

CARLA FREDRICHSEN MOYA

Tipificação Citológica do Líquido Amniótico no Momento do Parto de Bezerros Nelore Oriundos
de Produção *In Vitro*, Transferência de Embriões e Inseminação Artificial.

Dissertação

Mestrado

Botucatu

2005

Carla Fredrichsen Moya

Tipificação Citológica do Líquido Amniótico no Momento do Parto de Bezerros Nelore Oriundos de Produção *In Vitro*, Transferência de Embriões e Inseminação Artificial.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Unesp, Campus de Botucatu, para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Adj. Nereu Carlos Prestes

Botucatu – SP

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Moya, Carla Fredrichsen.

Tipificação citológica do líquido amniótico de bezerros oriundos de produção *In Vitro*, transferência de embrião e inseminação artificial no momento do parto / Carla Fredrichsen Moya. – 2005.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2005.

Orientador: Nereu Carlos Prestes

Assunto CAPES: 50504002

1. Bovino - Reprodução 2. Bezerro

CDD 636.208246

Palavras-chave: Bovinos; Citologia; FIV; IA; Líquido amniótico; TE

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Carlos Moya Gonçalves e Eidenir
Fredrichsen Moya pelo trabalho exemplar que
desenvolveram desde minha infância em termos de
disciplina, educação e formação acadêmica, mas acima de
tudo pelo resgate dos valores essenciais da vida e do ser
humano. Devo tudo a vocês.*

*As minhas duas irmãs Michele e Paula que apesar de já
mulheres feitas, nunca perderam o jeitinho de “criança
marota” para nos alegrar e confortar nas horas necessárias.*

Agradecimento especial

*A você Gustavo H. M. Araujo companheiro de todas as
caminhadas, o apoio fundamental, porto seguro sem o qual
eu nada teria conseguido realizar.*

Agradecimentos

A realização desse trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas e de forma particular:

A Deus, obrigada senhor por ser meu guarda, meu abrigo, por estar sempre ao meu lado, por guiar meus passos e iluminar meu caminho.

A minha mãe Eidenir Fredrichsen Moya, ao meu pai Carlos Moya Gonçalves, as minhas duas irmãs Michele e Paula pelo amor fraterno e apoio, pela compreensão e confiança.

Ao meu Orientador Professor Dr. Nereu Carlos Prestes pela competência e seriedade, pela presença constante e amiga, pela paciência e compreensão dos meus limites.

Ao DRARV da FMVZ/UNESP – Botucatu, pelo apoio material, seja para a pesquisa, ou produção final desta dissertação. A todos os colegas do departamento, pelo apoio e pela palavra amiga transmitida na convivência diária.

A Professora Noemi S. Rocha do setor de Patologia do DCM da FMVZ/UNESP – Botucatu e ao Pós-

graduando Marcelo Piagentini pela essencial colaboração no manejo experimental.

Às Fazendas Campininha (Avaré/SP), Monjolinho (Arandu/SP) e Boi Verde (Avaré/SP) pela colaboração durante a colheita das amostras de líquido amniótico. Em especial aos funcionários (Laércio, Junior, Corintiano, Eduardo, Sidney e Silvia) que não mediram esforços para nos ajudar neste estudo.

Aos professores João Carlos P. Ferreira e Maria Denise Lopes pelas contribuições no exame de qualificação.

Aos professores Papa, Sony, Eunice, Denise, Fernanda e Marco Alvarenga, Meira, João do DRARV da FMVZ/UNESP – Botucatu pelo incentivo e exemplo profissional.

Aos funcionários Cristina, Valter, Edílson, Marquinhos, Marcio e “Tico” pela dedicação em todas as atividades solicitadas.

Ao funcionário Noel do setor de Patologia pela simpatia, eficiência e prontidão com que muito me auxiliou.

As funcionárias da secção de pós-graduação pela presteza no atendimento, atenção e amizade.

A Luciana Pizzani pela Revisão Bibliográfica e a Selma pela elaboração da ficha catalográfica.

A banca examinadora deste trabalho pelas sugestões importantes para a redação final desta dissertação.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos amigos de Pós-graduação: Annelise, Márcio, Alexandre, Karina e Berbeque, Camila e Zé Dell'Aqua, Marilu, Adriano, Edmilson, João "Doidão", Vivi, Fabiana, Ian, Chris Baiana pelos momentos alegres que passamos juntos.

Aos amigos da ComNet: Michel e Tathy, Ana Paula e Glauco, Lu Maria, João, Carol, Odila, Eros, Vinicius...

"Todos nós tomamos diferentes trilhas na vida, mas não importa aonde vamos, aproveitamos um pouco de cada uma em toda parte" Tim McGrew

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 01 - Porcentagem média de células queratinizadas presentes no líquido amniótico (coloração Hematoxilina-Shorr) de bezerros da raça Nelore, no momento do parto, nos grupos 01, 02 e 03.....	47
Figura 01 - Esquema ilustrativo das relações entre as membranas fetais, de um feto bovino.....	22
Figura 02 - Fotografia da colheita de líquido amniótico de bezerros no momento do parto.....	48
Figura 03 - Fotografia da Citocentrífuga (Revan® Centrifuga Ciclo Cito) do serviço de Patologia Veterinária da FMVZ/UNESP – Botucatu.....	49
Figura 04 - Fotografia da bateria de coloração Hematoxilina-Shorr do serviço de Patologia Veterinária da FMVZ/UNESP – Botucatu.....	50
Figura 05 - Fotografia da preparação da lâmina pela técnica Azul do Nilo....	51
Figura 06 - Fotomicrografia da célula intermediária pequena corada pela técnica Hematoxilina-Shorr. A: 1000x.....	52
Figura 07 - Fotomicrografia da célula intermediária grande corada pela técnica Hematoxilina-Shorr. A: 1000x.....	53
Figura 08 - Fotomicrografia da célula superficial nucleada corada pela técnica Hematoxilina-Shorr. A: 1000x.....	54
Figura 09 - Fotomicrografia da célula superficial anucleada corada pela técnica Hematoxilina-Shorr. A: 1000x.....	55
Figura 10 - Fotomicrografia da célula orangeofílica corada pela técnica Azul do Nilo. A: 400x.....	56
Figura 11 - Fotomicrografia da célula cianofílica corada pela técnica Azul do Nilo. A: 1000x.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Valores médios das enzimas presentes nos fluidos fetais de bovino.....	25
Tabela 02 - Valores médios dos eletrólitos presente nos fluidos fetais de bovino.....	26
Tabela 03 - Valores médios dos constituintes metabólicos presentes nos fluidos fetais de bovino.....	26
Tabela 04 - Valores médios de constituintes do fluido amniótico de ovinos durante três estágios de gestação.....	27
Tabela 05 - Porcentagem média dos tipos celulares presentes no líquido amniótico de bezerros da raça Nelore dos grupos 01, 02 e 03, no momento do parto.....	45
Tabela 06 - Porcentagem média de células orangeofílicas (CO) e cianofílicas (CC) presentes no líquido amniótico de bezerros da raça Nelore dos grupos 01, 02 e 03, no momento do parto.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AGV: Ácidos Graxos Voláteis

AFP: Alfa-fetoproteína

CC: Célula cianofílica

CIP: Célula intermediária pequena

CIG: Célula intermediária grande

CO: Célula orangeofílica

CQ: Células queratinizadas ou maduras

CSN: Célula superficial nucleada

CSA: Célula superficial anucleada

DNA: Acido Desoxirribonucléico

FIV: Fecundação *in vitro*

IA: Inseminação Artificial

PIV: Produção *in vitro*

PO: Puro de origem

RIA: Radioimunoensaio

RNA: Acido Ribonucléico

TE: Transferência de embrião

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
2. Revisão de Literatura.....	20
2.1. Os líquidos fetais.....	21
2.1.1.Composição.....	23
2.1.1.1. Componentes.....	25
2.1.2. Volume e características.....	28
2.1.3. Citologia.....	30
2.1.4. Funções.....	32
2.1.5. Amniocentese.....	32
2.2. Perdas embrionárias e fetais de embriões produzidos <i>in vivo</i>	33
2.3. Perdas embrionárias e fetais de embriões produzidos <i>in vitro</i>	34
3. Objetivo.....	36
4. Material e Métodos.....	38
4.1. Animais.....	39
4.1.1. Receptoras e Vacas PO.....	39
4.2. Instalações e arraçoamento.....	40
4.3. Colheita das amostras.....	40
4.4. Análises laboratoriais.....	40
4.4.1. Descongelação das amostras.....	40
4.4.2. Análise morfológica.....	40
4.4.3. Análise da maturidade fetal.....	41
4.4.4. Classificação morfológica das células do líquido amniótico.....	42
4.5. Análise estatística.....	42
5. Resultados.....	43
5.1. Análise morfológica.....	44
5.2. Análise da maturidade fetal.....	46
6. Discussão.....	58
7. Conclusão.....	62
8. Referências.....	64

RESUMO

A proposta do presente estudo foi descrever as diferenças no padrão morfológico das células do fluido amniótico, no momento do parto. Comparando os resultados obtidos de bezerros nelores oriundos de produção *in vitro*, transferência de embriões e inseminação artificial. Utilizaram-se 60 animais, divididos em Grupo 01: vinte vacas inovuladas com embriões Nelore produzidos *in vitro* (PIV) a partir de colheita de oócitos por aspiração folicular de doadoras, Grupo 02: vinte vacas gestando bezerros nelores originados de inovulações de embriões oriundos de doadoras superovuladas pelo método convencional, e Grupo 03: vinte vacas nelores PO gestando bezerros oriundos de inseminação artificial (controle). Próximo ao parto as vacas foram transferidas para piquete maternidade com acompanhamento dos partos. Durante a fase de expulsão e após a ruptura do alantocóron realizou-se a punção do âmnion para colheita de 20mL de líquido, que foi depositado em tubo plástico e congelado em freezer. Para a classificação celular as amostras, pós-descongelamento, foram centrifugadas na Citocentrífuga (Revan[®] Centrifuga Ciclo Cito) a 4000rpm durante seis minutos e empregou-se a técnica de coloração Hematoxilina-Shorr. Ao final deste procedimento, as lâminas citológicas foram montadas com lamínulas empregando Bálsamo do Canadá e posteriormente (após o período de secagem) observadas em microscópio óptico com aumentos de 200x e 400x para visualização das características morfológicas e tintoriais das células epiteliais do feto. Para avaliação da maturidade epidérmica utilizou-se a técnica de coloração de Sulfato Azul do Nilo bem como a porcentagem de células queratinizadas (coloração Hematoxilina-Shorr). As células basais e parabasais não foram encontradas nas lâminas citológicas das amostras de líquido amniótico analisadas. As células intermediárias pequenas (CIP) apresentaram-se de forma ovalada ou poligonal com citoplasma grande e núcleo central. As células

intermediárias grandes (CIG) apresentavam núcleo central e relação núcleo citoplasma maior em relação às células superficiais. Estas foram as maiores células encontradas, exibindo queratinização, com bordas angulares, possuindo núcleo picnótico (CSN) e núcleo ausente (CSA). A técnica de coloração Azul do Nilo não apresentou resultados satisfatórios para a avaliação da maturidade fetal embora haja relato do emprego desta técnica em ovinos. Em relação à maturidade epidérmica, quando avaliada pela coloração Hematoxilina-Shorr, não houve diferença estatística entre os grupos, o que é um indicativo de que não há diferenças no desenvolvimento epidérmico entre os bezerros nascidos produzidos por PIV, TE ou IA. Logo, a análise citológica do líquido amniótico deve ser interpretada em conjunto com outros parâmetros biológicos de avaliação da maturidade fetal, como a maturidade pulmonar, renal e hepática.

Palavras-chave: Líquido amniótico, PIV, TE, IA, citologia, bovinos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to describe the differences in the cytological pattern of the amniotic fluid, at the moment of delivery, comparing the data from Nelore calves obtained by *in vitro* production, embryo transfer and artificial insemination. Sixty (n=60) Nelore cows were divided in group 01: Twenty cows (n=20) pregnant with Nelore calves obtained by *in vitro* production (IVP) after follicular aspiration; group 02: Twenty cows (n=20) pregnant with Nelore calves obtained by superovulation of embryo donors (ET); group 03: Twenty Nelore cows (n=20) pregnant of calves obtained by artificial insemination (AI; control). Near to the labor, the cows were transferred to a maternal paddock, permitting delivery observation. During the expulsion phase, after the rupture of the allantochorion the amnion was punctured and 20ml of fluid were collected in a plastic device and frozen. The samples, after being thawed, were centrifuged at 4000 rpm, during 06 minutes the Hematoxilin-Shorr stain was applied, after this, the glass slides were covered with Canadian balsame and analyzed in optical microscopy. To the evaluation of the epidermal maturity were used the Blue Nile Sulfate stain, as well the percent of keratinized cells observed in the Hematoxilin-Shorr stain. The basal and parabasal cells were not found on the slides of the amniotic fluid samples analyzed. The small intermediate cells (CIP) had its shape as an oval or polygonal form with large cytoplasm and central nucleus. The large intermediate cell (CIG) showed a central nucleus and a bigger nucleus-cytoplasm relation compared to the superficial cells. These were the largest cells found. They showed keratinization with angular edges, having both a picnotic nucleus (CSN) and no nucleus at all. (CSA). The technique of Blue Nile Sulfate stain did not showed satisfactory for the evaluation of the fetal maturity, in spite of some records of the use of this technique in ovine specie. There were no statistical differences among the groups when was analyzed

the epidermal maturity by the Hematoxylin-Shorr stain, which is an indicative of the absence of differences in the epidermal development among the born calves obtained by IVP, ET and AI. Therefore the cytological analyzes of the amniotic fluid should be interpreted together to other fetal maturation biological parameters, as lung, kidney and liver maturity.

Key words: amniotic fluid, IVP, ET, AI, histology, bovine.

1. INTRODUÇÃO

Com as exigências impostas pela globalização e o aumento da competitividade, tornou-se essencial que a pecuária de corte brasileira buscasse o aumento da eficiência reprodutiva e produtiva. Sendo assim, o ganho genético nos últimos 20 anos deveu-se, basicamente, ao aumento na pressão de seleção das raças. O impulso inicial para a seleção em bovinos foi dado pela inseminação artificial (IA) e pelos programas de teste de progênie e posteriormente, pela transferência de embriões (TE). Incremento ainda maior pôde ser obtido com o desenvolvimento da técnica de produção *in vitro* (PIV) e sua incorporação ao setor produtivo.

A IA é a biotécnica da reprodução mais empregada para o melhoramento genético das espécies domésticas, em função da existência de poucos machos selecionados produzindo espermatozóides para a inseminação de centenas de fêmeas por ano. Contudo, apenas um produto pode ser obtido de cada fêmea por ano (AX, 2000).

A técnica de transferência de embriões bovinos no Brasil foi difundida a partir da década de 1980 e sua importância básica para a produção animal consiste na possibilidade de uma fêmea produzir um número de descendentes muito superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante a sua vida reprodutiva. Para o melhoramento zootécnico, ela é um importante instrumento, pois acelera e confere maior precisão no processo de seleção animal (REICHENBACH et al., 2002).

A produção *in vitro* vem apresentando avanços consideráveis e está sendo incorporada aos projetos de produção. Com o desenvolvimento do método de punção folicular, tornou-se possível à recuperação de ovócitos de

fêmeas vivas para fecundação *in vitro* (FIV), abrindo novos caminhos para a multiplicação de animais de interesse econômico e superando os atuais índices da transferência de embriões clássica no que diz respeito à produção de bezerro/vaca/ano. Essa técnica pode ser utilizada em animais jovens, senis, gestantes ou lactantes, além de animais com problemas de fertilidade adquiridos (TERVIT, 1996; GOODHAND et al., 1999; MALARD et al., 1999; TANEJA et al., 2000).

O uso comercial em larga escala e sem critérios da técnica de PIV em bovinos está sendo prejudicada pelos distúrbios observados no final da gestação, como bezerros com maior peso ao nascimento (Síndrome do bezerro gigante), gestação nitidamente prolongada, elevada incidência de abortamentos, partos prematuros, altos índices de mortalidade perinatal e aumento de anormalidades congênitas (LEIBFRIED-RUTLEDGE, 1999; WAGTENDONK-DELEEUW et al., 2000; PRESTES, 2005).

O fluido amniótico é uma fonte importante para a avaliação fetal. Uma variedade de métodos bioquímicos, citológicos, biofísicos e imunológicos permite determinar o grau de maturação pulmonar, renal e epidérmica fetal, além de anormalidades genéticas e outras doenças (KJELDSBERG & KNIGHT, 1993).

Tendo em vista, a inconsistência dos resultados, a incidência de problemas fetais ligados ao momento do parto e a escassez de pesquisas que determinem a maturidade fetal por meio da tipificação citológica do líquido amniótico comparando os diferentes sistemas de produção embrionária, este trabalho teve por objetivo, avaliar a composição citológica do fluido fetal de bezerros oriundos de IA, de TE e de PIV, na tentativa de auxiliar o

entendimento de inúmeros problemas ainda pouco conhecidos que são observados em condições de pesquisa e a campo durante seu emprego comercial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Os Líquidos fetais

A prenhez, gravidez ou gestação é um estado peculiar das fêmeas, decorrente da fecundação de um ou mais óvulos, sua nidificação, placentação e evolução até a expulsão (parto ou abortamento). Quando o zigoto sofre várias divisões mitóticas e atinge a fase de mórula, diferencia-se em duas camadas: a interna (embrioblasto) que concorre para a formação do embrião e a externa (trofoblasto) responsável pela sua nutrição. Do trofoblasto formam-se a vesícula blastodérmica, em seqüência o saco vitelino e finalmente os envoltórios fetais (GRUNERT & BIRGEL, 1989).

As membranas fetais compreendem o âmnion, saco vitelino, córion e alantóide. A placenta é formada quando o tecido fetal entra em contato, ou se funde, com o tecido materno para trocas fisiológicas (PERRY, 1981). A figura 01 é um diagrama que mostra as relações entre as membranas fetais.

“Allantoedés” e “Âmnion” são palavras originadas do grego que significam uma das membranas que reveste o embrião e a membrana que se desenvolve em torno do embrião, respectivamente (TONIOLLO & VICENTE, 1995).

Em primeiro lugar, deriva-se da ectoderme o âmnion, que envolve internamente o embrião, apresentando a mesma disposição em todas as espécies. É um saco de camada dupla que circunda completamente o feto, exceto no anel umbilical. Inicialmente está em adesão íntima com a superfície do embrião, separando e distendendo-se progressivamente à medida que há formação do líquido amniótico. Na fenda entre os folhetos do âmnion encaixa-se, como continuidade da bexiga fetal pelo canal do úraco, a bolsa alantoideana que é constituída por duas

camadas muito finas e apresenta uma topografia diferente de acordo com a espécie (DERIVAUX & ECTORS, 1984).

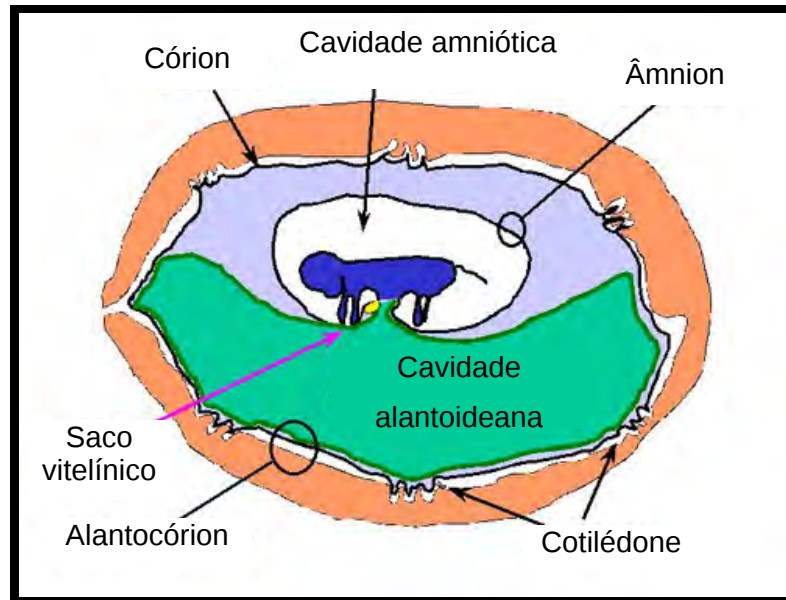


Figura 01 – Esquema ilustrativo das relações entre as membranas fetais, de um feto bovino.

Os animais domésticos possuem, nas respectivas bolsas, o líquido amniótico e o alantoideano, diferenciando-se assim do homem, que apresenta como único líquido fetal o fluido amniótico (GRUNERT & BIRGEL, 1989).

No homem os estudos do líquido amniótico só tomaram vulto e caráter científico a partir de 1950, mercê das investigações feitas por Alvarez & Caldeyro-Barcia sobre a pressão intra-amniótica e por Savis sobre o conteúdo de bilirrubina do fluido amniótico. Desde a mais remota antigüidade os autores especularam sobre sua origem. Hipócrates sugeria que o líquido amniótico formava-se às custas da urina fetal, baseando-se, provavelmente, na semelhança de suas características físicas. Harvay, em 1651, aventava a hipótese do feto interferir na renovação do líquido mediante deglutição. No século vinte, numerosas experiências feitas em animais e no próprio homem, com corantes, isótopos marcados e outros meios,

fornececeram subsídios relevantes ao conhecimento da sua dinâmica (BELFORT & ORLANDI, 1983).

Ainda hoje, a origem dos fluidos fetais (amniótico e alantoideano) e as secreções que contribuem para a formação desses são complexas. Existem pelo menos quatro locais em que podem ocorrer a absorção e a secreção: o sistema respiratório, o urinário, o digestório e a pele do concepto (TONIOLLO & VICENTE, 1995; HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A cavidade amniótica é formada cerca de 13 a 16 dias após a concepção em ovelhas e vacas e apresenta-se como um saco, de camada dupla, repleto de líquido e em íntimo contato com o feto. A cavidade alantoideana surge na segunda ou terceira semana de gestação do feto bovino, estando completamente formada entre os dias 24 a 28 após a concepção (ROBERTS, 1971).

2.1.1. Composição

O líquido amniótico e o alantoideano contêm constituintes metabólicos, eletrólitos, enzimas, hormônios, células e outras estruturas.

Os componentes dos líquidos fetais e sua relação com a viabilidade e maturidade do concepto têm sido alvo de estudos em diversas espécies. Na Medicina Veterinária a avaliação dos fluidos fetais é relatada nas espécies caprina (LOVELL et al., 1995), ovina (MELLOR & SLATER, 1974; TOMODA et al., 1987; SOUZA et al., 2000a; PRESTES et al., 2001), eqüina (PACCAMONTI et al., 1994), bubalina (SOUZA et al., 1999), suína (WU et al., 1998) e canina (BARRETO, 2002) fornecendo informações importantes sobre a fisiologia do concepto.

A concentração dos constituintes fetais é influenciada pelas trocas ocorridas através da placenta, produtos metabólicos do feto, estágio de maturidade

renal, secreção pulmonar e secreção das glândulas salivares do feto (ARTHUR, 1957).

Na composição do fluido amniótico encontram-se pêlos, células do concepto (importante para fins de amniocentese), pequenas quantidades de potássio, magnésio, glicose, creatinina, ácido úrico e uréia. Por outro lado, contém grandes quantidades de sódio, cloro, fósforo, frutose, células da placa amniótica e hormônios, podendo apresentar mecônio em caso de sofrimento fetal, sendo possível encontrar massas ovais ou discóides denominadas Boomanes constituindo-se em um agregado celular originário do “leite uterino” (BAETZ et al., 1976; ROBERTS, 1979; BASHA et al., 1980; TONIOLO & VICENTE, 1995).

O líquido alantoideano é composto pela urina fetal, logo há pequena quantidade de sódio, cloro, fósforo e glicose e altas quantidades de potássio, magnésio, cálcio, frutose, creatinina, ácido úrico e uréia (BAETZ et al., 1976; ROBERTS, 1979; BASHA et al., 1980; TONIOLO & VICENTE, 1995).

No feto ovino, a urina formada nos mesonéfrons passa para dentro da cavidade alantoideana por meio do úracó, até cerca de 90 dias de gestação. Depois disso, a urina passa em quantidades crescentes para a cavidade amniótica devido à oclusão do úracó e à franquia da uretra. Deste modo, a urina fetal forma a maior fonte de fluido amniótico na última fase da gestação em ovinos (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Bongso & Basrur (1976) afirmaram que o feto bovino elimina sua urina no saco amniótico por volta de 76 a 164 dias de gestação utilizando o canal uretral, e posteriormente a urina é transportada para o saco alantoideano por volta de 164 dias por meio do úracó. Em ovinos o fluxo de urina para a cavidade amniótica

aumenta após 80 dias de gestação, decrescendo na cavidade alantoideana gradativamente até 100 dias.

De acordo com Domingues et al. (1990) é possível mensurar alguns hormônios nos líquidos fetais como androstenediona, estradiol e testosterona. Estes autores afirmaram que a intimidade entre o líquido amniótico e o organismo fetal é grande, visto que a concentração de testosterona secretada pelos testículos do feto bovino é maior neste líquido quando comparada a valores presentes no líquido alantoideano.

Baetz et al. (1976) relataram uma relação direta entre o comprimento crânio-caudal do feto com os componentes dos fluidos fetais. Os dados deste estudo podem ser empregados para estimar a idade do feto e colaboram no diagnóstico do estado nutricional ou processos infecciosos que podem afetar o mesmo. Chalhoub et al. (2001) também correlacionaram o comprimento craniocaudal do feto com a idade gestacional por meio de ultra-sonografia, na espécie ovina.

Em algumas espécies, outras fontes podem influir sobre a quantidade e a composição do líquido amniótico, como por exemplo, secreções das glândulas salivares fetais, da mucosa bucal, dos pulmões e traquéia, intercâmbio dinâmico entre os compartimentos materno-fetal e de líquido amniótico (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

2.1.1.1. Componentes

Tabela 01 - Valores médios das enzimas presentes nos fluidos fetais de bovino.

Enzima	Líquido amniótico	Líquido alantoideano
Lactato Desidrogenase	86 ± 6	117 ± 6
Fosfatase Alcalina	$1,9 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,8$
Aspartato Aminotransferase	$5,4 \pm 0,5$	$5,4 \pm 0,7$
Creatina Fosfoquinase	$0,02 \pm 0,002$	-----

Fonte: Baetz et al., 1976.

Tabela 02 - Valores médios dos eletrólitos presentes nos fluidos fetais de bovino.

Eletrólito	Líquido Amniótico	Líquido Alantoideano
Sódio (mEq/L)	124,5 ± 1,0	49,1 ± 1,9
Potássio (mEq/L)	5,7*	32,6 ± 2,4
Cloro (mEq/L)	109 ± 1,6	19,1 ± 1,6
Cálcio (mEq/L)	2,7 ± 0,3	8,3 ± 0,8
Magnésio (mEq/L)	4,4 ± 1,6	48,7 ± 4,2
Fósforo (mMol/L)	3,71 ± 0,05	0,97 ± 0,03

* valor obtido aos 190 dias de gestação

Fonte: Baetz et al., 1976

Tabela 03 - Valores médios dos constituintes metabólicos presentes nos fluidos fetais de bovino.

Constituinte metabólico	Líquido amniótico	Líquido alantoideano
Glicose (mg/100mL)	6,8*	4,9*
Frutose (mg/100mL)	227 ± 10	472 ± 28
Piruvato (mg/100mL)	1,35 ± 0,04	1,29 ± 0,13
Lactato (mg/100mL)	27,9 ± 1,7	13,5 ± 1,2
Uréia (mg/100mL)	22,2*	24,5 ± 0,9
Creatinina (mg/100mL)	7,1 ± 0,6	131*
Ácido úrico (mg/100mL)	0,9 ± 0,2	14,2*
Proteína Total (g/100mL)	0,14 ± 0,02	0,9 ± 0,05
Colesterol (mg/100mL)	9,8 ± 0,3	6,2 ± 0,3
ÁGV (mg/100mL)	1,2 ± 0,05	1,35 ± 0,07
Tiroxina (µg/100mL)	-----	0,29*

* valor obtido aos 190 dias de gestação

Fonte: Baetz et al., 1976

Tabela 04 - Valores médios de constituintes do fluido amniótico de ovinos durante três estágios de gestação.

Constituinte	70 dias	100 dias	145 dias
pH	8,36	7,54	7,37
Glicose (g/dL)	16,06	8,58	3,79
Uréia (mg/dL)	42,68	33,53	25,49
Creatinina (g/dL)	0,85	5,04	11,25
Gama GT (UI/L)	12,58	14,20	12,30
Sódio (mMol/L)	146,50	129,42	103,85
Potássio (mMol/L)	9,79	6,15	8,65
Cloro (mMol/L)	96,59	85,28	65,35
Proteína (g/dL)	0,14	0,23	0,24

Fonte: Prestes et al., 2001.

A alfa-fetoproteína (AFP) é uma glicoproteína produzida no fígado fetal e, de modo secundário, pela vesícula vitelina que está presente nos fluidos fetais. Sua presença é elevada no início da gestação, tendendo a diminuir nos trimestres seguintes. Embora sua função fisiológica não seja completamente entendida, sabe-se que pode estar relacionada com a maturidade do concepto (BELFORT & ORLANDI, 1983; KJELDSBERG & KNIGHT, 1993). Segundo Smith et al. (1979), a concentração máxima de AFP, medida via Radioimunoensaio (RIA), nos bovinos foi obtida no plasma fetal, líquido amniótico e líquido alantoideano entre o terceiro e quarto mês de gestação, com níveis declinando até o parto. Durante toda a gestação o valor da AFP foi maior no fluido alantoideano do que no amniótico e a taxa de AFP no fluido alantoideano/amniótico foi significativamente correlacionada com a idade gestacional.

2.1.2. Volume e Características

Os volumes relativos de líquidos na cavidade amniótica e na alantoideana mostram muita variação durante a gestação. Estas variações refletem provavelmente as contribuições dos compartimentos fetal e materno. O controle é provavelmente regulado pelo sistema endócrino e pelos rins fetais (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Na vaca, o líquido amniótico predomina no terço médio da gestação, se mantém estável e nos outros períodos o alantoideano prevalece. Tem coloração variável de amarelo claro a pardo, sendo transparente e às vezes translúcido, com aspecto viscoso e volume de 2 a 8 litros. O líquido alantoideano tem coloração amarelo âmbar com aspecto transparente, consistência aquosa e volume de 4 a 15 litros (TONIOLLO & VICENTE, 1995).

De acordo com Bongso & Basrur (1976) o volume de líquido alantoideano, em vacas de 0 a 76 dias de gestação, é superior ao amniótico; de 76 a 164 dias o volume de líquido amniótico é maior do que o do alantoideano e de 164 dias até o momento do parto novamente o volume de fluido alantoideano é superior. A intensidade de coloração dos fluidos aumenta gradualmente durante a gestação. O líquido alantoideano torna-se progressivamente mais âmbar escuro no terceiro trimestre, contudo, o líquido amniótico geralmente torna-se mais translúcido. Ambos são aquosos no primeiro e segundo trimestre de gestação, já no terceiro, o fluido alantoideano torna-se semelhante à urina e o amniótico fica mais viscoso devido à secreção salivar.

Segundo Arthur (1957), a quantidade de líquido amniótico nos bovinos aumenta até 4 litros aos 170 dias de gestação e diminui para 2,4 litros no momento

do parto, por outro lado o líquido alantoideano aumenta lentamente para 3 litros aos 170 dias e então mais rapidamente para 9,6 litros no parto.

Grunert & Birgel (1989), mensurando o volume de fluidos fetais bovinos no momento do parto, encontraram valores de 3,5 e 9,5 litros para o líquido amniótico e alantoideano, respectivamente. Entretanto, Roberts (1971) afirmou que o líquido amniótico bovino varia de 2 a 8 litros, enquanto que o alantoideano apresenta 4 a 15 litros, em média.

Nos pequenos ruminantes, o líquido amniótico predomina no terço médio da gestação e nos outros momentos o alantoideano prevalece. O fluido amniótico tem coloração esbranquiçada ou amarela claro, com aspecto transparente, consistência viscosa e volume de 350 a 1200mL. O líquido alantoideano tem coloração amarela clara a âmbar, aspecto transparente, consistência aquosa e volume variando de 100 a 2000mL (TONIOLLO & VICENTE, 1995). De acordo com Souza et al. (2000a), o aspecto do fluido amniótico em ovelhas variou do amarelo claro ao límpido viscoso, sendo visto nos últimos dias da gestação. Segundo Roberts (1971), o volume do líquido amniótico e alantoideano não ultrapassam 500 e 1500mL, respectivamente.

Ao se avaliar o total de líquido deglutido por um feto ovino em 24 horas utilizando-se um cateter esofágico, Mellor & Slater (1974) observaram o volume de 568mL, caracterizado por absorção em intervalos irregulares e em grandes quantidades. Bradley & Mistretta (1973) observaram que a micção tem uma forte correlação com o volume de líquido amniótico deglutido pelo feto, pois o volume de urina produzido pelo feto ovino de 120 dias até o parto varia de 173 a 633mL por dia, similar a variação do volume deglutido de fluido amniótico.

2.1.3. Citologia

Com o evoluir da gestação, o fluido amniótico vai se enriquecendo de células epiteliais originárias da pele fetal, bem como do folheto amniótico e dos tratos respiratório, urinário e digestório fetal (SOUZA et al., 2000b).

Na literatura, preconiza-se a classificação dos tipos celulares de acordo com o tamanho, o aspecto morfológico e as propriedades tintoriais. Os componentes celulares que se tingem com corantes básicos são chamados basófilos, sendo acidófilos os que se ligam a corantes ácidos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). Segundo Bongso & Basrur (1977) a avaliação das células dos fluidos fetais (coradas pelo método Papanicolaou, 10 a 24 semanas de gestação) revelaram que a maioria das células presentes é de origem fetal e que as características peculiares podem ser utilizadas para analisar as condições do feto bovino durante a gestação.

As células das vias genito-urinárias surgem no líquido amniótico em decorrência das micções, consequência da maturação renal, estando presentes células da vagina nos conceptos femininos. Podem ainda estar presentes células do tubo digestório e das vias aéreas (PRESTES et al., 2001).

Mediante o estudo citológico do líquido amniótico e suas modificações em relação ao período gestacional, pode ser factível a determinação da maturidade do concepto. Para a visualização das células do líquido amniótico, uma das técnicas empregadas é a coloração Sulfato de Azul do Nilo. Estabeleceu-se, em humanos, a proporção de células lipídicas coradas por esta técnica, que se apresentam alaranjadas e com isso possibilitou a avaliação da maturidade fetal. A presença de uma grande quantidade de células orangeofílicas no fluido amniótico é um indicativo da maturidade das glândulas sebáceas e a porcentagem dessas células está

diretamente relacionada com a maturidade fetal (KJELDSBERG & KNIGHT, 1993). Em ovinos, essas células alaranjadas praticamente inexistem no início da gestação, aparecendo em pequena proporção no terço médio e se proliferam até o momento do parto representando cerca de 50 a 95% da população celular encontrada no líquido amniótico, com maiores valores encontrados nos fetos mais velhos revelando que a análise citológica é um bom meio para predizer a idade fetal (SOUZA et al., 2000b).

As células cianofílicas (basofílicas) pequenas e nucleadas no líquido amniótico são as mais ativas e mitóticas e podem ser utilizadas para a detecção do sexo e perfil citogenético do feto bovino. A porcentagem de células cianofílicas é significativamente maior nas fêmeas do que nos machos. Diferenças significativas, contudo, não foram encontradas para células eosinofílicas e orangeofílicas. Dessa forma, a contagem de células cianofílicas pode ser um método de determinação do sexo fetal em bovinos (BONGSO & BASRUR, 1975). Há também a possibilidade de determinação do sexo fetal, por meio de análise da cromatina sexual como demonstrado por Lyon (1961). Essa massa cromatínica, denominada de cromatina sexual, é proveniente da condensação de um dos cromossomos X das fêmeas que se encontra próximo à parede nuclear. Sua presença é, portanto, a expressão do sexo feminino (DERIVAUX & ECTORS, 1984).

Barreto (2002) e Martins & Prestes (2003) com intuito de diagnosticar a maturidade fetal, em cadelas submetidas à cesariana (distocias), classificaram as células do fluido amniótico em quatro tipos celulares empregando a técnica de coloração Hematoxilina-Shorr: I células imaturas ou profundas, II células medianamente maduras ou intermediárias, III células maduras não cornificadas e nucleadas ou superficiais e IV células hipermaturas cornificadas e anucleadas ou

escamas. Observaram a presença de escamas (IV) em uma porcentagem superior a 90% sendo um valor indicativo de um feto que se encontra em um ambiente intra-uterino, em estágio de pós-maturidade.

2.1.4. Funções

Uma rápida troca de água ocorre entre a circulação materna, a circulação fetal e o líquido amniótico, no seguinte sentido: mãe → feto → líquido amniótico → mãe. O feto pode também retirar líquido por deglutição ou por inalação, durante os movimentos respiratórios (BELFORT & ORLANDI, 1983).

As principais funções dos líquidos fetais são: proteção do feto contra traumatismos, desidratação e variações de temperatura, permitir o crescimento e movimentos fetais sem prejuízo para o útero e feto(s), evitando aderências da membrana amniótica ao concepto. Ainda pode auxiliar a dilatação cervical, vaginal e vulvar por ocasião do parto, bem como aumentar a lubrificação da via fetal facilitando a passagem do feto (TONIOLLO & VICENTE, 1995). Além dessas funções pode-se enumerar ainda que os líquidos fetais promovem justaposição do alantocórion com o endométrio no período de aderência, armazenam excretas, auxiliam a manutenção da pressão osmótica do plasma fetal e permitem ao concepto adotar situação eutócica para o parto no final da gestação (SIMÕES, 1984; GRUNERT & BIRGEL, 1989; HAFEZ & HAFEZ, 2004).

2.1.5. Amniocentese

Para obtenção de fluido fetal no ser humano o método de eleição é a amniocentese transabdominal, sendo este um procedimento seguro que pode ser realizado no ambulatório. Uma amostra adequada também pode ser colhida via

amniocentese vaginal, porém este método leva a um aumento na taxa de infecção (KJELDSBERG & KNIGHT, 1993). Em bovinos o período ideal para realização da amniocentese é de 70 a 100 dias de gestação e o volume indicado é de 15mL (ARTHUR, 1957; BONGSON & BASRUR, 1976). Em ovinos Mellor et al. (1975) indicaram a cateterização para se obter os líquidos fetais; Lovell et al. (1995) recomendaram a ultra-sonografia em caprinos como guia da via aspirativa, entre os dias 59 a 65 de gestação como técnica ideal. Contudo, é possível obter amostras no momento do parto e em matadouros, do início ao final da gestação (HERVEY & SLATER, 1967; BAETZ et al., 1976; DOMINGUES et al., 1990; WINTOUR & McFARLANE, 1993).

2.2. Perdas embrionárias e fetais de embriões produzidos *in vivo*

Pouco é conhecido sobre a incidência de abortamento em bovinos em gestações provenientes de inseminação artificial e transferência de embriões (LEIBO, 1989). Entretanto um estudo retrospectivo (KING, 1990) demonstrou que as taxas de abortamento em gestações provenientes do processo de TE, encontravam-se em torno de 5,3% para os sete primeiros meses. Uma perda adicional de 2,7% ocorreu dos sete meses até o momento do nascimento, totalizando uma perda de 8% (LEIBO, 1989). No mesmo trabalho foi observado que 13% de 223 gestações em vacas expostas a amniocentese culminaram em abortamento espontâneo.

Segundo Hubbert (1974) em bovinos, as maiores taxas de perdas durante a gestação são no período embrionário (1º ao 42º dia), quando comparadas ao período fetal (42º ao 280º dia) ou período neonatal (parto ao 28º dia de vida). Especificamente, a morte embrionária precoce entre os dias oito e dezoito responde por aproximadamente 40% de todas as perdas de gestação (AYALON, 1978;

DISKIN & SREENAN, 1980). Nesse período a perda está relacionada com o reconhecimento materno da gestação e liberação do interferon-tau (ROBERTS et al., 1999).

Na TE, diferentemente da utilização de somente IA, há a necessidade da transferência dos embriões coletados para o trato reprodutivo de fêmeas receptoras. O estabelecimento de gestações em receptoras é um evento multifatorial que envolve interações hormonais, bioquímicas e fatores fisiológicos. Os fatores que podem influenciar o sucesso das gestações em programas de transferência de embriões produzidos *in vivo* incluem sincronização do estágio de desenvolvimento embrionário com o ciclo estral de receptoras, número de embriões transferidos, qualidade dos embriões, condições fisiológicas, reprodutivas, corporal e tamanho das receptoras, a técnica de transferência empregada (HASLER et al., 1987; BETTERIDGE & LOSKUTOFF, 1993) além dos fatores ambientais bem como o estresse calórico (PUTNEY et al., 1989).

Um trabalho realizado por King (1990) revelou que as perdas fetais nos terços médio e final da gestação não foram influenciadas pela idade, qualidade do embrião, tempo entre a colheita e transferência, a assincronia entre os estros da receptora e doadora, idade da doadora, resposta ovariana ao tratamento de gonadotrofinas, ou histórico de infertilidade. As perdas embrionárias e fetais destes embriões produzidos *in vivo* podem ser devidas a causas infecciosas e não infecciosas.

2.3. Alterações embrionárias e fetais de embriões produzidos *in vitro*

Em contraste aos embriões bovinos produzidos *in vivo*, aqueles produzidos *in vitro* possuem diversas características únicas de desenvolvimento. Os

embriões machos produzidos *in vitro* tendem a se desenvolver mais rapidamente em relação aos embriões fêmeas (YOUNG & FAIRBURN, 2000). Avaliações genéticas realizadas durante o desenvolvimento embrionário não diferem na porcentagem de machos e fêmeas (50%) (AGCA et al., 1998). As mórulas produzidas *in vitro* possuem compactação menos pronunciada em relação às produzidas *in vivo*, granulações escurecidas em blastômeros e menor espaço peri-vitelínico (VAN SOON et al., 1992).

A influência do sistema de cultivo *in vitro* sobre o embrião bovino e desenvolvimento do concepto parece ocorrer logo após a transferência. Recentemente se observa um significativo aumento do tamanho do concepto detectado aos 10 dias após a transferência de blastocistos produzidos *in vitro* comparado com os produzidos *in vivo* (FARIN et al., 1999). Tal alteração pode estar relacionada a elevados níveis de progesterona (GARRET et al., 1988) e amônia (MCEVOY et al., 1999) durante o período inicial de cultivo *in vitro*. O desenvolvimento normal do feto bovino é primariamente controlado pelo genótipo fetal e, juntamente com a placenta, influenciado pelo acasalamento, sexo e número de fetos no útero e ambiente uterino (FERRELL, 1991).

As placentas resultantes de procedimentos *in vitro* têm apresentado defeitos de desenvolvimento. Problemas estes associados com a diminuição do contato materno-fetal, correlacionado a fatores histológicos e funcionais, que levam ao stress fetal. Isso causa efeitos negativos sobre as trocas gasosas e de nutrientes, resultando em abortamento (FARIN et al., 2000).

3. OBJETIVO

A proposta do presente estudo foi classificar e descrever as possíveis diferenças na citologia do fluido amniótico bem como na maturidade epidérmica do concepto, no momento do parto, comparando os resultados obtidos de bezerros da raça Nelore oriundos de transferência de embriões, de produção *in vitro* e de inseminação artificial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado junto ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária com apoio do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu/SP.

4.1. Animais

Utilizaram-se sessenta animais sendo vinte vacas da raça Nelore PO (puro de origem) e quarenta receptoras de embriões sem raça definida. Os animais pertenciam à Fazenda Monjolinho (Arandu - SP), à Fazenda Boi Verde (Avaré-SP) e à Fazenda Campininha (Avaré-SP), com sanidade comprovada e tendo recebido todas as vacinas preconizadas.

4.1.1. Receptoras e Vacas PO

Utilizaram-se quarenta receptoras de embriões e vinte vacas PO com idade variável (2 a 8 anos), sendo divididas em três grupos:

Grupo 01: vinte vacas gestando bezerros da raça Nelore PO originados de inovulações de embriões oriundos de doadoras pelo método de aspiração folicular e PIV (realizada por empresa privada especializada na técnica - Bioembryo[®]);

Grupo 02: vinte vacas gestando bezerros da raça Nelore PO originados de inovulações de embriões oriundos de doadoras superovuladas (TE realizada por empresa privada especializada na técnica - Tecgene[®]);

Grupo 03: vinte vacas da raça Nelore PO gestando bezerros oriundos de inseminação artificial (realizada pelo técnico da fazenda – considerado grupo controle).

4.2. Instalações e arraçoamento

Os animais com sanidade comprovada foram mantidos a pasto com suplementação de silagem e ração, além de água *ad libitum*. Próximo ao momento do parto, os animais foram transferidos para piquetes-maternidade.

4.3. Colheita das amostras

Todos os partos dos animais do experimento foram observados. Durante a fase de expulsão, após a ruptura do alantocórion, foi realizada a punção do âmnion (Figura 02) para a colheita de um volume variável de 15mL de líquido amniótico utilizando-se agulhas (40x12) e seringas (20mL) descartáveis da marca BD Precision Glide® e Plascalp®, respectivamente. As amostras foram depositadas em tubos plásticos (15mL) e congeladas em freezer (-18°C) para posterior análises laboratoriais.

4.4. Análises laboratoriais

4.4.1. Descongelamento das amostras

As amostras foram colocadas para descongelar em recipiente contendo água e gelo em ambiente refrigerado (24°C). Após descongelamento, realizou-se uma centrifugação¹ refrigerada a -4°C a 4000rpm durante sessenta minutos para separação do excesso de muco. Após essa centrifugação, 5mL de cada amostra foram separados para preparação das lâminas histológicas para o emprego da coloração Hematoxilina-Shorr e da Azul do Nilo.

¹ Centrífuga MLW K23

4.4.2. Análise morfológica

Devido à pequena quantidade de células nos fluidos fetais, as amostras foram novamente centrifugadas na Citocentrífuga² a 4000rpm durante seis minutos (Figura 03), no Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ/UNESP – Botucatu/SP. Após a obtenção do material sobre as lâminas histológicas foi empregada a técnica de coloração Hematoxilina-Shorr (Arruda et al., 1976; modificado por Oliveira et al., 2000), (Figura 04). Ao final deste procedimento, as lâminas histológicas, em duplicata, foram montadas com lamínula utilizando-se Bálsamo do Canadá e posteriormente, após o período de secagem, observadas em microscópio óptico com aumentos de 200x e 400x para visualização das características morfológicas e tintoriais das células epiteliais do feto. Contaram-se cem células em cada lâmina, totalizando duzentas células por amostra, com a classificação das mesmas.

4.4.3. Análise da maturidade fetal

Para avaliação da maturidade fetal empregou-se a técnica de coloração Azul do Nilo, cuja lâmina histológica foi montada com uma gota (50µL) do corante Sulfato Azul do Nilo 0,1% e uma gota (50µL) do líquido amniótico, previamente centrifugado sob refrigeração (Figura 05). Depois da homogeneização e colocação de lamínulas, foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 200x e 400x, até 10 minutos após montagem.

As células avaliadas foram classificadas em células orangeofílicas (CO) e cianofílicas (CC), em função da coloração.

² Revan® Centrífuga Ciclo Cito

Outra forma de avaliação da maturidade fetal empregada foi à contagem de células maduras ou queratinizadas (CQ) presentes no líquido amniótico. Células estas contadas após a classificação celular descrita anteriormente.

4.4.4. Classificação morfológica das células do líquido amniótico

A classificação celular baseou-se no estágio de maturação em função da afinidade tintorial. A hematoxilina é uma base que cora preferencialmente os componentes ácidos da célula com uma tonalidade azulada, como DNA, RNA, o núcleo e as regiões do citoplasma ricas em ribossomos (GARTNER & HIATT, 2003). O corante Shorr é específico de citoplasma sendo que os elementos queratinizados coram-se em vermelho/laranja enquanto que os não queratinizados em verde (OLIVEIRA et al., 2000).

As células do epitélio fetal foram classificadas em quatro tipos: intermediária pequena (CIP), intermediária grande (CIG), superficial nucleada (CSN) e superficial anucleada (CSA). Sendo que em função da coloração Hematoxilina-Shorr as células imaturas (intermediárias) foram coradas em verde e as maduras (superficiais) em laranja. Esta coloração permite visualização detalhada do citoplasma e do núcleo.

4.5. Análise estatística

A análise estatística realizada para a comparação entre as porcentagens dos diferentes tipos celulares, células orangeofílicas e cianofílicas, bem como de células queratinizadas foi o Qui-quadrado ao nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

A presença de mecônio foi detectada em 20% das amostras do grupo 01 e em 5% das amostras do grupo 02, não sendo observada sua presença no grupo 03.

5.1. Análise morfológica

Nos grupos 01, 02 e 03 não foram encontradas as células basais e parabasais nas amostras de líquido amniótico analisadas. As células intermediárias pequenas, presentes nos três grupos, mostraram-se de forma ovalada ou poligonal com citoplasma grande e núcleo central (Figura 06). As células intermediárias grandes, presentes nos três grupos, apresentavam núcleo central e uma relação núcleo/citoplasma maior que as células superficiais (Figura 07). Estas foram as maiores células encontradas e encontravam-se presentes nos três grupos. Eram queratinizadas, com bordas angulares, possuindo núcleo picnótico (Figura 08) ou ausência do mesmo (escamas) conforme observado na Figura 09. Pode-se então dividir os tipos celulares em dois grupos, sendo grupo de células imaturas (CIP e CIG) e grupo de células maduras ou queratinizadas (CSN e CSA). As células maduras foram encontradas em maior quantidade nas amostras de líquido amniótico analisadas.

Os resultados das leituras citológicas dos diferentes tipos celulares corados pelo método de Hematoxilina-Shorr estão indicados no tabela 05.

Tabela 05 - Porcentagem média dos tipos celulares presentes no líquido amniótico de bezerros da raça Nelore dos grupos 01, 02 e 03, no momento do parto.

Tipos %	Grupo 01 (PIV)	Grupo 02 (TE)	Grupo 03 (IA)
CIP	1,80 ^b (72/4000)	2,98 ^a (119/4000)	2,97 ^a (119/4000)
CIG	7,10 ^a (283/4000)	7,44 ^a (298/4000)	6,82 ^a (273/4000)
CSN	33,24 ^a (1330/4000)	24,31 ^c (972/4000)	30,65 ^b (1226/4000)
CSA	57,86 ^b (2315/4000)	65,27 ^a (2610/4000)	59,56 ^b (2382/4000)

Letras iguais na mesma linha não apresentam diferença estatística ($p < 0,05$)

Nos tipos celulares imaturos a porcentagem de CIP do grupo 01 foi significativamente menor quando comparada aos grupos 02 e 03. Enquanto que a porcentagem de CIG não apresentou diferença estatística. Nos tipos celulares maduros a porcentagem de CSN foi significativamente diferente entre os três grupos, sendo que o grupo 01 apresentou maior porcentagem e o grupo 02 a menor porcentagem de CSN. Em relação à porcentagem de CSA o grupo 02 mostrou uma porcentagem significativamente maior quando comparado aos grupos 01 e 03.

5.2. Análise da maturidade fetal

A porcentagem de células orangeofílicas (CO) e cianofílicas (CC) obtidas por meio da coloração Azul do Nilo no fluido amniótico de bezerro nos diferentes grupos encontra-se na tabela 06.

Tabela 06 - Porcentagem média de células orangeofílicas (CO) e cianofílicas (CC) presentes no líquido amniótico de bezerros da raça Nelore dos grupos 01, 02 e 03, no momento do parto.

Tipos	Grupo 01 (PIV)	Grupo 02 (TE)	Grupo 03 (IA)
%CC	97,45 ^a (3898/4000)	98,00 ^a (3920/4000)	96,60 ^b (3864/4000)
%CO	2,55 ^b (102/4000)	2,00 ^b (80/4000)	3,44 ^a (136/4000)

Letras iguais na mesma linha não apresentam diferença estatística ($p < 0,05$)

Os valores obtidos neste experimento estão abaixo dos encontrados em líquido amniótico de fetos humano, no qual um feto é considerado maduro quando a porcentagem de células orangeofílica é superior a 10%.

Conforme a tabela 06 a porcentagem de células orangeofílicas (Figura 10) do grupo 03 é significativamente maior quando comparada aos grupos 01 e 02. Em relação à porcentagem de células cianofílicas (Figura 11), foi significativamente menor no grupo 03 quando comparada aos grupos 01 e 02.

Quanto à avaliação da maturidade fetal por meio da contagem de células queratinizadas (Coloração Hematoxilina-Shorr) o gráfico 01 mostra o percentual obtido de CQ no líquido amniótico.

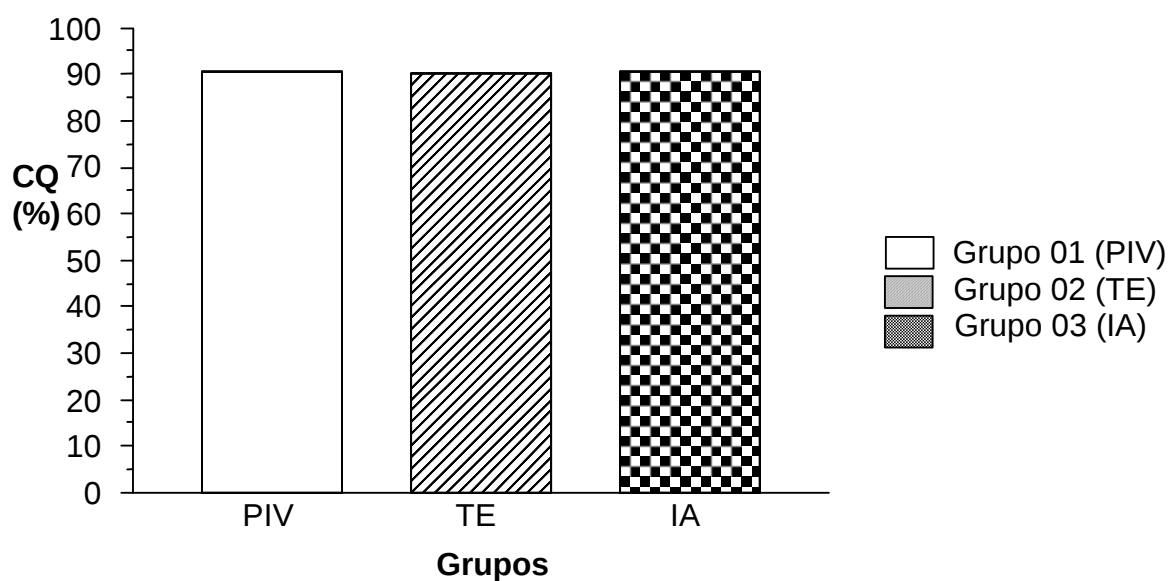


Gráfico 01: Porcentagem média de células queratinizadas presentes no líquido amniótico (coloração Hematoxilina-Shorr) de bezerros da raça Nelore, no momento do parto, nos grupos 01, 02 e 03.

Com base nos dados obtidos no gráfico 01 a porcentagem de células queratinizadas não apresentou diferença estatística nos diferentes grupos analisados ($p > 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A presença de mecônio no líquido amniótico é um indicativo de sofrimento fetal (BAETZ et al., 1976; ROBERTS, 1979; BASHA et al., 1980;). Nos grupos avaliados apenas no grupo 01 (20%) e no grupo 02 (05%) foi observado a presença de mecônio podendo ser um indicio de sofrimento fetal.

Segundo Agorastos (1979) a análise citológica do líquido amniótico (Coloração Hematoxilina-Shorr) é um modo seguro e objetivo de avaliação fetal nas ultimas semanas de gestação, em humanos. O que justifica o emprego desta coloração neste experimento. A discussão dos achados foi dificultada, pois o emprego desta mesma técnica ainda não foi descrito pela literatura em bovinos, optou-se então pela descrição das alterações encontradas confrontando com os relatos em outras espécies, incluindo o homem.

A coloração Hematoxilina-Shorr é bastante empregada na medicina humana para caracterizar a maturidade epidérmica de fetos nas últimas semanas de gestação. A determinação da maturidade fetal através da citologia do líquido amniótico está fundamentada em suas variações morfológicas ou na mudança de suas propriedades tintoriais (CUNHA et al., 1978). Esta técnica foi empregada neste experimento para tipificar os tipos celulares presentes no fluido amniótico bem como para avaliar a maturidade fetal, em bovinos, no momento do parto.

Bongso & Basrur (1975) descreveram que a identificação das células independe do estágio de gestação, sendo baseada em características morfológicas, porém existe uma correlação direta entre o número de células e o tempo de gestação. Observou-se nesse experimento que no fluido amniótico de bovinos no momento do parto existe uma pequena quantidade de células.

Barreto (2002) e Martins & Prestes (2003) com intuito de diagnosticar a maturidade fetal, em cadelas submetidas à cesariana (distocias), classificaram as células do fluido amniótico em quatro tipos celulares: I células imaturas ou profundas, II células medianamente maduras ou intermediárias, III células maduras cornificadas e nucleadas ou superficiais e IV células hiperaturas cornificadas e anucleadas ou escamas. Observaram a presença de escamas em uma porcentagem superior a 90% sendo um valor indicativo de um feto que se encontra em um ambiente intra-uterino, em estágio de pós-maturidade. Neste experimento não foram encontradas células parabasais (profundas), porém a descrição das demais células é semelhante à descrita pelos autores citados anteriormente.

Nos três grupos avaliados não houve diferença estatística em relação à porcentagem de células queratinizadas, sendo em média superior a 90%, indicando um estágio de maturidade epidérmica. Não se pode afirmar um estágio de pós-maturidade como Martins & Prestes (2003), pois os bezerros nascidos de IA (controle) não apresentaram diferença estatística em relação aos demais grupos.

Os primeiros estudos, em humanos, onde se estimava a maturidade fetal foram baseados na avaliação citológica de células de descamação fetal presentes no líquido amniótico (KJELDSBERG & KNIGHT, 1993). Com o emprego da coloração Azul do Nilo obtiveram-se dois tipos celulares ao microscópio óptico. As células coradas em azul (cianofílica) representam descamação da pele do feto e células laranjas (orangeofílica) representam descamação das glândulas sebáceas. O primeiro relato do emprego desta técnica foi realizado por Brosens & Gordon (1966). Em humanos, a maturidade é indicada quando a porcentagem de células orangeofílicas é maior que 10% (KJELDSBERG & KNIGHT, 1993). Comparando os dados obtidos neste experimento a coloração Azul do Nilo não foi um bom indicativo

de maturidade fetal em bovinos, pois as porcentagens ficaram bem abaixo de 10% (porcentagem mínima), embora os grupos tenham apresentado diferenças estatísticas entre eles. Contudo existe referência onde há classificação das células do líquido amniótico em ovinos pela coloração Azul do Nilo (Souza et al., 2000b).

7. CONCLUSÃO

Com base ao exposto anteriormente a técnica de coloração Azul do Nilo não apresentou resultados satisfatórios para a avaliação da maturidade fetal, pois apresentou porcentagem de células orangeofílicas inferior a 10%, embora haja relato do emprego desta técnica em ovinos com bons resultados.

A classificação dos tipos celulares (Hematoxilina-Shorr) presentes no líquido amniótico de bezerros no momento do parto nos diferentes grupos é semelhante à encontrada na literatura para a espécie canina.

Em relação à maturidade epidérmica quando avaliada pela coloração Hematoxilina-Shorr não houve diferença estatística entre os grupos o que é um indicativo de que não há diferenças no desenvolvimento epidérmico entre os bezerros nascidos de PIV, TE ou IA.

A análise citológica do líquido amniótico deve ser interpretada em comparação com outros parâmetros biológicos de avaliação da maturidade fetal, como a maturidade pulmonar, renal e hepática.

8. REFERÊNCIAS*¹

AGCA, Y.; MONSON, R.L.; NORTHEY, D.L.; MAZNI, O.A.; SCHAEFER, D.M.; RUTLEDGE, J.J. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation length is. **Theriogenology**, v. 50, p.147-162, 1998.

AGORASTOS, T. Antenatal estimation of fetal maturity by exfoliative cytology of amniotic fluid. **Z. Geburtshilfe Perinatol.**, v. 183.n 2, p. 118 – 127, 1979.

ARRUDA, O. B.; TOLOSA, E. M. L.; Neto, A. G. F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1976, 239p.

ARTHUR, G. H. Some notes on the quantities of fetal fluids in ruminants, with special reference to "Hidrops amnii". **Br. Vet. J.**, v. 113, p. 17 – 28, 1957.

AX, R.L. Artificial insemination. In: HAFEZ, E.S.E. & HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. Chap. 26, p. 376-389.

AYALON, N. A review of embryonic mortality in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v.54, p.483-493, 1978.

BAETZ, A. L.; HUBERT, W. T.; GRAHAM, C. K. Changes of biochemical constituents in bovine fetal fluids with gestational age. **Am. J. Res.**, v.37, p. 1047-1052, 1976.

BARRETO, C.S. **Avaliação bioquímica, citológica e do perfil eletroforético de proteínas no líquido amniótico e alantoideano de cadelas entre 30 a 40 dias de gestação e no momento da cesariana**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2002.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p. BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- BASHA, S. M. M.; BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M. Effects of conceptus on quantitative and qualitative aspects of the uterine secretion in pigs. **J. Reprod. Fertil.**, v.60, n.4, p.41-48, 1980.
- BELFORT, P.; ORLANDI, O. V. Placenta e Anexos. In: _____. **Medicina Perinatal**. São Paulo: Manole, 1983, p.14-51.
- BETTERIDGE, K.J.; LOSKUTOFF, N.M. Prospects for improving the survival rate of transferred embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.36, p.262-265, 1993.
- BONGSO, T. A.; BASRUR, P. K. Prenatal diagnosis of sex in cattle by amniocentesis. **Vet. Rec.**, v.96, n.6, p.124-126, 1975.
- BONGSO, T. A.; BASRUR, P. K. Foetal fluids in cattle. **Can. Vet. J.**, v. 17, n. 2, p. 38-41, 1976.
- BONGSO, T. A.; BASRUR, P. K. Cytology of bovine fetal fluids. **Can. J. Comp. Med.**, v. 41, n. 3, p. 287-293, 1977.
- BRADLEY, R. M.; MISTRETTA, C. M. Swallowing in foetal sheep. **Science**, v.179, p. 1016-1017, 1973.
- BROSENS, I.A.; GORDON, H. An estimation of maturity by cytological examination of the liquor amnii. **J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw**, v.73, p. 88, 1966.
- CHALHOUB, M.; PRESTES, N.C.; LOPES, M.D.; RIBEIRO FILHO, A.L.; TRINCA, L.A. Relação do comprimento craniocaudal e diâmetro do feto da vesícula embrionária/fetal com a idade gestacional por meio da avaliação ultra-sonográfica em ovinos da raça Bergamacia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.53, n.1, p.1-10, 2001.
- CUNHA, S.P.; VAELRI, F.V.; FERRAZ, S.T.A.; BAILÃO, L.A.; CARVALHO, R.L. Citologia do líquido amniótico corado pelo método de Harris-Shorr na gravidez acima da 40^a semana. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.24, n.7, p.243-245, 1978.

DERIVAUX, J.; ECTORS, F. **Fisiopatologia de la gestación y obstetrícia veterinaria**. Zaragoza (España). Acribia, 1984, p.39-43.

DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **J. Reprod. Fertil.**, v.59, p.463-468, 1980.

DOMINGUES, M. M.; LIPTRAP, R. M.; BASRUR, P. K. Foetal fluids steroids and their relationship to gonadal steroid secretion in single and twin bovine fetuses. **Theriogenology**, v.34, p.57-73, 1990.

FARIN, P.W.; STOCKBURGER, E.M.; RODRIGUEZ, K.F.; CROSIER, A.E.; BLONDIN, P.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. Placental morphology is altered following transfer of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v.53, p.474-481, 2000.

FERREL, C.L. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: II. Blood flow and nutrient flux. **J. Anim. Sci.**, v.69, p.1954-1965, 1991.

GARRET, J.E.; GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T.; MORGAN, G.L. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v.84, p.437-447, 1988.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Introdução à histologia e técnicas básicas de histologia. In:____. **Tratado de histologia em cores**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p.1-8.

GOODHAND, K.L.; WATT, R.G.; STAINES, M.E.; HUTCHINSON, J.S.M.; BROAD BENT, P.J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 951-961, 1999.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H. **Obstetrícia veterinária**. 3. ed. Porto Alegre: Sulina, 1989, 323p.

- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Gestação, fisiologia pré-natal e parto. In:____. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004, p. 141-156.
- HASLER, J.F.; MCAULEY, A.D.; LATHROP, W. F.; FOOTE, R.H. Effect donor embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 27, p.139-168, 1987.
- HERVEY, E. J.; SLATER, J. S. The source of sheep foetal fluids in the later stages of gestation. **J. Physiol.**, v. 22, p. 40 – 41, 1967.
- HUBBERT, W.T. Factors affecting survival of the bovine fetus and neonate. **Theriogenology**, v.1, p.15-34, 1974.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. A histologia e seus métodos de estudo. In:____. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 1-18.
- KJELDSBERG,C.; KNIGHT, J. Body fluids: laboratory examination of amniotic, cerebrospinal, serous and synovial fluids. In:____. **American Society of Clinical Pathologist**. 3. ed. Chicago: Theid, 1993, 387 p.
- KING, W.A. Chromosome abnormalities and pregnancy failures in domestic animals. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v.34, p.229-230, 1990.
- LEIBO, S.P. Cryopreservation of embryos. **Proc. XI Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insemin**. Dublin, v.5, p. 370–377, 1989.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. **Theriogenology**, v.51, p.473-485, 1999.
- LOVELL, K. L.; SPRECHER, D. J.; AMES, K. N.; et al. Development and efficacy of ultrasound-guide foetal fluid aspiration techniques for prenatal diagnosis of caprine beta-mannosidosis. **Theriogenology**, v, 44, p.517-527, 1995.
- LYON, M.F. Gene action in the X – chromosome of the mouse (*Mus musculus*). **Nature**, v.190, p.372, 1961.

- MALARD, P.F; CORDEIRO, D.M; PEIXER, M.A.S; PEREIRA, D.C; MARQUES JUNIOR, A.P; RUMPL, R. Índice de recuperação, qualidade e potencial de desenvolvimento de ovócito de bezerros zebuínos de 2 a 4 meses de idade – resultados preliminares. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.27, p.256, 1999.
- MARTINS, L. R.; PRESTES, N. C. Ensaio sobre exame citológico do líquido amniótico de cadelas (*Canis familiaris*) colhido no momento da cesariana. **ARS Vet.**, v. 19, n. 3, p. 294-299, 2003.
- McEVOY, T.G.; ROBIENSON, J.J.; CAROLAN, C.; STAINES, M.E.; BROADBENT, P.J.; SINCLAIR, K.D. Ovine fetal development following embryo culture in synthetic oviductal fluid with added ammonium. **Theriogenology**, v.51, p.247, 1999.
- MELLOR, D. J.; SLATER, J. S. Some aspects of the physiology of sheep foetal fluids. **Br. Vet. J.**, v. 130, p. 238 – 248, 1974.
- MELLOR, D. J.; SLATER, J. S.; MATHERSON, C. I. Effects of changes in ambient temperature on maternal plasma and allantoic fluid from chronically catheterized ewes during the last two months of pregnancy. **Res. Vet. Sci.**, v. 18, p. 219-221, 1975.
- OLIVEIRA, M.L.C.S.; MOTA, A.R.C.; VIERO, R.M. **Citotecnologia: Manual de normas técnicas**. Botucatu: Laboratório de Citologia, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, 2000, 24p.
- PACCAMONTI, D.; SWIDERSKI, C.; MARX, B. Electrolytes and biochemical enzymes in amniotic and allantoic fluid of the fetus during late gestation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 16, 1994, Minas Gerais. **Anais...** Minas Gerais, 1994, p. 7-8.
- PERRY, J.S. The mammalian fetal membranes. **J. Reprod. Fert.**, v. 62, n. 2, p. 321-335, 1981.

PRESTES, N.; CHALHOUB, M. C. L.; LOPES, M. D. Amniocentesis and biochemical evaluation of amniotic fluid in ewes at 70, 100 and 145 days of pregnancy. **Small Rumin. Res.**, v. 39, p. 277 – 281, 2001.

PRESTES, N.C. Produção in vitro de embriões bovinos – problemas e desafios – Visão obstétrica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n. 1, p. 119-124, 2005.

PUTNEY, D.J.; DROST, M.; THATCHER, W.W. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. **Theriogenology**, v.31, p.765-778, 1989.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; FILHO, A.S.S. Transferência e criopreservação de embrião bovinos. In: GOLÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002, p.127-177.

ROBERTS, S. J. Gestational period and embryology. In:____. **Veterinary obstetrics and genital diseases**. 2. ed. Michigan: Edwards Brothers, 1971, p.36 – 46.

ROBERTS, S. J. **Obstetricia veterinaria y patologia de la reproduction; teriogenologia**. Buenos Aires: Editorial Hemisfério Sur, 1979, 1021p.

ROBERTS, R.M.; EALY, A.D.; ALEXENKO, A.P.; HAN, C.S.; EZASHI, T. Trophoblast. **Placenta**, v.20, p.259-264, 1999.

SIMÕES, J.C. **Fisiologia da reprodução dos ungulados domésticos**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1984, 623p.

SMITH, K. M.; LAI, P. C.; ROBERTSON, A. A. Distribution of alpha1-fetoprotein in plasma, allantoic fluid, amniotic fluid and maternal plasma of cows. **J. Reprod. Fertil.**, v. 57, n. 1, p. 235-238, 1979.

SOUZA, H. E. M.; CARDODO, E. C.; BARNABÉ, V. H. Alterações bioquímicas dos líquidos fetais com avanço da gestação. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, p. 302-303, 1999.

- SOUZA, C.; PRESTES, N. C.; LOPES, R. S. Determinação da maturidade fetal através da análise de parâmetros físicos e bioquímicos do fluido amniótico de ovinos (*Ovis aries*), colhidos em abatedouro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2000a, p. 29.
- SOUZA, C.; PRESTES, N. C.; LOPES, R. S. Pesquisa de células orangiofílicas e aplicação do teste de Clements no fluido amniótico de ovinos (*Ovis aries*), colhidos em matadouro, em vários estágios da gestação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2000b, p. 29.
- TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; VELDE, V.; JV, J.; SCHREIBER, D.; TRIPP, M.V.; LEVINE, H.; ECHELARD, Y.; RIESEN, J.; YANG, X. Development competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal, variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biol. Reprod.**, v.62, p.206-213, 2000.
- TERVIT, H.R. Laparoscopylaparotomy oocyte recovery and Juvenile breeding. **Anim. Reprod. Sci.**, n.42, p.227-238, 1996.
- TONIOLLO, G. H.; VICENTE, W. R. R. Placentas e placentação. In: _____. **Manual de obstetrícia veterinária**. São Paulo: Livraria Varela, 1995, p.31-36.
- TOMODA, S.; BRACE, R. A.; LONGO, L. D. Amniotic fluid volume regulation: basal volumes and responses to fluid infusion withdrawal in sheep. **Am. J. Physiol.**, v. 252, p. 380-387, 1987.
- VAN SOON, A.; VAN VLAENDEREN, I.; MAHMOUDAZDEH, A.R.; DELUYKER, H.; KRUIF, A. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology**, v.38, p.905-919, 1992.
- WAGTENDONK-DELEEUW, A.E.; MULLAART, A.P; ROOS, W. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring.

In: **Annual Conference of the International Embryo Transfer Society**, 2000, Maastricht. Proceedings...Maastricht, 2000, v. 53, n.1, p. 575-597.

WINTOUR, E. M.; McFARLANE, C. Abnormalities of fetal fluids in sheep: two case reports. **Aust. Vet. J.**, v. 70, n. 10, p. 276-378, 1993.

WU, G.; POND, W. G.; OTT, T. Maternal dietary protein deficiency decreases amino acid concentrations in fetal plasma and allantoic fluid of pigs. **J. Nutr.**, v. 128, p. 894-902, 1998.

YOUNG, L.E.; FAIRBUM, H.R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, v.53, p.627-648, 2000.

APÊNDICE

➤ Coloração pelo Método de Hematoxilina-Shorr

- 1) 10 passagens em álcool 95°GL
- 2) 10 passagens em álcool 70°GL
- 3) Lavar em água corrente por 2'
- 4) 35'' na Hematoxilina
- 5) Lavar em água corrente por 10'
- 6) 10 passagens em álcool 70°GL
- 7) 10 passagens em álcool 95°GL
- 8) 10 passagens em álcool absoluto I
- 9) 10 passagens em álcool absoluto II
- 10) 6' no corante Shorr
- 11) 10 passagens em álcool 95°GL I
- 12) 10 passagens em álcool 95°GL II
- 13) 10 passagens em álcool 95°GL III
- 14) 10 passagens em álcool absoluto I
- 15) 10 passagens em álcool absoluto II
- 16) 10 passagens em álcool absoluto III
- 17) 10 passagens em Xilol I
- 18) 10 passagens em Xilol II
- 19) 10 passagens em xilol III