do controle de enfermidades contagiosas dentro dos rebanhos. Estas vantagens são facilitadas grandemente pela capacidade de executar IA com sêmen congelado. (KERSHAW et al., 2005).

Porém, em apenas aproximadamente 2% das ovelhas a penetração da cérvix por uma pipeta de inseminação, realizada naturalmente, é profunda ou completa. Contudo, tais níveis de penetração em todas as ovelhas são necessários para obter taxas aceitáveis de concepção com sêmen congelado/descongelado (KING et al., 2004). O centro do problema é a anatomia e fisiologia da cérvix ovina, que forma uma barreira natural ao útero. Na ovelha não-gestante, a cérvix tem um comprimento de 8-9cm, composta por, em média, 5 anéis em formato de funil, que não são alinhados concentricamente, suas aberturas são constringidas na maioria dos casos em menos de 3mm e que não se dilatam mesmo durante o estro (DONAVAN et al., 2000; ANEL et al., 2005). A passagem da cérvix usando pipetas modificadas tem resultado em melhorias nas taxas de concepção diretamente relacionadas à profundidade de penetração, mas pode causar trauma significativo no tecido pélvico das ovelhas onde a dilatação cervical induzida não ocorreu (KING et al., 2004). Ainda assim, taxas de concepção em ovelhas submetidas à IA cervical com sêmen congelado são pobres. Para aproximar as taxas de fertilidade e de nascimento de IA com sêmen congelado daquelas obtidas após serviço natural, requer-se deposição intra-uterina (KERSHAW et al., 2005).

A inseminação artificial por laparoscopia em ovelhas fundamenta-se na técnica desenvolvida por Killen & Caffery, em 1982 (KILLEN & CAFFERY, 1982). O método consiste na contenção em mesas metálicas individuais, designadas para este fim, de ovelhas submetidas previamente a jejum completo de 12 horas para facilitar o acesso ao útero. Na mesa, a ovelha é colocada em decúbito dorso-obliquo, num ângulo de 60 graus, com a porção caudal mais elevada que a cabeça, provocando o deslocamento das vísceras no sentido cranial. O animal é submetido à preparação da região abdominal caudal, com tosquia da lã, anti-sepsia e anestesia local nos pontos das punções. Duas punções são realizadas por trocárteres de 5 a 7cm cranialmente ao úbere, e de 3 a 4cm lateralmente à linha média, uma de cada lado, em

direção à cabeça do fêmur do animal para se evitar perfuração da bexiga, rúmen ou lesão às veias mamárias. Um dos trocarteres é utilizado para a insuflação de gás (CO₂ ou Ar) e para penetração do telescópio. O outro, para a aplicação da pinça ou outro material usado para posicionar o útero e em seguida para a aplicação da pipeta de inseminação. O sêmen pode ser depositado no corpo uterino ou no corno ou em ambos os cornos. Rapidamente após o procedimento, o material é retirado e o excesso de gás liberado. Em geral, não são necessárias suturas. (NEVES & LUZ, 1994; HILL et al., 1998).

Atualmente, a IA laparoscópica é a única técnica usada para inseminação intra-uterina comercial em ovelhas (KERSHAW et al., 2005). No entanto, resultados variáveis de fertilidade têm sido relatados. Atribuem-se os baixos índices de concepção à reduzida habilidade de transporte e capacitação do sêmen congelado (ANEL et al., 2005), porém, estudos recentes não obtiveram diferença nas taxas de fertilização após laparoscopia com sêmen fresco diluído (25,5%) ou congelado (39,6%) na dose de 50×10^6 espermatozóides (spz; EHLING et al., 2003). Basicamente, o dano ao espermatozóide causado pela criopreservação pode ser estrutural (físico), bioquímico ou funcional. Esses danos são acompanhados por uma redução na motilidade, transporte prejudicado e redução na fertilidade devido a uma taxa de sobrevivência mais curta e possível efeito na capacitação espermática (SALAMON & MAXWELL, 1994). Segundo Fukui & Roberts (1978), utilizando-se a laparoscopia não há diferença na fertilidade entre sêmen fresco e congelado. Com base nestes resultados, o sêmen congelado não pode ser responsabilizado isoladamente pelos baixos índices de fertilidade após IA por laparoscopia.

Sabe-se que há uma grande variação na habilidade individual de cada carneiro para o congelamento/descongelamento de seu espermatozóide. Hill et al. (1998) obtiveram resultados de prenhez com sêmen fresco e congelado bastante satisfatórios (82,2 vs 71,6%, respectivamente) em ovelhas da raça Merino Australiana. A maior variação nas taxas de prenhez foi vista entre os carneiros, com uma eficiência mínima de 12% e máxima de 100%. Taxas acima de 50% foram obtidas em 92,6% dos carneiros utilizados. A análise das amostras comerciais de sêmen usadas por Eppleston & Maxwell (1995) mostrou grandes diferenças entre carneiros em todos os traços medidos. A concentração de espermatozóides nas amostras variou de 545.3 a 2977.5×10^6 espermatozóides totais por ml para pellets, e 108.7 a 876.2×10^6 para palhetas. Esta variação, junto com a grande escala na motilidade, conduziu a uma variação de dezoito pontos no número de espermatozóides móveis inseminados por ovelha.

Na Austrália, aproximadamente 250.000 ovelhas são inseminadas por ano, com uma média de prenhez em torno de 65%, mas com uma escala de 15 a 92%. Em estudo realizado

para avaliar os fatores que afetam o sucesso da IA laparoscópica, a taxa de prenhez em 28.447 ovelhas inseminadas ao longo de sete anos foi de 71,7%. O número de ovelhas inseminadas, ou seja, a taxa de IA laparoscópica variou de <35, 35-45, 45-55, >55 ovelhas por hora. Significativamente, maior número de prenhez foi concebido quando mais de 55 ovelhas foram inseminadas por hora (77,6%) do que quando se inseminou menos de 35 ovelhas por hora (63,4%). Este achado indica que um incremento na velocidade de inseminação não está associado com um incremento nos erros cometidos pelo operador, que poderiam ocasionar queda no índice de prenhez. Ao contrário, uma taxa de inseminação lenta pode ocorrer devido a características físicas individuais (como ovelhas muito gordas ou com bexiga urinária repleta) ou a fatores de manejo da propriedade (como instalações pobres ou assistência insuficiente; HILL et al., 1998).

O operador da IA laparoscópica deve tentar minimizar o tempo gasto em cada ovelha para contê-la na maca, reduzindo o estresse, que pode baixar as taxas de prenhez (MURRAY & WARD, 1993). Anteriormente, uma ovelha ficava contida na maca por 2 a 3 minutos, mas o procedimento atual de laparoscopia tem levado menos de 1 minuto. Portanto, um operador especializado pode trabalhar rapidamente e ainda obter taxas consistentemente aceitáveis de prenhez (HILL et al., 1998).

Neste sentido, a técnica de inseminação de um único corno uterino produz taxas de prenhez que não diferem daquelas obtidas com a inseminação de ambos os cornos, e permite a inseminação em um menor tempo por ovelha e um maior número de animais inseminados por dia sem qualquer efeito adverso nos resultados de prenhez. No entanto, a dose inseminante deve ser depositada no corno mais facilmente acessado, sem a tradicional inspeção do ovário na tentativa de visualizar os folículos pré-ovulatórios ou o corpo lúteo, pois a manipulação do ovário e vísceras pode causar desconforto e dor (PERKINS et al., 1996).

A experiência humana em laparoscopia sugere que este é um procedimento doloroso, fato que implica em anestesia geral em humanos (LEMOS et al., 2003) e provavelmente este é o caso nas ovelhas (STAFFORD et al., 2006). Neste sentido, os resultados obtidos por Ehling et al. (2003) após procedimento laparoscópico realizado sob anestesia geral e utilizando-se Ar para causar o pneumoperitônio são interessantes. O número de oócitos fertilizados recuperados em fase de pró-núcleo não diferiu estatisticamente após IA por laparoscopia com sêmen fresco, resfriado ou congelado quando a dose utilizada foi de 300×10^6 spz ou após monta natural. Independente do tipo de conservação do sêmen, a taxa de fertilização foi maior quando se utilizou uma dose inseminante de 300×10^6 spz comparada com uma dose de 50×10^6 spz (68,2 vs 56,8%). Segundo os autores, os resultados deste estudo indicam que a taxa de

fertilização pode ser significativamente superada com uma alta dosagem de espermatozóides por inseminação, isto é, 300×10^6 spz, sugerindo que as alterações massivas estruturais e bioquímicas associadas com o congelamento, que resultam em um número tão baixo de espermatozóides móveis, podem ser compensadas com altas doses inseminantes (EHLING et al., 2003). Apesar da consistente justificativa, Meghan et al. (2004) utilizando entre 200 e 350×10^6 spz por cada 0,2ml de sêmen fresco, sob anestesia geral, lograram apenas 44,8% de prenhez, após exposição e manipulação dos cornos uterinos.

Estudos anteriores também identificaram uma possível interferência da manipulação, e provavelmente da dor e do estresse que ela gera, nos resultados de IA cervical e transcervical. Sayre & Lewis (1997) comparando a IA por laparoscopia (com sedação) e IA transcervical (sem sedação e com ocitocina) obtiveram 37,5% de ovelhas prenhes após IA por laparoscopia com sêmen congelado e 0% de prenhez após IA transcervical com sêmen resfriado. A taxa de óvulos fertilizados foi significativamente superior nas ovelhas inseminadas laparoscopicamente que naquelas transcervicalmente (92,5 vs 28%). Segundo os autores, mesmo que a manipulação cervical neste estudo possa ser confundida com outros aspectos do procedimento de IA transcervical, os resultados parecem indicar que a manipulação cervical por si só tem um efeito desfavorável sobre a fertilidade após IA, já que o tratamento com ocitocina não foi o causador do detrimento.

Tem sido mostrado que a raça da ovelha se apresenta como o efeito principal nas taxas de prenhez após IA cervical com sêmen congelado (FAIR et al., 2005). Donavan et al. (2000) observaram que esse efeito é independente do tipo de sêmen empregado (fresco ou congelado). As razões para a ampla variação entre raças não é conhecida, mas diferenças no momento da ovulação parecem ocorrer. É notório que o momento da inseminação do sêmen congelado é um determinante crítico da fertilidade, devido principalmente à significativa redução na sobrevivência do sêmen congelado/descongelado no trato reprodutivo da fêmea, e por isso a inseminação mais próxima do momento da ovulação melhoraria os resultados. No entanto, não foram encontradas diferenças entre as raças Finnish Landrace, Blackface, Texel e Suffolk nem no intervalo do momento da retirada do pessário até o pico de Hormônio Luteinizante (LH) nem no intervalo do pico de LH até a ovulação, permanecendo sem justificativa a variação na fertilidade entre raças (DONAVAN et al., 2000).

Novamente os resultados divergem daqueles de laparoscopia. Foi encontrado que ocorre uma ascensão mais lenta na concentração da progesterona nas raças menos prolíferas que nas raças mais prolíferas e isto poderia explicar porque uma maior proporção de oócitos fertilizados recuperados em fase de mórula/blastocisto em ovelhas Belclare que Suffolk após

AI com sêmen congelado/descongelado, mas não houve diferença nas taxas de concepção após laparoscopia entre essas raças (FAIR et al., 2005) e nem entre as raças Hampshire, Dorset e Suffolk (SAYRE & LEWIS, 1997).

Em estudo realizado na Patagônia Argentina com mais de 2.300 ovelhas e borregas da raça Merino Australiana, constatou-se que não houve diferença nas taxas de prenhez após IA por laparoscopia com detecção de estro (62,9%) ou em tempo fixo (59,1%) com sêmen congelado (MOSES et al., 1997). Neves & Luz (1994) também já haviam evidenciado que a sincronização não provocava redução na porcentagem de prenhez.

Portanto, não se pode afirmar que os baixos índices de prenhez após laparoscopia são devidos exclusivamente ao sêmen congelado, à dose de sêmen empregada, ao efeito raça, ao protocolo de sincronização utilizado ou a tantos outros fatores estudados, mas é preciso investigar se a causa não seria um fator comum a todas as metodologias empregadas. O estresse pode ser esse candidato, visto que a grande maioria das inseminações laparoscópicas realizadas de forma comercial (MOSES et al., 1997; HILL et al., 1998) não fazem uso da anestesia geral nos animais, e por vezes nem mesmo sedação.

2.3 Estresse

2.3.1 Estresse e reprodução

A palavra estresse significa qualquer estímulo capaz de perturbar a homeostase do organismo (RIVIER & RIVEST, 1991). Diferentes agentes de estresse ativam diferentes caminhos e/ou diferentes agentes de estresse podem ativar o mesmo caminho diferentemente (TURNER et al., 2002). Segundo Dobson & Smith (1998), o estresse ambiental é revelado pela inabilidade de um animal em desempenhar com sucesso o potencial genético para sua característica produtiva, como produção de leite, ganho de peso ou fertilidade.

A estimulação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) é caracterizada pela ativação dos neurônios do Fator Liberador de Corticotrofina (CRF) e Arginina-vasopressina (AVP) no núcleo para-ventricular, e a secreção destes neuropeptídeos dentro do sistema porta hipofisial estimula os corticotrófos da glândula pituitária anterior. Os corticotrófos produzem uma variedade de peptídeos derivados do pró-opiomelanocortina, incluindo Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH), β -endorfina e Hormônio Estimulador de α -melanócitos, todos liberados em resposta ao estresse. A ação do ACTH no córtex da glândula adrenal estimula a síntese e secreção de glicocorticóides (principalmente de cortisol). A propósito de um *feedback* clássico de rebote, os glicocorticóides exercem ação de *feedback* negativo sobre a

unidade hipotálamo-pituitária para regular a secreção de CRF, AVP e ACTH (TILBROOK et al., 2000).

O sistema simpato-adrenal consiste dos nervos do sistema simpático e da medula adrenal. A ativação do sistema simpato-adrenal evoca a liberação de noradrenalina dos terminais do nervo pós-gangliônico, enquanto a inervação pré-gangliônica da medula adrenal resulta em secreção aumentada de catecolaminas, principalmente adrenalina, dentro do sistema circulatório. Os glicocorticóides e as catecolaminas atuam largamente para aliviar os efeitos do estresse (TILBROOK et al., 2000).

A observação inicial de que o estresse é acompanhado tanto por um aumento na atividade do eixo HPA quanto por um decréscimo na função reprodutiva (fenômeno atribuído à necessidade, em caso de emergência, de preservar a função do córtex adrenal à custa da atividade gonadal) tem sugerido uma possível relação entre hormônios do eixo HPA (que são liberados durante o estresse) e aqueles do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal (HPG; RIVIER & RIVEST, 1991). Os meios pelos quais isso ocorre não são entendidos claramente, mas podem envolver um número de sistemas endócrinos, parácrinos e neurais (TILBROOK et al., 2000). Hormônios relacionados ao estresse podem influenciar a função sexual em todos os três níveis do eixo HPG: no cérebro (inibindo a secreção do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas; GnRH), na pituitária (interferindo na indução do GnRH para a liberação de LH), e nas gônadas (alterando o efeito estimulatório das gonadotrofinas na secreção dos esteróides sexuais; RIVIER & RIVEST, 1991). De fato, variações climáticas extremas, transporte, isolamento e contenção suprimem ou retardam a expressão comportamental de estro e a ovulação em ovelhas (TILBROOK et al., 2000). A combinação de isolamento e contenção envolve tanto componentes psicológicos quanto físicos e é reconhecida por ativar o eixo HPA na ovelha (TURNER et al., 2002), e um marcado incremento na concentração de cortisol é comumente associada com estes estressores (MACFARLANE et al., 2000). Dolorosos, e, portanto estressantes, eventos no período de reprodução também têm efeitos deletérios na fertilidade (DOBSON & SMITH, 1998).

Os efeitos do estresse na função reprodutiva e os mecanismos que mediam esses efeitos dependem do tipo, da duração e frequência do estímulo, bem como a influência do esteróide presente no meio sobre componentes adrenérgicos e opióides tem impacto no eixo HPG (RIVIER & RIVEST, 1991). Assim, a ativação do eixo HPA induzida pelo estresse difere entre os sexos em algumas espécies e é geralmente aceito que os esteróides sexuais são em grande parte responsáveis por tal diferença (TURNER et al., 2002). Embora a reprodução em ambos machos e fêmeas seja um risco devido ao estresse, a fêmea parece ser mais

vulnerável ao estresse comportamental. O sucesso reprodutivo dela é dependente de uma série de eventos neuroendócrinos cuidadosamente orquestrados. Se o sincronismo para qualquer destes eventos é interrompido, a falha da reprodução ocorrerá (MOBERG, 1991).

O regulamento da fase folicular do ciclo estral é especialmente vulnerável aos efeitos do estresse. O regulamento neuroendócrino do desenvolvimento folicular e da ovulação requer uma complexa e delicada interação entre o hipotálamo, pituitária e gonadotrofinas, e as ações de *feedback* do principal esteróide folicular, o estradiol (MOBERG, 1991). Na fase folicular de um ciclo estral normal, o papel correto da secreção do GnRH pelo hipotálamo conduz a uma incrementada liberação pulsátil de LH pela glândula pituitária. Em ajuste com o Hormônio Foliculo Estimulante (FSH), isto dita a taxa de crescimento folicular e produção de estradiol, finalmente conduzindo a um pulso pré-ovulatório de LH e ovulação. Dentro do foliculo em crescimento, o oócito mantém contato direto com as células da granulosa através das projeções celulares da zona pelúcida. Assim, os eventos que influenciam a integridade da função folicular podem ter efeitos diretos na viabilidade do oócito. Estes efeitos não são sempre imediatamente óbvios, por exemplo, sabe-se que os mRNAs estão repousados no núcleo do oócito mas não são traduzidos até o estágio de 8 células do desenvolvimento do concepto, conseqüentemente, nenhum evento que mudar a atividade da célula da granulosa pode influenciar taxas de gravidez. Certamente, há evidências de taxas de concepção reduzidas após ter-se prolongado a duração da fase folicular atrasando artificialmente o início do pico de LH (DOBSON & SMITH, 2000).

A plena funcionalidade dos corpos lúteos (CL), sinalizada por um nível de progesterona (P4) superior a 1,0ng/ml, tem início, na maioria das ovelhas, no terceiro dia após o início da fase folicular. Porém, desordens luteais, que têm sido associadas com infertilidade, incluem sobrevida curta do corpo CL e fase luteal insuficiente (MURDOCH & VAN KIRK, 1998). Entre o quarto e o quinto dia após a detecção do estro os CL podem regredir, o que se evidencia pela redução na concentração de P4 e pelo aspecto acinzentado e ausência de irrigação desses corpos lúteos, tendo como causa aparente um estímulo luteolítico precoce (OKADA et al. 2000). Muitas teorias têm sido propostas para explicar a base da fase luteal insuficiente: um pico pré-ovulatório de gonadotrofinas abaixo do necessário; maturação deficiente das células foliculares e/ou suporte luteotrófico diminuído (MURDOCH & VAN KIRK, 1998). Dobson & Smith (2000) relatam três possíveis situações interligando a baixa frequência dos pulsos de LH induzida pelo estresse e os casos de sub-fertilidade.

Prevê-se que em algumas situações, como durante o esforço crônico de uma laminitite ou de uma febre mais severa, a frequência de pulsos GnRH/LH será tão lenta que o

crescimento folicular inicial ocorrerá mas será incapaz de continuar dentro dos estádios avançados que dependem de uma frequência mais rápida dos pulsos. Assim, o animal não mantém o ciclo estral e o consequente anestro é facilmente reconhecido.

Em situações ligeiramente menos estressantes, a frequência do pulso de GnRH/LH pode ser apenas rápida o bastante para suportar o crescimento folicular, mas porque está sobre a “lâmina de uma faca”, será suscetível à interrupção ou à variação por estímulos de outra maneira inócuos. Neste caso, a integridade das células da granulosa, e assim o oócito, pode ser comprometida, e embora o estro e a fecundação possam ocorrer, o conceito não se tornará uma prenhez.

Uma terceira encenação poderia existir na qual a frequência do pulso fosse suficiente para levar o folículo aos estádios avançados de desenvolvimento, mas não é completamente rápida o bastante para fornecer um *priming* correto de GnRH da pituitária e/ou adequada produção de estradiol. Portanto, um pulso impróprio do LH é gerado e, como é incapaz de causar a ovulação e a luteinização, o folículo persiste para produzir a síndrome ovariana cística, clinicamente reconhecida (DOBSON & SMITH, 2000).

A diversidade de modelos estudados, bem como o uso de agonistas ou antagonistas peptidérgicos com discutível especificidade, apresentaram muitos trabalhos que dificultam a interpretação. Em vista dos frequentes resultados conflitantes disponíveis na literatura, seria interessante obter a melhor compreensão do preciso papel desempenhado por vários mecanismos mediante resposta temporal do eixo HPG ao estresse, particularmente com consideração do tipo e duração do estresse (RIVIER & RIVEST, 1991). Quando o estresse é prolongado ou crônico resulta em secreção suprimida de gonadotrofinas e inibição da reprodução, mas, quando a duração da resposta ao estresse é transitória ou aguda, as consequências não são claras; há relatos de ausência de efeito, efeito estimulante ou inibitório na reprodução (TILBROOK et al., 2000).

A produção de cortisol ascende em resposta a desafios energéticos, imunológicos e psicossociais. Então, o aumento no cortisol poderia servir como um sinal fisiológico para o corpo de que as condições para a reprodução estão se deteriorando (NEPOMNASCHY et al., 2006). Em animais recebendo cortisol após a retirada do pessário vaginal (por 12 dias), em níveis semelhantes ao do estresse natural, o desenvolvimento e subseqüente regressão do CL foram retardados, além de ter suprimido a maturação folicular e o pico ovulatório de LH (MACFARLANE et al., 2000). O resultado é um CL anormal, caracterizado por hipoplasia luteal, com baixa habilidade em secretar progesterona devido a uma luteinização inadequada (OKADA et al., 2000).

Além da utilidade como marcador de estresse, o cortisol pode estar direta ou indiretamente envolvido em um dos mecanismos próximos que mediam a suposta associação entre estresse materno e perda da gestação, já que pode afetar a produção luteal de progesterona. Níveis baixos de progesterona são capazes de afetar a maturação uterina e a manutenção da gestação. Consistente com essa “mediação” é o relato de uma associação negativa entre cortisol e progesterona em torno do tempo de implantação (NEPOMNASCHY et al., 2006).

2.3.2 Estresse e laparoscopia

A resposta do eixo HPA e, mais especificamente, mudanças na concentração plasmática de cortisol, tem sido usada em ovinos para avaliar a aflição e a dor causadas por práticas rotineiras da pecuária, tais como a castração e descola, e por procedimentos veterinários, como a eletroejaculação. A laparoscopia é uma dessas práticas veterinárias comuns (STAFFORD et al., 2006). Neste contexto, Khalid et al. (1998) pesquisaram a resposta de cortisol em ovelhas submetidas à inseminação cervical ou laparoscópica e os procedimentos de manipulação associados com tais técnicas. Assim, as ovelhas responderam com elevação na concentração de cortisol logo que foram presas para a inseminação cervical e logo que foram suspensas na maca para a inseminação laparoscópica. O pico na concentração de cortisol foi similar após ambos os tratamentos, o que sugere que ambos são estressantes e que a laparoscopia por si não é necessariamente dolorosa. Como nas ovelhas que não receberam nenhum sedativo antes da laparoscopia a resposta de cortisol pela colocação na maca foi similar àquela após a colocação na maca e realização da laparoscopia, fica a implicação de que a inversão na maca é tão desagradável para a ovelha que a laparoscopia não adiciona uma aflição extra.

Stafford et al. (2006), também encontraram uma resposta de cortisol nas ovelhas apenas suspensas na maca, após sedação, significativamente alta e com duração de 90 minutos. No entanto, essa resposta foi menor que a resposta obtida dos animais sedados, presos à maca e submetidos à laparoscopia, sugerindo que embora a suspensão na maca tenha sido aflitiva foi muito menos que a laparoscopia. É assumido que a maior parte da dor durante o procedimento de laparoscopia é devido ao estiramento do peritônio, causado pela distensão do abdômen com gás.

O trabalho de Martin et al. (1981) mostrou que o aumento nos níveis de cortisol foi transitório após uma laparoscopia e que se manteve elevado (70-100ng/ml) após repetidas laparoscopias em ovelhas em anestro estacional. A repetição da laparoscopia reduziu o

número de fêmeas com pulsos de LH, mas todas que apresentaram pulso de LH ovularam em presença de carneiros. No impedimento do pulso de LH, o estresse associado com laparoscopia pode atuar tanto em nível de ovário, onde previne a secreção de estradiol em resposta ao macho, quanto em nível hipotalâmico, onde pode prevenir a ação de *feedback* positivo do estradiol. Segundo os autores, é improvável que tenha existido qualquer interferência da onda de LH na ação ovulatória neste estudo, visto que uma única ovelha submetida a repetidas laparoscopias teve o surgimento de LH e também ovulou. No entanto, ainda sob a visão dos próprios autores, os resultados não podem ser extrapolados diretamente para ovelhas ciclando normalmente.

Mesmo sendo verdade que situações insólitas (estressores) ativam o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal, causando assim um incremento no cortisol plasmático e que isto seja essencial para a homeostase, a concentração elevada de cortisol não pode ser o único critério para se definir “estresse” (DOBSON & SMITH, 1998).

2.4 Função ovariana e reconhecimento da gestação

O ciclo reprodutivo anual da ovelha é regulado pela amplitude do fotoperíodo. Os ovinos traduzem um sinal luminoso em um sinal hormonal através da melatonina, que é sintetizada durante a noite na glândula pineal e indica ao animal as mudanças do ciclo luz-escurecimento. Em latitudes $>35^{\circ}$, a função reprodutiva da ovelha envolve uma série de eventos fisiológicos que diferem ao longo do ano. O ciclo reprodutivo se classifica em uma etapa de atividade reprodutiva e uma de ausência de reprodução (anestro). Na maioria das raças ovinas, a época reprodutiva inicia-se no final do verão e se caracteriza por ciclos estrais sucessivos de 17 dias. A época de anestro inicia-se no fim do inverno e se caracteriza pela ausência de ciclos regulares e de ovulação (LEDEZMA et al., 2006).

Durante o ciclo estral, e também durante o anestro sazonal, o crescimento folicular ocorre em um modelo de ondas. A onda é definida como a emergência sincrônica de um grupo de pequenos folículos antrais ($>2\text{mm}$) dos quais, normalmente, um ou dois folículos alcançam o diâmetro maior ou igual a 5mm. Podem ocorrer de duas a cinco ondas foliculares por ciclo (BARTLEWSKI et al., 1999).

Após a ovulação, o folículo de Graaf se rompe e os vasos sanguíneos oriundos da teca interna proliferam, preenchendo a cavidade do folículo e transformando-o em um corpo vermelho conhecido como corpo hemorrágico. Entre 4-5 dias da ovulação, o corpo hemorrágico transforma-se em um sólido corpo amarelo, o corpo lúteo (CL). As células da teca e da granulosa do folículo rompido sofrem uma série de mudanças estruturais e

funcionais conhecidas como luteinização, que resulta em mudança na secreção, predominantemente de estradiol (E2), para progesterona (BARTLEWSKI et al., 1999).

O CL secreta a progesterona, como principal hormônio esteróide, além de estradiol-17 β , prostaglandinas e vários hormônios peptídeos como relaxina, ocitocina, neurofísica, vasopressina e inibina. Durante a luteinização, a produção de progesterona eleva-se mais de 10 vezes devido ao aumento na produção das enzimas esteroidogênicas. Além disso, algum aumento de P4 pode ser atribuído ao grande aumento do fluxo sanguíneo para o CL, permitindo a utilização de lipoproteínas séricas como fonte de colesterol para a esteroidogênese (WILTBANK & NISWENDER, 1992).

As células da granulosa adquirem características das células luteais grandes (esféricas, com 25-35 μ m de diâmetro, alta produção de progesterona e capacidade de secreção de ocitocina) e, representam aproximadamente 40% do volume do CL, embora elas constituam apenas 10% do número total de células. Da mesma forma, as células da teca adquirem propriedades das células luteais pequenas (ovaladas, com 15-22 μ m de diâmetro, responsividade ao LH e ausência de produção de ocitocina), constituindo 20% do volume do CL e, aproximadamente, 25% do número total de células. As células luteínicas pequenas produzem P4 em resposta à estimulação pelo LH, enquanto que as células luteínicas grandes possuem alta produção basal de P4, independentemente de estímulos externos (WILTBANK & NISWENDER, 1992).

Durante a época reprodutiva, a P4 regula os ciclos estrais da ovelha inibindo a secreção pulsátil de GnRH em nível do hipotálamo, onde exerce sua ação de maneira indireta, possivelmente através do ácido gama amino butírico e dos peptídios opióides endógenos. Na fase folicular do ciclo estral, o E2 exerce um efeito de retro-alimentação positiva em nível do hipotálamo, incrementa a secreção pulsátil de GnRH e do LH, e induz o pico pré-ovulatório de ambos hormônios, provocando a conduta de estro e a ovulação (LEDEZMA et al., 2006). O nível de P4 na corrente sanguínea atinge seu pico cerca de seis dias após a ovulação e permanece alto durante toda a gestação em animais na estação reprodutiva. Já durante o período de transição do anestro para estação reprodutiva a concentração sérica de progesterona na ovelha situa-se em 0.28 \pm 0.19ng/ml no dia 0 (primeiro dia do estro), sem variação até o dia 4 após a ovulação, aumenta do dia 4 ao dia 5, e alcança valor máximo de 2.82 \pm 0.25ng/ml no dia 11. Então, declina para 1.92 \pm 0.28ng/ml no dia 14, depois para 0.62 \pm 0.28ng/ml no dia 15 e finalmente para 0.10 \pm 0.04ng/ml no dia 16 do ciclo (BARTLEWSKI et al., 1999). Se não ocorrer a fecundação ou o processo de implantação falhar, (após 11-12 dias na ovelha e 13-14 dias na cabra), o endométrio libera pulsos de

prostaglandina (PGF2 α), hormônio anti-luteolítico, que induz a regressão do CL (luteólise), que diminui de tamanho, torna-se pálido (corpo albicans) e a secreção de P4 diminui (GARVERICK et al., 1992).

A plena funcionalidade dos CL, sinalizada por um nível de P4 superior a 1,0ng/ml, tem início, na maioria das ovelhas, no terceiro dia após o início da fase folicular (MURDOCH & VAN KIRK, 1998). Porém, casos de infertilidade têm sido associados a desordens na função luteal. Corpos lúteos subnormais podem ser categorizados em dois grupos: CL com sobrevida curta e CL com sobrevida normal, mas com reduzida secreção de progesterona (<1.5ng/ml). Fase luteal curta é documentada em vacas e ovelhas durante a puberdade, pós-parto precoce e no início da estação reprodutiva em ovelhas em anestro, geralmente caracterizada por ciclos estrais de curta duração (7-10 dias) com decréscimo da progesterona após dias 5-6, quando comparada com animais de ciclo estral de duração normal (GARVERICK et al., 1992). Já Okada et al. (2000) apresentam uma situação ainda mais severa, com regressão dos CL entre o quarto e o quinto dia após o estro, o que se evidencia pela redução na concentração de P4 e pelo aspecto acinzentado e ausência de irrigação desses corpos lúteos, tendo como causa aparente um estímulo luteolítico precoce. Sabe-se que o período no qual o CL é refratário à ação luteolítica da PGF2 α é espécie dependente. Por volta do sexto dia após a ovulação, a administração de PGF2 α causa regressão do CL em ovelhas e vacas, mas existem relatos da eficácia do uso de PGF2 α já no terceiro dia pós-estro em cabras ((LEDEZMA et al., 2006).

Para um desenvolvimento luteal normal e funcional em bovinos e ovinos o LH é necessário. No entanto, secreção diminuída de LH durante a fase luteal precoce não tem sido associada com redução na meia-vida luteal. Concentração média e frequência, amplitude e duração dos pulsos de LH foram similares em vacas com fase luteal curta ou normal. Ações coordenadas do FSH e LH também são necessárias para a preparação adequada das células foliculares para luteinização e subsequente produção de P4 (GARVERICK et al., 1992). Vários estudos têm sugerido que o CL de vida curta em ovelhas e vacas pode resultar do inadequado desenvolvimento folicular. Ao contrário do sugerido, na primeira ovulação da estação reprodutiva, ou seja, período de transição, as ovelhas estudadas por Bartlewski et al. (1999) não apresentaram CL subnormais, que seriam originados de folículos imaturos, com sobrevida média de 11.6 \pm 1.1 dias.

Para o estabelecimento da gestação é preciso que ocorra um prolongamento da duração do CL. Isto só é possível se a síntese e liberação pulsátil de PGF2 α forem abolidas, pois provocaria suspensão da secreção de progesterona. Na ovelha, no dia 12 após o estro, a

presença de um concepto é requerida para prevenir a regressão luteal e assim ocorrer o estabelecimento da gestação. A manutenção do CL não é devida a uma redução na produção uterina da PGF2 α ; na ovelha prenhe não só há um aumento na secreção uterina de PGF2 α , mas há também um CL com reduzida sensibilidade para a PGF2 α . Nos dias 12 e 13 pós-estro, dosagens de PGF2 α que iniciariam a regressão luteal e o retorno ao estro em ovelhas não-prenhes fracassam para causar regressão luteal em ovelhas prenhes. Por isso, a presença do concepto resulta em um CL que é menos sensível à PGF2 α , e isto não se deve à redução no número de receptores para PGF2 α (COSTINE et al., 2007).

Embriões ovinos em estágio de mórula (16-32 células) entram no útero pelo oviduto no dia 3-4 pós-cobertura (dia 0= estro/cobertura). O blastocisto é formado no dia 6, e a zona pelúcida desaparece entre os dias 8 e nove (SPENCER et al., 2004a). No dia 11, o blastocisto assume uma forma tubular, atinge 10cm ou mais em comprimento no dia 14, e alcança 25cm ou mais em comprimento no dia 17 após a cobertura. O reconhecimento e estabelecimento da gestação envolvem o alongamento do blastocisto esférico para um concepto filamentosso entre os dias 12 e 16 e a produção de Interferon tau (IFNT; do dia 10 ao dia 25) pelo concepto. O IFNT é anti-luteolítico e atua no endométrio para inibir o desenvolvimento de mecanismos luteolíticos, desse modo mantendo a função do CL e assegurando a continuação da produção de P4. A progesterona atua no útero para estimular e manter funções endometriais necessárias para o crescimento do concepto, implantação, placentação e desenvolvimento a termo. A concentração de P4 no início da gestação afeta claramente a sobrevivência embrionária. O aumento nas concentrações de P4 entre os dias 2 e 5 ou 5 e 9 realça o desenvolvimento e tamanho do concepto bovino, enquanto concentrações baixas na fase luteal precoce retardam o desenvolvimento embrionário e diminuem a produção de IFNT (SATTERFIELD et al., 2006). A manutenção da prenhez requer comunicação recíproca entre concepto e endométrio durante a implantação e placentação sinepiteliocorial. Na ovelha, implantação superficial e placentação iniciam nos dias 15-16, mas não estão completas até os dias 50-60 de prenhez (SPENCER et al., 2004b), sendo relatada uma taxa de 30% de morte embrionária nessa espécie.

Ao redor do período de reconhecimento maternal da gestação (dia 12), a Proteína Trofoblástica Ovina (oTP-1) é secretada transitoriamente pelo concepto e modifica a resposta imunológica materna. A oTP-1 tem sido associada com prolongamento da meia-vida luteal e sugerida como fundamento para as concentrações elevadas de P4 nas fêmeas gestantes quando comparadas com fêmeas não-gestantes. (GARVERICK et al., 1992).

O prolongamento da meia-vida do CL é uma característica da prenhez de espécies mamíferas com um período de gestação que excede a duração de um ciclo estral normal ou menstrual, como nos animais domésticos, roedores e humanos (SPENCER et al., 2004b). Uma função lútea anormal ou inadequada ocorre naturalmente, como já mencionada, em várias situações fisiológicas nos ruminantes domésticos, tais como puberdade, pós-parto e início da estação reprodutiva, ou em situações em que a reprodução foge ao controle endócrino, tal como no estresse. Essa ocorrência contribui, significativamente, para a infertilidade, uma vez que aumenta a taxa de perda embrionária (MOBERG, 1991; NEPOMNASCHY et al., 2006).

Por fim, em ovinos, o estabelecimento e manutenção da prenhez requerem a integração de sinais endócrinos e parácrinos oriundos do ovário, concepto e útero.

3 CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

FUNÇÃO LUTEAL INICIAL EM OVELHAS SUBMETIDAS A PNEUMOPERITÔNIO DURANTE O ESTRO

**Caroline Flores Zielinski, Andreane Rosa Filappi, Ricardo Xavier da Rocha,
Adelina Aires Rodrigues, Luiz Felipe Krueel Borges, Marcelo da Silva Cecim**

Ciência Rural, 2008

1 **Função luteal inicial em ovelhas submetidas a pneumoperitônio durante o estro**

2 **Early luteal function in ewes submitted of pneumoperitoneum during estrus**

3
4 **Caroline Flores Zielinski^I, Andreane Rosa Filappi^I, Ricardo Xavier da Rocha^I,**
5 **Adelina Aires Rodrigues^I, Luiz Felipe Krueel Borges^{II}, Marcelo da Silva Cecim^{I*}**
6

7 **RESUMO**

8
9 Ovelhas submetidas à inseminação artificial por laparoscopia têm um incremento nos
10 níveis séricos de cortisol. A dor induzida pelo pneumoperitônio parece ser a causa deste
11 aumento e pode estar relacionada com as baixas taxas de concepção da técnica. O objetivo
12 deste estudo foi investigar os níveis de progesterona em ovelhas submetidas a
13 pneumoperitônio durante o estro. Cento e dezenove fêmeas ovinas foram sincronizadas com
14 pessário vaginal por 12 dias. Após a remoção do pessário os animais foram expostos a rufiões
15 (GR) ou carneiros (GCa), e as ovelhas marcadas foram imobilizadas em maca de inseminação
16 e submetidas a pneumoperitônio (GT) ou não (GC). Amostras de sangue foram colhidas nos
17 dias três, seis e nove após os tratamentos para análise de progesterona (P4). Não houve
18 interação entre P4 e os grupos GCa e GR ou entre P4 e os grupos GT e GC. Valores de P4
19 foram maiores no GCa que o GR nos dias três, seis e nove ($p < 0.0001$). Não houve diferença
20 nas taxas de prenhez entre GT e GC nas ovelhas cobertas por carneiros, nem interação entre
21 prenhez e os níveis de P4 nos dias três, seis e nove. As taxas de prenhez foram baixas, 43 e
22 64% para GT e GC, respectivamente. Conclui-se que o pneumoperitônio no dia do estro não
23 afeta os níveis subsequentes de P4 em ovelhas.

^ILaboratório de Endocrinologia e Metabologia Animal (LEMA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil. E-mail: mcecim@smail.ufsm.br. * Autor para correspondência.

^{II}Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep), UFSM, Santa Maria-RS, Brasil.

1

2 **Palavras-chave:** ovelhas, progesterona, pneumoperitônio, laparoscopia.

3

4 **ABSTRACT**

5

6 Ewes submitted to artificial insemination by laparoscopy have an increase in serum
7 cortisol levels. Pain induced by pneumoperitoneum appears to be the cause of such increase
8 and may be related to the low conception rates of the technique. The objective of this study
9 was to investigate progesterone levels in ewes following pneumoperitoneum during estrus.
10 One hundred nineteen ewes were synchronized with vaginal pessaries for 12 days. After
11 pessary removal animals were exposed to testosterone primed teaser wethers (GR) or rams
12 (GCa), marked ewes were immobilized in a insemination cradle and submitted (GT) or not to
13 pneumoperitoneum (GC). Blood samples were collected on days three, six and nine after
14 treatment for progesterone (P4) analysis. No interaction was found between P4 and GCa, GR
15 or between P4 and GT and GC. P4 values were higher on GCa on days three, six and nine
16 than in GR ($P < 0.0001$). There were no differences in pregnancy rates between GT and GC in
17 ram served ewes, nor interaction between pregnancy and P4 levels on days three, six and nine.
18 Pregnancy rates were low, 43 and 64% for GT and GC groups respectively. It is concluded
19 that pneumoperitoneum per se on the day of estrus does not affect subsequent P4 levels in
20 sheep.

21

22 **Key words:** ewes, progesterone, pneumoperitoneum, laparoscopy.

23

24 **INTRODUÇÃO**

25

1 A anatomia cervical incomum da espécie ovina exigiu o aperfeiçoamento das técnicas
2 de inseminação artificial (IA). O desenvolvimento da técnica de IA por laparoscopia resultou
3 em um expansivo uso de sêmen congelado, agregando valor genético e modificando a
4 indústria ovina. No entanto, resultados variáveis de fertilidade têm sido relatados. Atribuem-
5 se os baixos índices de concepção à reduzida habilidade de transporte e capacitação do sêmen
6 congelado (ANEL et al., 2005), porém, estudos recentes não obtiveram diferença nas taxas de
7 fertilização após laparoscopia com sêmen fresco diluído (25.5%) ou congelado (39.6%) na
8 dose de 50×10^6 (EHLING et al. (2003). Com base nestes resultados, o sêmen congelado não
9 pode ser responsabilizado isoladamente pelos baixos índices de fertilidade após IA por
10 laparoscopia.

11 O estresse atua como um desregulador do sistema reprodutivo em primatas e espécies
12 domésticas, afetando a secreção das gonadotrofinas mediante mecanismos que modificam a
13 síntese ou secreção do GnRH, a responsividade das gonadotrofinas ao GnRH ou a ação de
14 *feedback* dos hormônios gonadais. De fato, variações climáticas extremas, transporte,
15 isolamento e contenção suprimem ou retardam a expressão comportamental de estro e a
16 ovulação em ovelhas (TILBROOK et al., 2000). Além disso, estes fatores também estimulam
17 a atividade do eixo hipolâmico-pituitário-adrenal, e um marcado incremento na concentração
18 de cortisol é comumente associada com esses estressores. (MACFARLANE et al., 2000).

19 A plena funcionalidade dos corpos lúteos (CL), sinalizada por um nível de
20 progesterona (P4) superior a 1,0ng/ml, tem início, na maioria das ovelhas, no terceiro dia após
21 o início da fase folicular. Porém, desordens luteais, que têm sido associadas com infertilidade,
22 incluem sobrevida curta do corpo CL e fase luteal insuficiente (MURDOCH & VAN KIRK,
23 1998). Entre o quarto e o quinto dia após a detecção do estro os CL podem regredir, o que se
24 evidencia pela redução na concentração de P4 e pelo aspecto acinzentado e ausência de
25 irrigação desses corpos lúteos, tendo como causa aparente um estímulo luteolítico precoce

1 (OKADA et al. 2000). A concentração de P4 no início da gestação afeta claramente a
2 sobrevivência embrionária. O aumento nas concentrações de P4 entre os dias dois e cinco ou
3 cinco e nove realça o desenvolvimento e tamanho do conceito, enquanto concentrações
4 baixas na fase luteal precoce retardam o desenvolvimento embrionário e diminuem a
5 produção de interferon-tau, que é anti-luteolítico (SATTERFIELD et al., 2006).

6 Muitas teorias têm sido propostas para explicar a base da fase luteal insuficiente: um
7 pico pré-ovulatório de gonadotrofinas abaixo do necessário; maturação deficiente das células
8 foliculares e/ou suporte luteotrófico diminuído (MURDOCH & VAN KIRK, 1998). Em
9 animais recebendo cortisol após a retirada do pessário vaginal (por 12 dias), em níveis
10 semelhantes ao do estresse natural, o desenvolvimento e subsequente regressão do CL foram
11 retardados, além de ter suprimido a maturação folicular e o pico ovulatório de LH
12 (MACFARLANE et al., 2000). O resultado é um CL anormal, caracterizado por hipoplasia
13 luteal, com baixa habilidade em secretar progesterona devido a uma luteinização inadequada
14 (OKADA et al., 2000).

15 Quando o estresse é prolongado ou crônico resulta em secreção suprimida de
16 gonadotrofinas e inibição da reprodução, mas, quando a duração da resposta ao estresse é
17 transitória ou aguda, as consequências não são claras; há relatos de ausência de efeito, efeito
18 estimulante ou inibitório na reprodução (TILBROOK et al., 2000). Estudos com laparoscopia
19 apontam a técnica como causadora de estresse, devido à dor durante e após o procedimento,
20 que se deve ao estiramento do peritônio, causado pela distensão do abdômen com gás
21 (MARTIN et al., 1981; KHALID et al., 1998; STAFFORD et al., 2006).

22 A hipótese deste estudo é que o estresse induzido pelo pneumoperitônio impeça a
23 ovulação em ovelhas, ou provoque a luteinização deficiente das células do folículo ovulatório,
24 resultando em um corpo lúteo com baixa capacidade de secretar progesterona, ou um corpo
25 lúteo com meia-vida curta. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do pneumoperitônio,

1 causado pela técnica de laparoscopia, sobre o perfil hormonal de progesterona e taxas de
2 prenhez em ovelhas na fase de transição da estação reprodutiva.

3

4 **MATERIAL E MÉTODOS**

5

6 Animais e modelo experimental

7 O experimento foi desenvolvido em uma propriedade rural situada à 29 56 20.40S e 53
8 56 32.24W, Rio Grande do Sul, Brasil, durante os meses de novembro e dezembro de 2006,
9 período de transição da estação reprodutiva para a maioria das raças ovinas situadas no
10 hemisfério sul. Foram utilizadas 119 fêmeas ovinas, de 1 a 6 anos, da raça Texel e cruzas.
11 Todas as ovelhas receberam um pessário vaginal contendo 60mg de acetato de
12 medroxiprogesterona (MAP) por 12 dias. No dia da retirada do pessário, as fêmeas foram
13 separadas aleatoriamente em dois grupos: Grupo com Rufião (n=48) utilizou-se 10% de
14 machos castrados androgenizados e Grupo com Carneiro (n=71) utilizou-se 10% de carneiros
15 de fertilidade comprovada. Todos os machos foram impregnados na região peitoral com uma
16 mistura pastosa de corante (pó xadrez + óleo vegetal + gordura animal) e mantidos com as
17 fêmeas durante a noite (período de 12 horas) por quatro dias após a retirada dos pessários. As
18 ovelhas identificadas em estro, diariamente, foram alocadas em dois novos grupos (Tratado e
19 Controle). No Grupo Tratado (n=59), individualmente, cada ovelha foi colocada na maca de
20 contenção, submetida à tricotomia e anti-sepsia da região abdominal caudal e bloqueio
21 anestésico local. A maca então foi elevada, permanecendo o animal com a cabeça abaixo do
22 nível da pelve. Uma cânula foi inserida na cavidade abdominal através de um trocarter, e uma
23 bomba de ar, conectada à cânula, permitiu a entrada de Ar ambiente (pressão 15mmHg),
24 conforme procedimento realizado para IA por laparoscopia. O Ar foi mantido por um (1)
25 minuto, quando foi liberado e o animal retirado da maca. Nos animais do Grupo Controle

1 (n=60), procedeu-se igualmente ao Grupo Tratado, porém não se inseriu Ar na cavidade,
2 permanecendo o animal por um (1) minuto apenas com a cânula, quando então foi retirado da
3 maca.

4 Todos os animais tiveram amostras de sangue colhidas por venopunção nos dias três,
5 seis e nove após os tratamentos para análise de progesterona. O sangue foi centrifugado
6 (3.000rpm por 15min) e o soro obtido congelado a -20⁰C até o processamento. Utilizou-se a
7 técnica de quimioluminescência para quantificação da progesterona, com sensibilidade
8 mínima de 0.1ng/ml e especificidade de 95%.

9 O diagnóstico de gestação foi realizado com ultra-som Pie-Medical Scanner 200
10 (sonda linear transretal de 6MHz) aos 45 dias após tratamento.

11

12 Análise estatística

13 O efeito dos tratamentos na concentração de progesterona foi investigado por análise de
14 variância utilizando o PROC GLM (General Linear Models Procedure) do pacote estatístico
15 SAS (1996). Os dados foram representados como média ± erro padrão da média e foi adotado
16 como nível de significância 5%. A prenhez foi analisada pelo teste não-paramétrico (qui-
17 quadrado), utilizando o programa PROC CATMOD do SAS.

18

19 **RESULTADOS**

20

21 Não houve interação entre P4 e os Grupos Tratado e Controle, nem entre P4 e os
22 Grupos Carneiro e Rufião, sendo por isso os efeitos analisados separadamente (Tabela 1). Os
23 valores médios de P4 diferiram entre os Grupos Carneiro e Rufião no dia três (p<0.0001), seis
24 (p<0.0001) e nove (p<0.0001). A P4 não diferiu entre ovelhas prenhes e não prenhes do
25 Grupo Carneiro. A taxa de prenhez no Grupo Carneiro foi de 42.85% (15 em 35) no Grupo

1 Tratado e de 63.89% no Controle (23 em 36), não havendo diferença entre os grupos. Da
2 mesma forma, não houve interação entre Prenhez e P4 no referido grupo.

3

4 **DISCUSSÃO**

5

6 A não existência de interação entre os Grupos Tratado (com pneumoperitônio) e
7 Controle (sem pneumoperitônio) indica que contenção individual e a inversão na maca são tão
8 desagradáveis para a ovelha que a laparoscopia não adiciona uma aflição extra, fato
9 compartilhado com Khalid et al. (1998). Em ovelhas sem sedação, assim como no presente
10 estudo, a resposta de cortisol pela colocação na maca foi similar àquela após a colocação na
11 maca e realização da laparoscopia. Tanto nas fêmeas submetidas à inseminação cervical
12 quanto nas submetidas à inseminação laparoscópica, o pico de cortisol foi semelhante e se deu
13 logo após terem sido contidas ou suspensas na maca para os respectivos procedimentos,
14 sugerindo que ambos são estressantes e que a laparoscopia por si só não é necessariamente
15 dolorosa (KHALID et al., 1998). Em ovelhas com sedação, Stafford et al. (2006) também
16 encontraram níveis de cortisol significativamente altos, e com duração de 90 minutos, nas
17 ovelhas suspensas na maca. No entanto, essa resposta foi menor que a resposta obtida nos
18 animais sedados, presos à maca e submetidos à laparoscopia, sugerindo que embora a
19 suspensão na maca tenha sido aflitiva foi muito menos que a laparoscopia, deixando mais uma
20 vez implícito que a maior parte da dor durante e após a técnica deveu-se ao pneumoperitônio.

21 A diferença entre os valores médios de P4 entre os Grupos Carneiro e Rufião desde o
22 dia três sugere uma influência precoce da presença do concepto sobre a produção de P4 pelo
23 CL. Enquanto Wiltbank et al. (1992) encontraram diferença na P4 entre ovelhas prenhes e
24 cíclicas somente ao redor do período de reconhecimento, este trabalho confirma o achado de

1 Schrick et al. (1993) que identificaram uma maior concentração de P4 em ovelhas prenhes
2 desde o dia primeiro ao dia 13 após o estro em relação às ovelhas cíclicas.

3 A P4 não diferiu entre ovelhas prenhes e não prenhes do Grupo Carneiro, indicando
4 que possa ter ocorrido falha no reconhecimento da gestação/implantação ou aborto. Na
5 ovelha, o reconhecimento materno da gestação ocorre no 12^o dia após a ovulação, e a
6 implantação superficial e placentação iniciam nos dias 15-16, mas não estão completas até os
7 dias 50-60 de prenhez (SPENCER et al., 2004). As taxas de prenhez (42.85% no Grupo
8 Tratado e 63.89% no Controle) são semelhantes às obtidas após IA por laparoscopia com
9 sêmen fresco (41% - MEGHAN et al., 2004) ou congelado (69% - ANEL et al., 2005).
10 Portanto, não se pode afirmar que os baixos índices de prenhez após laparoscopia são devidos
11 exclusivamente ao sêmen congelado, à dose de sêmen empregada, ao efeito raça, ao protocolo
12 de sincronização utilizado ou a tantos outros fatores estudados, mas é preciso investigar se a
13 causa não seria um fator comum a todas as metodologias empregadas. Os resultados do
14 presente estudo indicam que a contenção individual e a inversão na maca são os fatores
15 responsáveis pela baixa eficiência após IA por laparoscopia.

16 A hipótese deste estudo era de que o estresse induzido pelo pneumoperitônio
17 impedisse a ovulação ou provocasse uma luteinização deficiente do folículo ovulatório,
18 resultando em um corpo lúteo com baixa capacidade de secretar progesterona, ou ainda em
19 um corpo lúteo de meia-vida curta. Em todos os casos, os níveis de progesterona estariam
20 diminuídos logo no início fase luteal, justificando as análises nos dias três, seis e nove. No
21 entanto, a não interação entre tratamentos e a ocorrência de prenhez, levada a termo, mostra
22 que tais alternativas não ocorreram, e que a fase luteal seguiu sem alterações. Finalmente, os
23 resultados permitem concluir que o pneumoperitônio durante o estro não afeta os níveis de
24 progesterona entre o terceiro e nono dia da fase luteal subsequente.

1 A utilização dos animais nesta pesquisa seguiu as normas do Colégio Brasileiro de
2 Experimentação Animal (COBEA).

3

4 **AGRADECIMENTOS**

5

6 Os autores agradecem à propriedade rural Agropecuária São Francisco pela
7 disponibilização dos animais e instalações e à CAPES pela bolsa de estudo.

8

9 **REFERÊNCIAS**

10

11 ANEL, L. et al. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial
12 insemination in churra ewes: a field assay. **Theriogenology**, v.63, p.1235–1247, 2005.

13 EHLING, C. et al. Laparoscopic intrauterine insemination with different doses of fresh,
14 conserved, and frozen semen for the production of ovine zygotes. **Theriogenology**, v.60,
15 p.777–787, 2003.

16 KHALID, M.; HARESIGN, W.; BRADLEY D.G. Heart-rate responses and plasma cortisol
17 concentrations in ewes: comparison between cervical and laparoscopic intrauterine
18 insemination and their associated handling procedures. **Animal Science**, v.66, p.383-387,
19 1998.

20 MACFARLANE, M.S. et al. Effect of duration of infusion of stress-like concentrations of
21 cortisol on follicular development and the preovulatory surge of LH in sheep. **Animal**
22 **Reproduction Science**, v.63, p.167–175, 2000.

- 1 MARTIN, G.B.; OLDHAM, C.M.; LINDSAY, D.R. Effect of stress due to laparoscopy on
2 plasma cortisol levels, the preovulatory surge of LH, and ovulation in the ewe.
3 **Theriogenology**, v.16, n.1, p.39–44, 1981.
- 4 MEGHAN, C. et al. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new
5 transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and
6 lambing rates. **Theriogenology**, v.62, p.990–1002, 2004.
- 7 MURDOCH, W.J.; VAN KIRK, E.A. Luteal dysfunction in ewes induced to ovulate early in
8 the follicular phase. **Endocrinology**, v.139, n.8, p.3480–3484, 1998.
- 9 OKADA, A. et al. Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. **Journal of**
10 **Reproduction and Development**, v.46, n.6, p.397-402, 2000.
- 11 SATTERFIELD, M.C.; FULLER, W.B.; SPENCER, T.E. Progesterone regulation of
12 preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. **Biology of**
13 **Reproduction**, v.75, p.289-296, 2006.
- 14 SCHRICK, F.N. et al. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in
15 ewes. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1133-1140, 1993.
- 16 SPENCER, T.E. et al. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy.
17 **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.537-550, 2004.
- 18 STAFFORD, K.J. et al. Stress caused by laparoscopy in sheep and its alleviation. **New**
19 **Zealand Veterinary Journal**, v.54, p.109-113, 2006.
- 20 **Statistical Analysis System**. Software, Version 5. Cary: SAS Institute, 1996. CD-Rom. 10
21 arquivos, 305.437.692 bytes.

- 1 TILBROOK, A.J.; TURNER, A.I.; CLARKE, I.J. Effects of stress on reproduction in non-
- 2 rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. **Reviews of Reproduction**,
- 3 v.5, p.105-113, 2000.

- 4 WILTBANK, M.C. et al. Cellular regulation of corpus luteum function during maternal
- 5 recognition of pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, v.3, p.4341-4347,
- 6 1992.

- 1 Tabela 1 – Níveis de progesterona nos dias três, seis e nove após o dia do estro nos diferentes
2 tratamentos.

Tratamentos	Progesterona (ng/ml)		
	Dia 3	Dia 6	Dia 9
Pneumoperitônio			
Controle	0.35±0.05	1.55±0.17	1.92±0.24
Tratado	0.32±0.04	1.57±0.22	1.91±0.23
Método de acasalamento			
Carneiro	0.44±0.03 ^a	2.05±0.13 ^x	2.47±0.17 ^z
Rufião	0.11±0.01 ^b	0.55±0.09 ^y	0.76±0.11 ^w
Diagnóstico de gestação			
Prenhe	0.48±0.04	2.23±0.18	2.75±0.21
Não prenhe	0.40±0.04	1.89±0.18	2.31±0.21

- 3 Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0.0001)

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEL, L. et al. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. **Theriogenology**, v.63, p.1235–1247, 2005.

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; RAWLINGS, N.C. Ovarian function in ewes at the onset of the breeding season. **Animal Reproduction Science**, v.57, p. 67–88, 1999.

BOZKURT, P. et al. Systemic stress response during operations for acute abdominal pain performed via laparoscopy or laparotomy in children. **Anaesthesia**, v.55, p.5-9, 2000.

BRASESCO, O.E. et al. La patofisiología del pneumoperitoneo. Diez años de estudios en busca de una teoría unificadora. **Asociación Mexicana de Cirugía Laparoscópica**, v.3, n.3, p.101-108, 2002.

COSTINE, B.A. et al. Mechanisms of reduced luteal sensitivity to prostaglandin F₂ α during maternal recognition of pregnancy in ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, v.32, p.106–121, 2007.

COUTO, F.A.A. Dimensionamento do mercado da carne ovina e caprina no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2., 2003, João Pessoa-PB. **Anais...SANTOS, E.S.; SOUZA, W.H. (Eds.).** João Pessoa-PB: EMEPA, p.71-93, 2003.

CURET, M.J. et al. Effects of CO₂ pneumoperitoneum in pregnant ewes. **Journal of Surgical Research**, v.63, n.272, p.339-344, 1996.

DAPHAN, C.E. et al. Effects of laparotomy and carbon dioxide and air pneumoperitoneum, on cellular immunity and peritoneal host defences in rats. **European Journal of Surgery**, v.165, n.3, p.253-258, 2003.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. Stress and subfertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v.33, n.3-4, p.107-111, 1998.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Anim Reprod Sci**, v.60-61, p.743-752, 2000.

DONAVAN, A. et al. AI in sheep: breed differences in timing of ovulation. In: Proceedings of the Agricultural Research Forum, Dublin, 2000. **Agricultural Food Research**, v.39, n.3, p.13-14, 2000.

EHLING, C. et al. Laparoscopic intrauterine insemination with different doses of fresh, conserved, and frozen semen for the production of ovine zygotes. **Theriogenology**, v.60, p.777-787, 2003.

EPPLESTON, J.; MAXWELL, W.M.C. Sources of variation in the reproductive performance of ewes inseminated with frozen-thawed ram semen by laparoscopy. **Theriogenology**, v.43, p.777-788, 1995.

FAIR, S. et al. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. **Theriogenology**, v.63, p.1995-2005, 2005.

FAIR, S. et al. Hormonal relationships during the periovulatory period among ewe breeds known to differ in fertility after cervical artificial insemination with frozen thawed semen. **Anim Reprod Sci**, v.97, p.284-294, 2007.

FERNANDES, F.M.N. A Ovinocultura no Contexto Agropecuário Paulista. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE OVINOCULTURA, 5, Botucatu, 1999. **Anais...** Botucatu, 1999.

FONSECA, J. F., Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005. Goiânia, GO. **Anais: Palestras**, 2005.

FUKUI, Y.; ROBERTS, E.M. Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. **Theriogenology**, v.10, n.5, p.381-386, 1978.

GARVERICK, H.A.; ZOLLERS Jr, W.G., SMITH, M.F. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. **Animal Reproduction Science**, v.28, n.1, p.111-124, 1992.

GLANTZOUNIS, G.K. et al. Laparoscopic surgery-induced changes in oxidative stress markers in human plasma. **Surgical Endoscopy**, v.15, p.1315-1319, 2001.

HILL, J.R.; THOMPSON, J.A.; PERKINS, N.R. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28.447 Merino ewes under commercial conditions: a survey. **Theriogenology**, v.49, p.697-709, 1998.

IKECHEBELU, J.I. et al. Comparison of carbon dioxide and room air pneumoperitoneum for day-case diagnostic laparoscopy. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.25, n.2, p.172-173, 2005.

ISHIZUKA, B. et al. Stress responses during laparoscopy with CO₂ insufflation and with mechanical elevation of the abdominal wall. **The Journal of American Association of Gynecologic Laparoscopists**, v.7, n.3, p.363-371, 2000.

JORIS, J; LAMY, M. Neuroendocrine changes during pneumoperitoneum for laparoscopic cholecystectomy. **Clinical Circulation**, A33, 1992.

KERSHAW, C.M. et al. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v.64, p.1225–1235, 2005.

KILLEN, I.D.; CAFFERY, G.F. Uterine Insemination of ewes with aid of a laparoscope. **Australian Veterinary Journal**, v.59, p.95, 1982.

KING, M.E. et al. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. **Theriogenology**, v.62, p.1236–1244, 2004.

KHALID, M.; HARESIGN, W.; BRADLEY D.G. Heart-rate responses and plasma cortisol concentrations in ewes: comparison between cervical and laparoscopic intrauterine insemination and their associated handling procedures. **Animal Science**, v.66, p.383-387, 1998.

LEDEZMA, J.A. Sistemas neurales de retroalimentación durante el ciclo reproductivo anual de la oveja: una revisión. **Interciencia**, v.31, n.1, p.8-15, 2006.

LEMOS, S.L.S. et al. Efeitos do pneumoperitônio com ar e CO₂ na gasometria de suínos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.5, p.445-451, 2003.

MACFARLANE, M.S. et al. Effect of duration of infusion of stress-like concentrations of cortisol on follicular development and the preovulatory surge of LH in sheep. **Anim Reprod Sci**, v.63, p.167–175, 2000.

MARTIN, G.B.; OLDHAM, C.M.; LINDSAY, D.R. Effect of stress due to laparoscopy on plasma cortisol levels, the preovulatory surge of LH, and ovulation in the ewe. **Theriogenology**, v.16, n.1, p.39–44, 1981.

MEGHAN, C. et al. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. **Theriogenology**, v.62, p.990–1002, 2004.

MOBERG, G.P. How Behavioral Reproduction in Stress Disrupts the Endocrine Control of Domestic Animals. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.304-311, 1991.

MOSES, D. et al. A large-scale program in laparoscopic intrauterine insemination with frozen-thawed semen in Australian Merino sheep in Argentine Patagonia. **Theriogenology**, v.48, p.651-657, 1997.

MURDOCH, W.J.; VAN KIRK, E.A. Luteal dysfunction in ewes induced to ovulate early in the follicular phase. **Endocrinology**, v.139, n.8, p.3480–3484, 1998.

MURRAY, R.D.; WARD, W.R. Welfare implications of modern artificial breeding techniques for dairy cattle and sheep. **The Veterinary Record**, v.133, p.283-286, 1993.

NEPOMNASCHY, P.A. et al. Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans. **The National Academy of Sciences of the USA**, v.103, n.10, p.3938-3942, 2006.

NEVES, J.P.; LUZ, S.L.N. Inseminação laparoscópica em ovelhas com cio natural induzido e sincronizado antes e durante a estação reprodutiva. **Ciência Rural**, v.24, n.1, p.133-137, 1994.

NINOMIYA, K. et al. Comparison of pneumoperitoneum and abdominal wall lifting as to hemodynamics and surgical stress response during laparoscopic cholecystectomy. **Surg Endosc**, v.12, p.124-128, 1998.

NOGUEIRA FILHO, A. Ações de fomento do Banco do Nordeste e potencialidades da caprino-ovino cultura. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2., 2003, João Pessoa-PB. **Anais...SANTOS, E.S.; SOUZA, W.H. (Eds.)**. João Pessoa-PB: EMEPA, p.43-55, 2003.

ODEBERG, S. et al. Lack of neurohumoral response to pneumoperitoneum for laparoscopic cholecystectomy. **Surg Endosc**, v.12, p.1217-1223, 1998.

OKADA, A. et al. Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. **Journal of Reproduction and Development**, v.46, n.6, p.397-402, 2000.

O'LEARY, E. et al. Laparoscopic cholecystectomy: haemodynamic and neuro-endocrine responses after pneumoperitoneum and changes in position. **British Journal of Anaesthesia**, v.76, p.640-644, 1996.

PERKINS, N.R.; HILL, J.R.; PEDRANA, R.G. Laparoscopic insemination of frozen-thawed semen into one or both uterine horns without regard to ovulation site in synchronized Merino ewes. **Theriogenology**, v.46, p.541-546, 1996.

RIVIER, C.; RIVEST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biology of Reproduction**, v.45, p.523-532, 1991.

ROSENTHAL, R.J. et al. Reasons for intracranial hypertension and hemodynamic instability during acute elevation of intrabdominal pressure: observations in a large animal model. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v.2, p.415-425, 1998.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim Reprod Sci**, v.38, p.1-36, 1995.

SARE, M. et al. Effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on free radical formation in lung and liver tissues. **Surg Endosc**, v.16, p.188-192, 2002.

SATTERFIELD, M.C.; FULLER, W.B.; SPENCER, T.E. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v.75, p.289-296, 2006.

SAYRE, B.L.; LEWIS, G.S. Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine insemination of oxytocin-treated ewes. **Theriogenology**, v.48, p.267-275, 1997.

STAFFORD, K.J. et al. Stress caused by laparoscopy in sheep and its alleviation. **New Zealand Veterinary Journal**, v.54, p.109-113, 2006.

SPENCER, T.E. et al. Implantation mechanisms: insights from the sheep. **Reproduction**, v.128, p.657-668, 2004a.

SPENCER, T.E. et al. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.537-550, 2004b.

TILBROOK, A.J.; TURNER, A.I.; CLARKE, I.J. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.105-113, 2000.

TURNER, A.I. et al. Influence of sex and gonadal status of sheep on cortisol secretion in response to ACTH and on cortisol and LH secretion in response to stress: importance of different stressors. **Journal of Endocrinology**, v.173, p.113-122, 2002.

URE, B. M. et al. Peritoneal, systemic and distant organ inflammatory responses are reduced by a laparoscopic approach and carbon dioxide vs air. **Surg Endosc**, v.16, p.836-842, 2002.

WEST, M.A. et al. Mechanism of decreased in vitro murine macrophage cytokine release after exposure to carbon dioxide. **Annals of Surgery**, v.226, p.179-190, 1997.

WILTBANK, M.C.; NISWENDER, G.D. Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. **Anim. Reprod. Sci**, v.28, n.14, p.103-110, 1992.