

MARCELO PIAGENTINI

**COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E HORMONAL DO LÍQUIDO AMNIÓTICO DE FETOS
BOVINOS ORIUNDOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA), TRANSFERÊNCIA
DE EMBRIÕES (TE) E PRODUÇÃO *IN VITRO* (PIV)**

**Tese
Doutorado**

Botucatu

2008

MARCELO PIAGENTINI

**COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E HORMONAL DO LÍQUIDO AMNIÓTICO DE
FETOS BOVINOS ORIUNDOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA), TRANSFE-
RÊNCIA DE EMBRIÕES (TE) E PRODUÇÃO *IN VITRO* (PIV)**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita”, campus de Botucatu, para obtenção
do título Doutor em Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes

Botucatu

2008

Dedicatória

Aos meus pais por tudo que fizeram por mim, pelos conselhos, pela paciência, pela lição de vida e amor.

A minha amada esposa Luciane pelo incentivo e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus filhos Guilherme “in memorian” e Miguel sempre alegre e brincalhão.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Revisão da Literatura.....	17
2.1. Membranas e líquidos fetais.....	17
2.2. Técnica de colheita para aminocentese.....	26
2.3. Perdas embrionárias e fetais de embriões produzidos <i>in vivo</i>	27
2.4. Perdas embrionárias e fetais de embriões produzidos <i>in vitro</i>	28
3. Objetivo.....	33
4. Material e Métodos.....	35
4.1. Animais.....	36
4.2. Análises laboratoriais.....	37
4.3. Análise estatística.....	38
5. Resultados.....	39
6. Discussão.....	53
7. Conclusões.....	57
8. Referências.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios de alguns constituintes do fluido amniótico ovino durante três estágios de gestação.....	23
Tabela 2 - Resultados dos parâmetros avaliados na análise bioquímica do líquido amniótico no momento do parto no grupo 01 (IA).....	41
Tabela 3 - Resultados dos parâmetros avaliados na análise bioquímica do líquido amniótico no momento do parto no grupo 02 (TE).....	42
Tabela 4 - Resultados dos parâmetros avaliados na análise bioquímica do líquido amniótico no momento do parto no grupo 03 (PIV).....	43
Tabela 5 - Média e desvio padrão dos parâmetros avaliados na análise bioquímica do líquido amniótico no momento do parto nos diferentes grupos..	44
Tabela 6 - Resultados obtidos de progesterona e testosterona do líquido amniótico no momento do parto no grupo 01.....	45
Tabela 7 - Resultados obtidos de progesterona e testosterona do líquido amniótico no momento do parto no grupo 02.....	46
Tabela 8 - Resultados obtidos de progesterona e testosterona do líquido amniótico no momento do parto no grupo 03	47
Tabela 9 - Média e desvio padrão dos parâmetros hormonais avaliados no líquido amniótico no momento do parto nos diferentes grupos.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Acompanhamento do trabalho de parto no piquete maternidade.....	49
Figura 02 - Fotografia dos kits comerciais de radioimunoensaio para dosagens de progesterona e testosterona no líquido amniótico nos três grupos.....	50
Figura 03 - Fotografia do aparelho para dosagens de proteína total, creatinina, uréia, glicose, GGT e cloreto no líquido amniótico nos três grupos.....	51
Figura 04 - Fotografia do aparelho para dosagens de sódio e potássio no líquido amniótico nos três grupos.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de Variância

Ca: Cálcio

Cl: Cloro

CIV: Cultivo *in vitro*

FIV: Fecundação *in vitro*

GGT: Gama-glutamilttransferase

IA: Inseminação Artificial

K: Potássio

Mg: Magnésio

MIV: Maturação *in vitro*

Na: Sódio

P: Fósforo

PIV: Produção *in vitro*

P4: Progesterona

PO: Puro de Origem

PT: Proteína Total

RIA: Radioimunoensaio

SRD: Sem Raça Definida

T: Testosterona

TE: Transferência de embrião

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo comparar a composição bioquímica e as concentrações de testosterona e progesterona no líquido amniótico de fetos bovino da raça Nelore produzidos por fecundação *in vivo*, fecundação *in vivo* com transferência de embrião (TE) e produção *in vitro* (PIV). Os problemas fetais observados ao momento do parto e pós-parto imediato em animais oriundos de PIV e a escassez de pesquisas que determinem a composição do líquido amniótico associada aos três sistemas de produção embrionária permitiram o desenvolvimento deste trabalho. Utilizaram-se 60 animais divididos em: grupo 01 - vacas Nelore gestando bezerros oriundos de inseminação artificial (IA) (n=20); grupo 02 - receptoras gestando bezerros Nelore provenientes de inovulações de embriões oriundos de doadoras superovuladas pelo método convencional (n=20); grupo 03 - receptoras de embriões gestando bezerros Nelore originados de inovulações de embriões oriundos de doadoras pelo método de aspiração folicular (n=20). No momento do parto, após a visualização das bolsas, colheram-se 15mL de líquido amniótico por punção da bolsa com agulha e seringa adequadas. As amostras foram processadas e analisadas no serviço de laboratório clínico do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP de Botucatu-SP e no Laboratório de Endocrinologia do departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Para análise bioquímica foram utilizados Kits comerciais seguindo a técnica recomendada pelo fabricante. A dosagem hormonal de progesterona (P4) e testosterona (T) foi determinada por meio de radioimunoensaio em fase sólida com a leitura realizada em contador Gama Count Cobra II. Os dados obtidos na avaliação bioquímica e no perfil hormonal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, uma vez demonstrada diferença estatística por

esse teste aplicou-se o Método de Tukey, com 5% de nível de significância. Os resultados obtidos na análise bioquímica no momento do parto nos três grupos foram: as médias de glicose (4,4mg/dL para IA; 6,7mg/dL para TE e 4,4mg/dL para PIV) e proteína total (0,27g/dL para IA; 0,36g/dL para TE e 0,45g/dL para PIV) não diferiram entre os três grupos; os valores de uréia dos grupos TE (38,3mg/dL) e PIV (40,3mg/dL) foram superiores ao grupo de IA (28,1mg/dL); a concentração de creatinina foi maior no grupo PIV (8,0mg/dL), porém o grupo de TE (5,9mg/dL) apresentou resultado semelhante ao grupo de IA (5,2mg/dL) e PIV; para gama-glutamyltransferase (GGT) a média do grupo IA (35,0UI/L) foi superior ao grupo de PIV (17,2UI/L), e o grupo de TE (22,6UI/L) obteve resultado similar ao grupo de IA e PIV. Em relação aos eletrólitos dosados, o sódio nos grupos IA (74,4mmol/L) e TE (77,7mmol/L) apresentou menor valor em relação grupo PIV (94,8mmol/L); a concentração média de cloreto não diferiu entre o grupo IA (101,1mmol/L) e TE (88,8mmol/L), porém esses foram superiores ao grupo PIV (63,7mmol/L) e para os valores de potássio o grupo PIV (8,3mmol/L) obteve maior média em relação ao grupo TE (3,9mmol/L) sendo que no grupo IA (5,9mmol/L) encontrou-se valor semelhante aos dois grupos. Na análise hormonal no momento do parto não foi detectada diferença significativa para as concentrações médias de testosterona e progesterona.

Palavras-chave: Líquido amniótico, análise bioquímica, dosagem hormonal, Nelore, bovino.

ABSTRACT

The present work had for objective to compare the biochemical composition and the concentrations of testosterone and progesterone in the amniotic fluid of fetuses of the Nelore cows produced by *in vivo* fecundation, *in vivo* fecundation at embryo transfer (ET) and *in vitro* production (IVP). The fetal problems observed at the delivery moment and at the immediate post-partum in animals originating from IVP and the shortage of researches that determine the composition of the amniotic fluid associated to the three systems of embryonic production allowed the development of this work, adding results to the studies that are being done by other researchers with the placenta of IVP animals. Sixty animals were used divided into 3 groups: Group 1 - Nelore cows pregnant with calves conceived by artificial insemination (AI) (n=20); Group 2 – receptor cows pregnant with Nelore calves provement from superovulation of embryo donors (n=20); Group 3 – receptor cows pregnant with Nelore calves obtained by *in vitro* production after follicular aspiration (n=20). At the delivery moment, after the visualization of the sacs, 15mL of amniotic liquid were collected by puncture. The samples were processed and analyzed in the service of clinical laboratory of the Department of Veterinary Clinic of FMVZ/UNESP of Botucatu-SP and in the Laboratory of Endocrinology of the department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology. For biochemical analysis commercial kits were used following the technique recommended by the manufacturer. The hormonal determinaton of progesterone (P4) and testosterone (T) was performed through radioimmunossay (RIA) in solid phase with the reading accomplished in accountant Gama Count Collects II. The data obtained in the biochemical evaluation and in the hormonal profile were submitted to the variance analysis (ANOVA) and, once demonstrated a statistic difference by that method the Tukey test was applied, with a

5% of level significancy. The results obtained in the biochemical analysis in the delivery moment in the three groups were: the mean concentration glucose and total protein didn't differ among the three groups; the mean values of urea of the groups ET and IVP were higher than the group of AI; the mean concentration of creatinine was higher in the group IVP, however the of the result group ET was similar to the group of AI and IVP; for gamma-glutamyltransferase (GGT) the mean of the group AI was higher than the group IVP, and the group ET showed similar result to the group of AI and IVP. In relation to the electrolytes, the mean concentration of sodium of the group AI and ET was smaller than the group IVP; the mean concentration of chloride didn't differ among the group AI and ET, however those were higher than the group IVP. The mean concentration of potassium the group IVP obtained higher than the group ET and group AI the mean concentration was similar to the two groups. There was not significant difference detected for the mean concentrations of testosterone and progesterone in the delivery moment.

Keywords: amniotic fluid, biochemical profile, hormonal concentration, Nelore, bovine

1. INTRODUÇÃO

Com as pressões 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 deve-se, basicamente, ao aumento da intensidade e acurácia da 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 no setor produtivo.

A técnica de transferência de embriões bovinos no Brasil foi difundida a partir da década de 80 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. Além disso, a TE pode ser empregada para obter descendentes de animais com distúrbios reprodutivos adquiridos sem conotação genética, impedindo em alguns casos o descarte precoce de fêmeas geneticamente superiores (REICHENBACH et al., 2002).

A produção *in vitro* (PIV) 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 oócitos de fêmeas para fecundação *in vitro* (FIV), abrindo novos caminhos para a multiplicação de animais de interesse econômico superando os atuais índices da transferência de embriões clássica no que diz respeito ao número de bezerros/vaca/ano. Esta técnica pode ser utilizada em animais jovens, senis, gestantes ou lactantes e animais com problemas

de fertilidade adquiridos (TERVIT, 1996; GOODHAND et al., 1999; MALARD et al., 1999; TANEJA et al., 2000).

O Brasil supera qualquer país do mundo nessa biotecnologia de reprodução de bovinos e a estimativa é que para cada dois nascimentos por PIV no mundo, um ocorre em território brasileiro. A PIV serve também para pesquisar fenômenos biológicos que ocorrem durante a maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de oócitos, além de eventos relacionados ao início do desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação (GONÇALVES et al., 2007).

O uso comercial em larga escala e sem critérios da técnica de PIV em bovinos podem estar relacionados a distúrbios no terço final da gestação, como bezerros com maior peso ao nascimento (Síndrome do bezerro gigante), período de gestação prolongado, aumento na incidência de abortamentos, aumento da mortalidade perinatal e aumento de anormalidades congênitas (LEIBFRIED-RUTLEDGE, 1999; WAGTENDONK-DELEEUW et al., 2000).

Tendo em vista, a inconsistência dos resultados, a incidência de problemas fetais ligados ao momento do parto e pós-parto e a escassez de pesquisas que determinem a composição do líquido amniótico comparando os diferentes sistemas de produção embrionária, este trabalho teve como objetivo, avaliar a composição bioquímica e hormonal do líquido amniótico de bezerros produzidos *in vivo*, *in vivo* com transferência de embriões e produção *in vitro*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Membranas e líquidos fetais

O útero gravídico é uma estrutura única devido a sua organização e complexidade dos seus componentes. Os pesquisadores e obstetras sempre questionaram a função dos envoltórios fetais e papel dos fluidos e seus anexos. Relatos sobre a origem, função e composição nos seres humanos fornecem informações importantes sobre a fisiologia materno-fetal (DORAN et al., 1970; WILLIAMS, 1993).

Quando o trofoblasto entra em contato ou se fixa no endométrio (17 a 20 dias) com o objetivo de realizar trocas fisiológicas, ocorre a formação da placenta e dos envoltórios fetais (28 dias), compreendendo o âmnion, saco vitelínico, alantóide e córion (PERRY, 1981).

O crescimento fetal necessita de elementos orgânicos e inorgânicos e com a análise dos fluidos fetais torna-se possível uma melhor compreensão de todo processo bioquímico que envolve a formação e o metabolismo do conceito (KJELDSBERG & KNIGHT, 1993).

Os líquidos fetais são estudados com objetivo conhecer a fisiologia da gestação, acompanhar a viabilidade fetal, determinar o sexo do feto e possíveis aberrações cromossômicas (DOMINGUES et al., 1990).

As mudanças dos constituintes bioquímicos do fluido amniótico associadas à idade gestacional em ovinos foram estudadas por Assali et al. (1968). Até os dias atuais não existem dados que descrevam totalmente a composição e as modificações do líquido amniótico na espécie bovina.

O âmnio forma-se cerca de 13 a 16 dias após a concepção em vacas e ovelhas. Torna-se uma bolsa de parede dupla que contorna completamente o feto,

exceto no anel umbilical. A membrana amniótica é transparente e consideravelmente resistente e seu conteúdo é de coloração amarelo claro a pardo e viscoso, perfazendo um volume final de 2 a 8 litros para a espécie bovina. O alantóide aparece 14 a 21 dias após a fertilização como uma protuberância do intestino embrionário posterior, e nos bovinos, a bolsa alantoideana apresenta coloração relativamente escura, com reflexos azulados e conteúdo aquoso de coloração amarelo âmbar, com aspecto transparente perfazendo um volume final de 4 a 15 litros (GRUNERT & BIRGEL, 1984).

Para a obstetrícia veterinária, os líquidos fetais são importantes por causar distensão do útero e, a partir daí, possibilitar o diagnóstico de gestação precoce por palpação retal, com 35 dias em bovinos (ARTHUR, 1969).

Na espécie bovina, Hammond (1927) relatou que ocorre um pequeno aumento no peso do fluido fetal bovino após o quinto mês de gestação. Observou um peso de 6510 gramas até o quinto mês e 6840 gramas até o oitavo mês gestacional. Bergmann (1922) citou para os mesmos períodos gestacionais 7600 gramas e 9100 gramas, respectivamente. Sweet et al. (1948) observaram pesos de 10084 gramas aos 226 dias; 11907 gramas aos 255 dias e 15536 gramas aos 276 dias.

Arthur (1957), em um estudo sobre fluidos fetais de bovino baseado no exame de fetos de 74 vacas variando entre 30 a 284 dias de gestação, definiu que a quantidade de fluido fetal aumenta progressivamente durante a gestação e o volume ao final da gestação (15 a 20 litros) pode ser até cinco vezes maior do que o encontrado ao final do quinto mês de gestação. Aumentos abruptos na quantidade total ocorrem entre 40 e 65 dias, entre 105 dias e 120 dias e entre 6,5 meses a 7,5 meses.

Além disso, os líquidos fetais permitem ao feto adotar situação eutócica para o parto (HAFEZ & HAFEZ, 2000), protegem contra traumatismo, desidratação e variações de temperatura, permitem o crescimento do feto e seus movimentos sem prejudicar o útero, promovem a dilatação do cérvix, vagina e vulva durante o parto; aumentam a lubrificação da vagina após o rompimento das bolsas facilitando a passagem do produto, apresentam papel bactericida e evitam aderências (GRUNERT & BIRGEL, 1984; PRESTES & LANDIM-ALVARENGA, 2006).

O fluido amniótico representa um meio de proteção para o feto e lhe permite, em um estado de gestação mais avançado, efetuar as rotações necessárias para a adaptação à posição mais favorável para o parto. São notórias as propriedades lubrificantes atribuídas ao fluido amniótico da gestação a termo, facilitando a passagem do feto através do canal do parto (ROBERTS, 1986). O papel mais importante é de ordem nutricional, formando parte integrante do sistema circulatório fetal. Deglutido pelo feto, entra na constituição do mecônio, contribui na produção de líquidos intra e extracelulares dos tecidos fetais e passa pela circulação sanguínea e linfática para terminar na placenta. Protege o feto contra choques externos, previne aderências e promove dilatação cervical (HAFEZ & HAFEZ, 2000).

Dentre as funções do fluido alantoideano pode-se destacar armazenamento de produtos que o feto excreta e que não se difundem para a mãe, manutenção da pressão osmótica entre a circulação materno-fetal e prevenção da desidratação do concepto (ROBERTS, 1986; HAFEZ & HAFEZ, 2000).

De acordo com Baetz et al. (1976), a unidade feto-placentária é um sistema dinâmico, com constantes trocas de água e constituintes dos fluidos fetais e a circulação materna. Os metabólitos produzidos pelo feto durante seu desenvolvimento

são eliminados por meio das trocas realizadas entre a placenta materna e a placenta do conceito.

O líquido amniótico dos animais domésticos é considerado como produto de secreção das paredes ou folhetos amnióticos, bem como pela saliva, secreção nasal do feto e, temporariamente, por urina eliminada pela uretra. O volume deste fluido é regulado por deglutição do feto e tal ocorrência é observada em todas as espécies domésticas. Os principais componentes do fluido amniótico são: mucina, pequenas quantidades de K, Mg, glicose, creatinina, lipídios e proteínas, ácido úrico e uréia. Por outro lado, contêm grandes quantidades de Na, Cl, P, frutose, hormônios (estrógeno e progesterona). O controle da excreção de sódio e potássio pela urina é regulado pelos mineralocorticóides produzidos pela glândula adrenal fetal, aumentando as concentrações de potássio e diminuindo as concentrações de sódio na urina, sendo um indicativo da maturidade renal (PRESTES et al., 2001). Segundo Evrard et al. (1997), na espécie ovina, a concentração de sódio e cloreto no líquido amniótico depende das secreções orais e nasais do feto durante a gestação.

O feto está envolto diretamente pelo fluido amniótico, por isso podem ser encontrados pêlos, células epiteliais, restos de escamação cutânea e, nos fetos traumatizados, há possibilidades da presença de mecônio (GRUNERT & BIRGEL, 1984).

O líquido alantoideano é de origem renal geralmente composto pela urina fetal, com pequenas quantidades de Na, Cl e glicose e altas quantidades de K, Mg, Ca, frutose, creatinina, ácido úrico e uréia (BAETZ et al., 1976; BASHA et al., 1980; SIMÕES, 1984; ROBERTS, 1986; HAFEZ & HAFEZ, 2000).

Segundo Strayer (1995), as proteínas são essenciais para todos os seres vivos, dentre suas funções principais estão: a catálise enzimática, transporte e ar-

mazenamento de moléculas e íons, sustentação mecânica, proteção imunitária, geração e transmissão dos impulsos nervosos e controle do crescimento da célula. As proteínas do feto são sintetizadas na placenta ou no próprio organismo a partir de aminoácidos da mãe. As membranas fetais são ativas na síntese de proteínas sendo que nos fluido fetais elas têm origem urinária.

De acordo com Hervey & Slater (1967) e Votta (1975) a creatinina é um dos elementos bioquímicos mais estudados para determinar a maturidade fetal e suas variações durante a gestação. Sua presença é explicada pela simples difusão, por diferença de gradiente, pelos corioâmnios (cordão umbilical, mucosa digestiva e mucosa bronquial) em ambas as direções. Esta é uma substância nitrogenada não protéica excretada pela filtração glomerular, que atravessa totalmente esta membrana, de onde se pode concluir que a maturidade renal aumenta sua concentração no líquido amniótico. A determinação da concentração de uréia tem sido usada na avaliação da função renal juntamente com a creatinina, tanto em medicina veterinária como na humana.

A glicose é o principal açúcar sangüíneo do feto, sendo, portanto a mais importante fonte de energia. A maior parte da glicose utilizada pelo feto é fornecida pela mãe, sendo mínima a produção endógena. Porém, o conceito pode sintetizar, pela glicogênese: frutose, galactose ou pela gliconeogênese: piruvato, lactato e alanina. A concentração de glicogênio placentário é elevada durante o início da gestação, decrescendo com o seu avanço. À medida que isto ocorre, o feto começa ter sua própria glicogênese e passa a armazenar o glicogênio na forma de reserva hepática (REZENDE & MONTENEGRO, 1995).

Baetz et al. (1976) encontraram na espécie bovina uma concentração média de 6,8mg/dL de glicose, 22,2mg/dL de uréia, 7,1mg/dL de creatinina, 0,14g/dL de proteína total, 124,5mEq/L de sódio, 5,7mEq/L de potássio e 109mEq/L de cloro no líquido amniótico de fetos oriundos de abatedouro entre 120 e 245 dias de gestação.

De acordo com Aidasani et al. (1992), na espécie caprina, o líquido amniótico apresenta uma concentração de glicose de 180,40mg/dL, de proteína total de 164,32mg/dL e de creatinina 15,88mg/dL. Contudo Chauhan et al. (1992) relataram uma concentração de 310,00mg/dL e de 20,70mg/dL de proteína total e creatinina, respectivamente, em cabras. Esses mesmos autores encontraram no líquido amniótico uma concentração média de 67,17mEq/L de sódio e de 15,33mEq/L de potássio no terço final da gestação. Prestes et al. (2001) relataram as concentrações médias dos componentes bioquímicos do líquido amniótico de fetos ovinos em três fases da gestação, conforme descrito na tabela 01.

Tabela 01: Valores médios de alguns constituintes do fluido amniótico ovino durante três estágios de gestação.

Constituintes	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

Brace et al. (2004) avaliando ovelhas de gestação simples determinaram a concentração de alguns constituintes bioquímicos do fluido amniótico como 126,6mmol/L de sódio, 5,46mmol/L de potássio, 100,9mmol/L de cloro e 0,28mmol/L de glicose. Valores semelhantes foram descritos por Gagnon et al. (2002) sendo 120,3mmol/L de sódio, 7,3mmol/L de potássio, 99,3mmol/L de cloro e 0,30mmol/L de glicose e por Dickson & Harding (1994) sendo 117,2mmol/L de sódio e 96,5mmol/L de cloro no líquido amniótico de fetos da espécie ovina no final da gestação. Esses dados sugerem que ocorrem trocas entre os fluidos fetais aumentando a osmolaridade do líquido amniótico.

Ainda em ovelhas, Mellor & Slater (1971) analisando o fluido amniótico no final da gestação, encontraram uma concentração média de 141mEq/L de sódio, 5,8mEq/L de potássio, 105mEq/L de cloro e 4,55mmol/L de uréia.

Kochhar et al. (1997) relataram que o fluido amniótico de potros no momento do parto possui, em média, 0,91g/dL de proteína total, 19,38mg/dL de creatinina, 146,00mEq/L de sódio, 9,2mEq/L de potássio e 20,1mg/dL de glicose.

Reddy et al. (1995) analisaram as mudanças bioquímicas do líquido amniótico de ovinos e atribuíram os baixos níveis de proteína no líquido amniótico à ausência de fibrinogênio e de outras proteínas ligadas ao mecanismo de coagulação sangüínea. As proteínas solúveis aumentariam significativamente do primeiro ao quarto mês de gestação. A atividade da fosfatase ácida aumentaria durante os primeiros três meses de gestação devido à liberação de íons de fósforo e a diminuição dos níveis no quarto mês ocorrendo devido à rápida utilização dos íons de fósforo para o desenvolvimento do sistema esquelético fetal (REDDY et al., 1995). Os níveis de fosfatase alcalina exibiriam uma tendência não significativa de variação durante o período gestacional. Dados similares foram encontrados em bovinos por

Baetz et al. (1976) e em humanos por Lim & Paul (1987). Níveis de aminoácidos livres no fluido amniótico aumentariam do primeiro ao terceiro mês de gestação e diminuiriam durante o terceiro mês (WALES & MURDOCH, 1973). As diferenças nos níveis totais de carboidratos presentes no líquido amniótico de ovelhas não se alterariam significativamente. O decréscimo nas concentrações de glicose observadas durante o terceiro e quarto mês de gestação poderiam ser devido ao aumento no consumo de fluido amniótico conseqüente ao desenvolvimento do reflexo de deglutição. O aumento progressivo no total de lipídeos do fluido amniótico foi evidente do primeiro ao quarto mês de gestação (REDDY et al., 1995).

Estudos sobre a esteroidogênese fetal gonadal e as concentrações de hormônios esteróides nos fluidos fetais nas diferentes espécies de animais têm sido relatados na literatura com pouca frequência (DOMINGUES et al., 1990). Bongso e Basrur (1975) relataram que a diferença na concentração de esteróides nos fluidos fetais pode ser usada para identificar o sexo fetal através da técnica de amniocentese.

De acordo com Domingues et al. (1990), os níveis de testosterona no fluido amniótico são maiores nos fetos macho em relação aos fetos fêmea durante toda a gestação. Esses pesquisadores descreveram que devido ao contato do líquido amniótico e o feto, as concentrações de testosterona secretada pelos testículos fetal são maiores nesse fluido do que no alantoideano. Essa diferença entre os fluidos se deve pela necessidade do feto macho em manter níveis elevados de testosterona, pois há grande necessidade desse hormônio durante o período de diferenciação sexual.

Maia et al. (2004) encontraram no fluido amniótico de bovino uma concentração média de testosterona de $51,80 \pm 3,62 \text{ ng/dL}$ para fetos machos e

26,60±5,40ng/dL para fetos fêmeas no terço final da gestação. A concentração média de progesterona no fluido amniótico de fetos machos foi de 1,3±0,14ng/mL e de 1,5±0,22ng/mL para fêmeas.

2.2. Técnica de colheita por amniocentese

A amniocentese, colheita do líquido amniótico por aspiração transvaginal, é um procedimento amplamente conhecido e utilizado na espécie humana, para monitorar a viabilidade e maturidade fetal, determinar precocemente o sexo do feto, para estudos placentários, para diagnóstico de anomalias cromossômicas, para estimar a maturidade pulmonar, detectar a presença de bactérias e efetuar diagnósticos de distúrbios bioquímicos (PRESTES & LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Com o advento da técnica de transferência de embriões como prática de rotina comercial em rebanhos bovinos, adicionada ao desenvolvimento da técnica de amniocentese foi possível não só fazer a determinação do sexo bem como o diagnóstico de defeitos citogenéticos no feto (GARCIA & SALAHEDDINE, 1997).

A metodologia é relativamente simples até o quarto mês de gestação (ROBERTS, 1971). Após esse período a manipulação via retal do útero e localização do envoltório fetal é dificultada.

A utilização da técnica de amniocentese requer avaliação de diversos fatores: possibilidade de danos à mãe, danos ao feto durante a gestação, complicações no período perinatal, anormalidades manifestadas durante o nascimento e acurácia do diagnóstico. Existem especulações sobre os riscos de abortamento e mal formações congênitas decorrentes da utilização da técnica, que poderiam ser mínimos com a manipulação apropriada do feto (BONGSO & BASRUR, 1975).

2.3. 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 & RALL, 1989). Entretanto um estudo retrospectivo realizado por King et al. (1985) 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%. No mesmo trabalho foi observado que 13% de 223 gestações em vacas expostas a amniocentese culminaram em abortamento espontâneo.

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) de acordo com Hubbert, (1974). Especificamente, a morte embrionária precoce entre o dia oito e dezoito de prenhez responde por aproximadamente 40% de todas as perdas gestacionais (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, além da utilização da IA, há a necessidade da transferência dos embriões colhidos 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, corporais e tamanhos das receptoras e a técnica

ca de transferência empregada (BETTERIDGE & LOSKUTOFF, 1993; HASLER et al., 1987), além dos fatores ambientais como o estresse calórico (PUTNEY et al., 1989).

Um trabalho realizado por King et al. (1985) revelou que as perdas fetais nos terços médio e final da gestação não foram influenciadas pelo estágio embrionário, qualidade do embrião, tempo entre a colheita e transferência, pela assincronia entre as receptoras e as doadoras, resposta ovariana ao tratamento de gonadotrofinas ou histórico de infertilidade. As perdas embrionárias e fetais destes embriões produzidos *in vivo* podem ser devido a causas infecciosas, como metrite e não infecciosas como cistos ovarianos e idade das doadoras.

Segundo King (1990), a frequência de anormalidades cromossômicas em embriões resultantes de TE parecem ser elevadas e são as maiores causas de perdas na gestação e podem responder por 20% do total das perdas embrionárias e fetais. Estas anormalidades cromossômicas podem ser originadas pela penetração de mais de um espermatozóide (polispermia) durante o processo de fertilização. Esse mesmo autor realizou a cariotipagem de 683 embriões bovinos, sendo que 10,4% apresentaram cariótipos anormais embora a mãe e o pai possuíssem cariótipos normais. Vinte e cinco por cento destas anormalidades foram atribuídas a erros que ocorrem durante a meiose (estresse térmico) e setenta e cinco por cento durante a fertilização. Segundo Christianson (1992), as causas não infecciosas são responsáveis por mais de 70% das perdas embrionárias.

2.4. Perdas embrionárias e fetais de embriões produzidos *in vitro*

A múltipla ovulação e TE têm sido utilizadas com êxito por vários anos para aumentar o potencial de exploração de animais de genética superior. Entretanto, não se tem verificado progresso no aumento no número de embriões de boa quali-

dade para a transferência. Sabe-se também que repetidas superovulações podem levar a problemas reprodutivos nas doadoras. Por outro lado, devido a recentes avanços na PIV, esta técnica tem sido utilizada comercialmente por algumas empresas com resultados inconstantes. O principal objetivo da PIV comercial visa a obtenção de embriões viáveis de fêmeas que não estão mais aptas a produzirem descendentes pelas técnicas convencionais, como em vacas doadoras que apresentam infertilidade provocada pelo tratamento com gonadotrofinas ou por distúrbios patológicos no sistema reprodutor feminino. Fêmeas a partir dos seis meses de idade, gestantes até o terceiro mês e mesmo pós-parto (duas a três semanas) podem ser utilizadas como doadoras na PIV. Outra vantagem da aspiração folicular guiada por ultra-sonografia na PIV está no fato de que não é necessário o uso de hormônios para a recuperação de oócitos (GARCIA et al., 2003).

Após a recuperação dos oócitos por aspiração folicular, três passos biológicos que ocorrem *in vivo* devem ser simulados *in vitro* para a produção de embriões: maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). O desenvolvimento embrionário *in vitro* é avaliado no sexto dia de cultivo visualizando-se a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocle, sendo que no sétimo dia é feita a seleção e avaliação final dos embriões para a transferência a fresco ou congelação (GARCIA et al., 2003).

Diferentes fontes de oócitos, técnicas de preparação espermática, maturação, fertilização e cultivo embrionário são fatores que influenciam diretamente o desenvolvimento, produção e qualidade embrionária (FARIN et al., 2001). As taxas de gestação com relação à produção *in vitro* de embriões podem ser bastante inconstantes. Esta inconstância está ligada à qualidade dos embriões, havendo interferência das condições de cultivo e meios usados durante todas as fases da PIV, da

avaliação subjetiva e seleção dos embriões para a transferência, além do estado reprodutivo e nutricional das receptoras. As taxas de gestação aos 60 dias têm variado, em geral, entre 40 a 60% de acordo com o sistema de produção *in vitro* utilizado pelos diferentes laboratórios (GARCIA et al., 2003).

A utilização de meios de cultivo complexos como TCM 199 associada a soro fetal bovino no cultivo de embriões bovinos é eficiente e utilizada na produção embrionária quantitativa, porém a utilização de meios mais definidos (SOF) pode ser mais eficiente para a qualidade do embrião (HASLER et al., 1995). Outros fatores podem influenciar a sobrevivência de embriões produzidos utilizando o sistema *in vitro*, incluindo a composição do meio (THOMPSON, 2000), atmosfera gasosa (WATSON et al., 1994), qualidade oocitária e genótipo embrionário (BLONDIM & SIRARD, 1995).

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* (VAN SOON et al., 1992a), granulações escurecidas em blastômeros e menor espaço perivitelínico (VAN SOON et al., 1992b).

A influência do sistema de cultivo *in vitro* sobre o embrião bovino e desenvolvimento do conceito parece ocorrer logo após a transferência. Tem-se observado um significativo aumento (2x) do tamanho do conceito detectado aos 10 dias após a transferência de blastocistos produzidos *in vitro* comparado com os produzi-

dos *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 influenciados 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, como menor número de placentônios associados com a diminuição do contato materno-fetal e prejudicando as trocas gasosas e de nutrientes, ocasionando o estresse fetal, o qual pode resultar em abortamento (FARIN et al., 2000; PRESTES, 2005).

Avelino et al. (2002) realizaram um experimento de aspiração folicular guiada por ultra-sonografia e PIV em vacas de diversas raças, obtendo uma taxa de 34,5% de gestação aos 30 dias, sendo que por meio da sexagem fetal diagnosticou-se uma incidência de 64% de machos. Houve uma taxa de mortalidade de 12% até os 60 dias de gestação, e 9% de mortalidade pós-natal com quadro de dispnéia e hipertermia. Neste experimento, esses autores observaram algumas anormalidades placentárias, como hidroalantóide e menor número de placentônios. Ao nascimento constatou-se que 13% dos bezerros nascidos vivos apresentavam mais de 50Kg de peso corporal, sendo dois destes xifópagos e um diplocéfalo. De acordo com Prestes (2005), algumas anormalidades são descritas em prenhez provenientes de embriões de PIV como gestação prolongada, anormalidades congênitas, produtos absolutos grandes e maiores taxas de abortamento e de mortalidade do neonato. Taxas de abortamento de 7 a 13% têm sido relatadas para receptoras de embriões produzidos *in vitro* no terço médio e final de gestação (HASLER, 2000) e, em alguns

trabalhos as perdas chegam a 20% ou mais (THOMPSON et al., 1998). Li et al. (2005) descreveram que a homeostase eletrolítica está comprometida em menor ou maior grau sugerindo problemas na atividade renal fetal dos produtos de PIV.

Uma vez estabelecida à gestação, as perdas durante o primeiro trimestre podem chegar a 10 a 12% (GALLI et al., 2001). Todavia, os maiores problemas parecem estar ligados ao momento do parto. Existem vários relatos descritos na literatura de prolongamento da gestação, distocia, aumento de mortalidade pré-natal e do peso corpóreo. Todas estas alterações fazem parte da “Síndrome do bezerro gigante” (YOUNG et al., 1998).

3. OBJETIVO

O objetivo do presente projeto foi avaliar a composição bioquímica e as concentrações de testosterona e progesterona dos fluído amniótico de bezerros oriundos de inseminação artificial, transferência de embriões e produção *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Colheram-se amostras de fluido amniótico de 60 animais gestantes sendo: 20 animais da raça Nelore P.O. (puro de origem) e 40 animais, receptoras de embriões sem raça definida (SRD). Os animais pertencentes à Fazenda Monjolinho (Arandu - SP), Fazenda Campininha e à Fazenda Boi Verde (Avaré-SP), de sanidade comprovada e tendo recebido todas as vacinas preconizadas, foram divididos em 03 grupos:

- Grupo 01: n=20 vacas gestantes (Nelore), bezerros oriundos de inseminação artificial (IA).
- Grupo 02: n=20 vacas gestantes (receptoras), bezerros Nelore PO originados de inovulações de embriões oriundos de doadoras superovuladas pelo método convencional (TE).
- Grupo 03: n=20 vacas gestantes (receptoras), bezerros Nelore PO originados de inovulações de embriões oriundos de doadoras pelo método de aspiração folicular (PIV).

As doadoras da raça Nelore, com idade variando entre 3 a 8 anos, foram mantidas em piquetes recebendo suplementação mineral e água *ad libitum*. Todos os procedimentos do uso da biotecnologia específica a ser utilizada foram executados por médico veterinário ou empresa privada especializada em transferência de embriões (TE) ou produção *in vitro* de embriões (PIV). As receptoras de embriões, com idade variando entre 1,5 a 4 anos, foram mantidas em piquetes recebendo silagem de milho, suplementação mineral e água *ad libitum*.

Próximo ao parto, os animais foram transferidos para piquetes-maternidade. Todos os partos dos animais do experimento foram observados (figura 01). Todos os animais do grupo PIV tiveram seus partos induzidos com 10mg de flumetazona (Flucortan[®], Fort Dodge) IM aos 285 dias de gestação, as receptoras que não responderam a essa indução receberam 10mg de dexametasona (Azium[®], Shering Pough) IM aos 292 dias. Durante a fase de expulsão e após a ruptura do alantocórion, executou-se a punção do âmnion para a colheita de um volume de 15mL de líquido utilizando-se agulhas (40x12) e seringas (20mL) descartáveis da marca BD Precision Glide[®] e Plascalp[®], respectivamente.

O material foi depositado em tubo plástico de 15mL e imediatamente congelado em freezer (-20°C) para posterior análise laboratorial.

4.2. Análises Laboratoriais

As análises bioquímicas das amostras de líquido amniótico, colhido nos três grupos, foram realizadas no laboratório clínico do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP-Botucatu. As dosagens hormonais foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da mesma instituição (figuras 02 a 04).

Para a determinação dos constituintes bioquímicos foram empregados kits comerciais seguindo a técnica recomendada pelo fabricante:

- ✓ Glicose – (mg/dL) método colorimétrico (glicose E-Celm) espectrofotômetro Celm SB - 190.
- ✓ Uréia – (mg/dL) método colorimétrico (uréia ES-Celm) espectrofotômetro Celm SB - 190.

- ✓ Creatinina – (mg/dL) método cinético (creatinina cinética – Celm) – espectrofotômetro Celm SB - 190.
- ✓ Gama-glutamyltransferase (GGT) – (UI/L) método cinético (Gama GT-Celm) espectrofotômetro Celm E-210S.
- ✓ Sódio – (mmol/L) fotometria de chama – fotômetro Celm FC-280.
- ✓ Potássio – (mmol/L) fotometria de chama – fotômetro de chama Celm FC-280.
- ✓ Cloreto – (mmol/L) método colorimétrico (cloretos – Labtest) – espectrofotômetro Celm SB - 190.
- ✓ Proteína Total – (g/dL) método colorimétrico (proteínas totais – Labtest) espectrofotômetro Celm SB - 190.

As dosagens de progesterona e testosterona no líquido amniótico foram determinadas por radioimunoensaio (RIA), utilizando-se kits comerciais em fase sólida (Diagnostic Products Corporation – DPC da MedLab) e a leitura realizada em contador Gama Count Cobra II.

4.3 Análise estatística

Os dados obtidos na avaliação bioquímica e hormonal foram analisados primeiramente pela análise de variância (ANOVA) e, uma vez demonstrada diferença estatística por esse teste aplicou-se o Método de Tukey, com 5% de nível de significância evidenciando-se quais grupos eram estatisticamente diferentes ou semelhantes.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos na análise bioquímica nos três grupos estudados estão descritos na tabela 02, 03, 04. Na tabela 05 encontram-se a média e desvio padrão dos parâmetros avaliados.

Analisando cada parâmetro, o grupo 01 obteve média significativamente inferior de uréia em relação aos grupos 02 e 03, já para valores de creatinina e sódio o grupo 03 possui maior quantidade dessas variáveis no líquido amniótico em relação ao grupo 01 ($p < 0,05$), contudo no grupo 02 os resultados foram semelhantes aos dos grupos 01 e 03 ($p > 0,05$). Para valores de glicose e PT não houve diferença significativa entre os três grupos. Quanto a variável GGT, o grupo 01 apresentou média significativamente superior ao grupo 03, e o grupo 02 obteve resultados semelhantes a ambos os grupos ($p > 0,05$). Os grupos 01 e 02 não diferiram entre si em relação ao cloreto, porém possuem média significativamente superior a do grupo 03 para essa variável. Por fim os valores de potássio no grupo 01 apresentaram-se semelhantes aos dos grupos 02 e 03, sendo que este último apresentou maior valor em relação ao grupo 02 ($p < 0,05$).

Tabela 02: Resultados dos parâmetros avaliados na análise bioquímica do líquido amniótico no momento do parto no grupo 01 (IA).

Amostras	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	PT (g/dL)	GGT (UI/L)	Cloreto (mmol/L)	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)
IA 01	53,00	15,50	2,00	0,75	87,90	101,20	83,00	4,50
IA 02	60,00	15,20	31,00	0,29	49,20	98,06	91,00	4,90
IA 03	57,00	15,70	9,00	0,27	27,40	107,00	103,00	5,40
IA 04	14,00	5,50	2,00	0,24	19,30	98,70	99,00	4,70
IA 05	14,00	3,90	5,00	1,07	54,80	86,65	92,00	3,60
IA 06	32,00	9,10	1,00	0,12	24,90	76,13	104,00	4,50
IA 07	51,00	6,50	1,00	0,08	23,70	66,33	54,00	3,10
IA 08	50,00	7,30	1,00	0,16	30,50	68,48	63,00	3,00
IA 09	25,00	13,30	3,00	0,20	15,60	66,95	76,00	7,40
IA 10	70,00	10,90	22,00	0,16	22,40	86,51	74,00	6,10
IA 11	15,00	6,40	1,00	0,44	18,70	81,01	74,00	5,00
IA 12	66,00	5,60	1,00	0,20	36,80	102,30	111,00	5,10
IA 13	40,00	13,60	3,00	0,30	16,80	130,60	107,00	5,10
IA 14	26,00	11,20	2,00	0,20	10,60	66,26	139,00	14,00
IA 15	41,00	12,00	4,00	0,30	15,00	49,91	58,00	5,60
IA 16	41,00	12,00	4,00	0,30	15,00	66,95	76,00	7,40
IA 17	25,00	13,30	3,00	0,20	15,60	53,66	66,00	7,10
IA 18	27,00	13,70	3,00	0,20	21,20	68,44	58,00	5,60
IA 19	18,00	3,20	0,00	0,10	23,70	84,00	124,00	6,00
IA 20	33,00	0,10	9,00	1,30	17,40	13,34	8,00	44,10

Tabela 03: Resultados dos parâmetros avaliados na análise bioquímica do líquido amniótico no momento do parto no grupo 02 (TE).

Amostras	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	PT (g/dL)	GGT (UI/L)	Cloreto (mmol/L)	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)
TE 01	54,00	16,10	5,00	1,43	35,50	92,50	87,00	4,80
TE 02	47,00	12,70	28,00	0,28	24,30	82,40	86,00	4,70
TE 03	53,00	14,00	26,00	0,37	10,60	87,10	78,00	4,20
TE 04	58,00	14,00	8,00	0,49	22,40	94,30	78,00	4,40
TE 05	63,00	2,00	18,00	2,41	5,60	45,30	51,00	5,80
TE 06	81,00	8,900	7,00	2,17	14,30	61,00	177,00	6,00
TE 07	51,00	4,80	2,00	0,31	31,80	80,80	110,00	3,80
TE 08	57,00	9,80	2,00	0,24	32,40	64,80	138,00	5,80
TE 09	41,00	4,10	10,00	0,33	27,40	100,60	124,00	4,80
TE 10	33,00	6,30	9,00	0,30	39,30	87,60	77,00	4,00
TE 11	74,00	11,70	3,00	0,28	64,80	109,90	100,00	8,70
TE 12	60,00	12,30	3,00	0,24	4,50	78,90	147,00	6,40
TE 13	36,00	2,00	2,00	0,09	13,10	100,60	103,00	6,80
TE 14	57,00	15,80	4,00	0,31	31,80	89,60	82,00	4,50
TE 15	24,00	9,80	10,00	0,20	8,70	47,00	50,00	6,60
TE 16	12,60	1,60	3,00	0,10	4,60	72,30	40,00	2,20
TE 17	4,40	2,40	3,00	0,10	22,00	64,80	60,00	3,20
TE 18	9,00	1,40	1,00	0,10	8,40	92,40	56,00	3,10
TE 19	5,20	2,20	6,00	0,10	13,80	72,10	54,00	2,90
TE 20	5,30	2,50	16,00	0,10	11,50	143,80	54,00	2,90

Tabela 04: Resultados dos parâmetros avaliados na análise bioquímica do líquido amniótico no momento do parto no grupo 03 (PIV).

Amostras	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	PT (g/dL)	GGT (UI/L)	Cloreto (mmol/L)	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)
PIV 01	81,00	0,20	16,00	1,70	0,60	5,59	118,00	2,80
PIV 02	37,00	11,60	12,00	0,20	18,70	95,79	122,00	7,00
PIV 03	54,00	6,80	1,00	0,30	15,60	90,55	120,00	6,30
PIV 04	53,00	8,90	2,00	0,30	30,50	89,30	123,00	6,70
PIV 05	34,00	4,60	1,00	0,30	11,20	103,20	117,00	6,30
PIV 06	64,00	11,80	8,00	0,30	10,60	80,08	105,00	6,80
PIV 07	60,00	15,10	8,00	0,70	16,60	88,71	122,00	4,30
PIV 08	62,00	12,40	2,00	0,40	22,40	81,37	11,00	8,50
PIV 09	29,00	5,70	2,00	0,20	3,10	87,19	120,00	4,50
PIV 10	15,00	3,90	1,00	0,30	33,00	91,53	125,00	5,60
PIV 11	25,00	19,20	5,00	0,50	19,90	80,08	117,00	7,50
PIV 12	38,00	8,20	10,00	0,30	17,40	89,48	120,00	4,70
PIV 13	39,00	19,20	2,30	0,60	13,10	67,01	79,00	10,80
PIV 14	47,00	9,80	1,00	0,20	6,20	90,15	121,00	7,80
PIV 15	33,00	6,60	2,00	0,20	6,90	81,19	100,00	7,60
PIV 16	33,00	6,60	2,00	0,20	6,90	81,19	100,00	7,60
PIV 17	58,00	7,50	8,00	0,30	10,00	76,81	100,00	7,00
PIV 18	43,00	6,20	1,00	0,20	3,10	102,20	136,00	7,50
PIV 19	46,00	2,60	1,00	0,10	18,10	79,94	120,00	4,80
PIV 20	40,00	5,10	1,00	0,30	3,70	77,97	121,00	6,10

Tabela 05: Média e desvio padrão dos parâmetros avaliados na análise bioquímica do líquido amniótico no momento do parto nos diferentes grupos.

Variável	Grupo			Valor de p
	01 (IA)	02 (TE)	03 (PIV)	
Uréia (mg/dL)	28,1±17,1 ^b	38,3±20,5 ^a	40,3±16,5 ^a	0,004
Creatinina (mg/dL)	5,2±4,6 ^b	5,9±4,9 ^{ab}	8,0±5,3 ^a	0,003
Glicose (mg/dL)	4,4±7,1	6,7±7,7	4,4±6,1	0,30
PT (g/dL)	0,27±0,29	0,36±0,57	0,45±0,46	0,17
GGT (UI/L)	35,0±42,9 ^a	22,6±13,0 ^{ab}	17,2±14,6 ^b	0,016
Cloreto (mmol/L)	101,1±43,5 ^a	88,8±23,8 ^a	63,7±31,5 ^b	<0,001
Sódio (mmol/L)	74,4±33,9 ^b	77,7±33,4 ^{ab}	94,8±33,6 ^a	0,015
Potássio (mmol/L)	5,9±8,1 ^{ab}	3,9±1,8 ^b	8,3±7,1 ^a	0,02

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente (Teste de Tukey, $p < 0,05$)

Na análise hormonal os valores obtidos por grupo não levou em consideração o sexo fetal. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 06, 07 e 08. Na tabela 09 encontram-se a média e erro padrão de progesterona e testosterona nos diferentes grupos. Em relação aos resultados de progesterona e testosterona não houve diferença significativa entre os grupos de IA, TE e PIV ($p > 0,05$).

Tabela 06: Resultados obtidos de progesterona e testosterona do líquido amniótico no momento do parto no grupo 01 (IA).

Amostras	Progesterona (ng/mL)	Testosterona (ng/dL)
IA 01	3,12	3,46
IA 02	22,27	6,44
IA 03	18,57	4,99
IA 04	16,21	3,74
IA 05	5,26	2,50
IA 06	4,53	5,08
IA 07	13,99	2,72
IA 08	7,12	2,32
IA 09	10,36	2,88
IA 10	13,06	14,63
IA 11	9,26	18,04
IA 12	1,27	19,52
IA 13	10,57	2,85
IA 14	1,63	5,77
IA 15	3,59	6,93
IA 16	3,04	5,46
IA 17	3,05	5,05
IA 18	3,06	20,18
IA 19	5,17	3,19
IA 20	3,80	20,51

Tabela 07: Resultados obtidos de progesterona e testosterona do líquido amniótico no momento do parto no grupo 02 (TE).

Amostras	Progesterona (ng/mL)	Testosterona (ng/dL)
TE 01	9,29	8,30
TE 02	16,68	6,53
TE 03	22,06	11,92
TE 04	2,38	6,62
TE 05	1,36	11,79
TE 06	5,94	53,97
TE 07	9,80	3,57
TE 08	2,87	3,90
TE 09	8,97	5,61
TE 10	3,36	1,99
TE 11	8,48	3,49
TE 12	11,24	5,05
TE 13	9,77	5,13
TE 14	15,83	19,29
TE 15	19,97	2,24
TE 16	2,57	10,03
TE 17	2,88	5,42
TE 18	3,71	3,20
TE 19	2,43	2,85
TE 20	2,55	3,69

Tabela 08: Resultados obtidos de progesterona e testosterona do líquido amniótico no momento do parto no grupo 03 (PIV).

Amostras	Progesterona (ng/mL)	Testosterona (ng/dL)
PIV 01	3,17	1,56
PIV 02	14,38	14,99
PIV 03	3,65	4,11
PIV 04	6,17	3,15
PIV 05	2,50	1,28
PIV 06	7,64	2,81
PIV 07	1,68	5,34
PIV 08	5,46	1,94
PIV 09	3,23	18,58
PIV 10	9,38	1,88
PIV 11	2,99	8,57
PIV 12	17,39	2,56
PIV 13	20,73	9,46
PIV 14	6,36	7,03
PIV 15	1,67	5,21
PIV 16	3,23	4,30
PIV 17	3,02	3,22
PIV 18	5,27	2,32
PIV 19	1,20	3,22
PIV 20	3,35	1,08

Tabela 09: Média e erro padrão dos parâmetros hormonais avaliados no líquido amniótico no momento do parto nos diferentes grupos.

Variável	Grupo			Valor de p
	01 (IA)	02 (TE)	03 (PIV)	
Progesterona (ng/mL)	7,9±6,1	8,1±6,3	6,1±5,4	0,51
Testosterona (ng/dL)	7,8±6,6	8,7±11,4	5,1±4,6	0,35



Figura 01: Acompanhamento do trabalho de parto no piquete maternidade.



Figura 02: Fotografia dos kits comerciais de radioimunoensaio para dosagens de progesterona e testosterona no líquido amniótico nos três grupos.



Figura 03: Fotografia do aparelho para dosagens de proteína total, creatinina, uréia, glicose, e cloreto no líquido amniótico nos três grupos.



Figura 04: Fotografia do aparelho para dosagens de GGT, sódio e potássio no líquido amniótico nos três grupos.

6. DISCUSSÃO

O valor de PT encontrado nesse experimento foi inferior, nos três grupos, em relação ao descrito por Kochhar et al. (1997) no líquido amniótico na espécie eqüina, no momento do parto, enquanto que Prestes et al. (2001) relataram na espécie ovina, valor semelhante ao do grupo IA e inferior aos grupos PIV e TE.

A creatinina é um dos elementos bioquímicos mais estudados para determinar a maturidade renal do feto e suas variações durante a gestação. Sua presença é explicada pela simples difusão, por diferença de gradiente entre o cordão umbilical, mucosa digestiva e mucosa bronquial em ambas as direções. Esta é uma substância nitrogenada não protéica excretada pela filtração glomerular, ou seja, com a maturidade renal aumenta sua concentração no líquido amniótico. A determinação da concentração de uréia tem sido usada na avaliação da função renal juntamente com a creatinina, tanto em medicina veterinária como humana (HERVEY & SLATER, 1967; VOTTA, 1975). Os valores médios de creatinina obtidos no grupo IA e TE foram inferiores aos descritos por Baetz et al. (1976), em bovinos, porém o grupo PIV apresentou uma concentração média semelhante. Contudo, Prestes et al. (2001), em ovelhas encontraram resultados inferiores aos descritos nesse experimento. Aidasani et al. (1992), em cabras e Kochhar et al. (1997), na espécie eqüina encontraram no líquido amniótico, uma concentração de creatinina superior aos descritos nos três grupos. Os valores de uréia do grupo de IA foram semelhantes aos descritos por Prestes et al. (2001), em ovelhas e por Baetz et al. (1976), em bovinos. Os resultados obtidos tanto para a creatinina quanto para a uréia para o grupo PIV sugerem que os fetos possuíam maturidade renal.

A glicose é o principal açúcar sanguíneo do feto, sendo, portanto a principal fonte de energia. A maior parte da glicose utilizada pelo feto é fornecida pelas

trocas entre a placenta fetal e a materna. A concentração média de glicose nos três grupos foi inferior ao valor relatado por Kochhar et al. (1997), na espécie eqüina, contrariando os achados de Prestes et al. (2001), na espécie ovina, uma vez que os níveis de glicose nos grupos de PIV, TE e IA do presente trabalho foram superiores. A ausência de diferença entre os grupos analisados indicam que as trocas materno-fetais foram semelhantes em relação à passagem de glicose.

A gama-glutamilttransferase (GGT) é uma enzima que encontrada em grandes concentrações no rim, fígado e pâncreas, participando no metabolismo como mediadora de várias funções fisiológicas, como os leucotrienos e as prostaglandinas. Em relação à concentração média de GGT, nesse experimento os grupos de PIV, TE e IA apresentaram maiores valores do que os encontrados por Prestes et al. (2001), na espécie ovina.

O controle da excreção de sódio e potássio pela urina é regulado pela aldosterona produzida pela glândula adrenal fetal, aumentando as concentrações de potássio e diminuindo as concentrações de sódio na urina, sendo um indicativo da maturidade renal. A concentração de sódio e cloreto no líquido amniótico dependa das secreções oronasais do feto durante a gestação (EVRARD et al., 1997). Brace et al. (2004) encontraram no líquido amniótico de ovelhas, no final da gestação, uma concentração de sódio superior às concentrações descritas nos três grupos, o mesmo pode ser observado no experimento realizado por Evrard et al. (1997), Prestes et al. (2001) e Gagnon et al. (2002) na espécie ovina e por Kochhar et al. (1997) na espécie eqüina.

A concentração de potássio descrita por Brace et al. (2004), na espécie ovina, foi semelhante a do grupo IA, superior a do grupo de TE e menor do que a concentração do grupo PIV, embora Prestes et al. (2001), na espécie ovina, relata-

ram valor superior aos três grupos. Comparando o valor de potássio encontrado por Gagnon et al. (2002), no líquido amniótico de feto, no final da gestação na espécie ovina, o grupo PIV apresentou uma concentração maior, enquanto que os grupos TE e IA apresentaram concentrações menores, fato similar foi demonstrado por Kochhar et al. (1997) na espécie eqüina.

A dosagem de cloreto descrita por Brace et al. (2004), na espécie ovina, foi semelhante ao grupo IA e superior os resultados dos grupos TE e PIV. Contudo Gagnon et al. (2002), na espécie ovina, encontraram uma menor concentração de cloreto em relação ao grupo IA, e uma concentração superior aos grupos PIV e TE. Já no experimento realizado por Prestes et al. (2001), na espécie ovina, o valor de cloreto foi inferior aos obtidos aos grupos de IA e TE e superior ao grupo PIV contrariando os achados de Evrard et al. (1997) que obtiveram valor de cloreto superior aos três grupos na espécie ovina.

Os valores médios de testosterona encontrados nos três grupos desse experimento foram inferiores ao descrito por Maia et al. (2004), sendo $51,80 \pm 3,62 \text{ ng/dL}$ para machos e $26,60 \pm 5,40 \text{ ng/dL}$ para fêmeas, apesar de que em nosso estudo não foi levado em consideração o sexo do produto. Por outro lado a concentração média de progesterona descrita nesse experimento foi superior a concentração relatada por esse mesmo grupo de pesquisadores, $1,3 \pm 0,14 \text{ ng/mL}$ para machos e $1,5 \pm 0,22 \text{ ng/mL}$ para fêmeas.

7. CONCLUSÕES

As conclusões obtidas em relação à análise bioquímica do líquido amniótico de bezerros no momento do parto foram:

- Uréia e creatinina: comparando-se os três grupos observou-se que o grupo PIV obteve maiores valores desses dois metabólitos indicando que a maturidade renal desses produtos está adequada.
- GGT: o grupo 03 apresentou menor valor em relação ao grupo 01. Esta enzima está relacionada ao metabolismo, podendo-se inferir que a atividade metabólica está elevada nos animais de PIV.
- Glicose: A glicose oriunda da circulação materna é a principal fonte de energia para o feto durante uma gestação normal. Como os valores não diferiram entre os grupos, sugere-se que as trocas materno-fetais foram apropriadas para o fornecimento de energia ao feto.
- Eletrólitos: o cloreto apresentou menor concentração no grupo 03. O sódio e potássio foram encontrados em maior quantidade no grupo 03 em relação aos demais grupos.

Não houve diferença entre os grupos estudados para os valores de testosterona e progesterona.

8. REFERÊNCIAS¹

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.

AIDASANI, R.; CHAUHAN, R.A.S.; TIWARI, S; SHUKLA, S.P. Some metabolic constituents of caprine foetal fluids and foetal serum. **Indian J. Anim. Sci.**, v.62, p.335-336, 1992.

ARTHUR, G.H. Some notes on the foetal fluids of ruminants with special reference to hydrous amnion. **Br. Vet. J.**, v.113, p.17, 1957.

ARTHUR, G.H. The fetal fluids of domestic animals. **J. Reprod. Fert.**, v.9, p.45-52, 1969.

ASSALI, N.S.; DILTS, P.V.; PLENTL, A.A.; KIRSCHBAUM, T.H.; GROSS, S.J. Physiology of the placenta. III. Dynamics of Amniotics fluid. In: ASSALI, N.S. **Biology of gestation.**, New York: Academic Press, London, 1968. p.273-281.

AVELINO, K.B.; VANTINI, R.; SENEDA, M.M. In vitro production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**, v.57, p.656, 2002.

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

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

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

BASHA, S.M.M.; BAZER, F.W.; ROBERTS, R.M. Effects of the conceptus on quantitative and qualitative aspects of the uterine secretion in pigs. **J. Reprod Fertil.**, v.60, p.41-48, 1980.

BERGMANN, R. Beitrage zur Altersbestimmung von Kalbsfoten der schwarzbunten Neiderungsrasse. **Arch. Wiss. Prakt**, v.47, p. 292, 1922.

BETTERIDGE, K.J.; LOSKUTOFF, N.M. Prospects for improving the survival rate e of transferred embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.36, p.262-265, 1993.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v.41, p.54-62, 1995.

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.

BRACE, R.A.; VERMIN, L.M.; HUIJSSOON, E. Regulation of amniotic fluid volume: intramembranous solute and volume fluxes in late gestation fetal sheep. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.191, p.837-846, 2004.

CHAUHAN, R.A.S.; TIWARI, S.; DATTA, I.C. Changes in the volume and biochemical constituents of caprine foetal fluids with gestational age. **Indian J. Anim. Res.**, v.13, p.72-74, 1992.

CHRISTIANSON, W.T. Stillbirths, mummies, abortions, and early embryonic death. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.8, p.623-639, 1992.

DICKSON, K.A.; HARDING, R. Role of fetal sac fluids during maternal water deprivation in sheep. **Exp. Physiol.**, v.79, p.147-160, 1994.

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.

DORAN, T.A.; BJERRE, S.; PORTER, C.J. Creatinine, uric acid and electrolytes in amniotic fluid. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.106, p.325-332, 1970.

EVARD, V.; DEPREST, J.; LERUT, T.; VANDENBERGHE, K.H.; FLAGEOLE, H. Intra-uterine tracheal obstruction decreases amniotic fluid sodium and chloride concentration in the fetal lamb. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.176, p.171, 1997.

FARIN, P.W.; FARIN, C.E.; CROSIER, A.E.; BLONDIN, P.; ALEXANDER, J.E. Effect of in vitro culture and maternal insulin-like growth factor-I on development of bovine conceptuses. **Theriogenology**, v.51, p.238, 1999.

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, 2000.

FARIN, P.W.; CROSIER, A.E.; FARIN, C.E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v.55, p.151-170, 2001.

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.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v.55, p.1341-1357, 2001.

GAGNON, R.; HARDING, R.; BRACE, R.A. Amniotic fluid and fetal urinary responses to severe placental insufficiency in sheep. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.186, n.5, p.1076-1084, 2002.

GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Bovine ultrasound-guided transvaginal amniocentesis. **Theriogenology**, v.47, p.1003-1008, 1997.

GARCIA, J.M.; YAMAZAKI, W.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R.; SENEDA, M.M.; ESPER, C.R. Produção *in vitro* de embriões bovinos: aspectos técnicos e comerciais. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.27, p.60-64, 2003.

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.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.31, n.2, p.212-217, 2007.

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.D. Fisiologia da prenhez. In: GRUNERT, E. **Obstetrícia veterinária**. 2.ed. Porto Alegre: Sulina, 1984. p.27-60.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Gestation, prenatal physiology and parturition. In:__. **Reproduction in farm animals**. 7.ed. Philadelphia: Lippincott, 2000. p.148-159.

HAMMOND, J. Physiology of reproduction in the cow. **Cambridge University Press**, London, 1927.

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.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MCLULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v.43, p.141-152, 1995.

HASLER, J.F. In vitro culture of bovine embryos in Menezo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. **Anim Reprod. Sci.**, v.60-61, p.81-91, 2000.

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.

KING, K.K.; SEIDEL Jr.; G.E.; ELSDEN, R.P. Bovine embryo transfer pregnancies. I. Abortion rates and characteristics of calves. **J. Anim. Sci.**, v.61, p.747-757, 1985.

KING, W.A. Chromosome abnormalities and pregnancy failures in domestic animals. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v.34, p.229-230, 1990.

KJELDSBERG, C.; KNIGHT, J. Body fluid: laboratory examination of amniotic, cerebrospinal, serum and synovial fluids. Chicago: **American Society Clinical Pathology**, 1993, 387p.

KOCHHAR, H.P.S.; SIMRAN, P.S.; NANDA, A.S.; KAUR, R. Comparative biochemical indices of fetal fluids in normal foaling stressful delivery in Indian Thoroughbred mares. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 17, n.4, p.206-209, 1997.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. **Theriogenology**, v.51, p.473-485, 1999.

LEIBO, S.P. RALL, W.F. Prenatal diagnosis of sex in bovine fetuses by amniocentesis. **Theriogenology**, v.33, n.2, p. 531–552, 1989.

LIM, S.F.; PAUL, L.H. High molecular mass alkaline phosphatase in amniotic fluid properties and relationship with lamellar body phospholipid. **Bio.**, v.84, p.73-77, 1987.

LI, N.; WELLS, D.N.; PETERSOM, A.J.; LEE, R.S. Perturbations in the biochemical composition of fetal fluids are apparent in surviving bovine somatic cell nuclear transfer pregnancies in the first half of gestation. **Biol. Reprod.**, v.73, p.139-148, 2005.

MAIA, M.; OBA, E.; FERNANDES, C.E.S.; GOMES, G.M.; GIOSO, M.M.; SARTORELLI, E.S.; PRESTES, N.C. Concentração dos hormônios esteróides no plasma sanguíneo fetal e nos líquidos amniótico e alantoideano no terço inicial, médio e final da gestação de vacas. **ARS Vet.**, v.20, n.3, p.353-360, 2004.

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.

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. Daily changes in amniotic and allantoic fluid during the last three months of pregnancy in conscious, unstressed ewes, with catheters in their foetal fluid sac. **J. Physiol.**, v.217, p.573-604, 1971.

PERRY, J.S. The mammalian fetal membranes. **J. Reprod. Fertil.**, v.62, p.321-335, 1981.

PRESTES, N.C.; 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 Ruminant Res.**, v.39, p. 277-281, 2001.

PRESTES, N.C. In vitro production of bovine embryos an obstetric overview of problems and challenges. **Acta Sci. Vet.**, v.33, p.119-124, 2005.

PRESTES, N.C; LANDIM-ALVARENGA, F.C. **Medicina veterinária – obstetrícia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006. 241p.

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.

REDDY, A.P.; REDDY, V.S.C.; RAO, A.S.; SHARMA, G.P.; REDDY, G.V.N.; REDDY, T.J.; REDDY, V.S. Biochemical studies in the ewe (*Ovis aries*) amniotic fluid during different phases of gestation. **J. Anim. Sci.**, v.10, p.321-323, 1995.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE J.C.O. 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.

REZENDE, J.; MONTENEGRO, C.A. Trocas materno-ovulares. In: REZENDE, J. **Obstetrícia**. 7.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1995. p.77-89.

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. **Veterinary obstetrics and genital diseases**. 3ed. Ann Arbor: Edward Brothers, 1986. 981p.

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.

STRAYER, L. **Biochemistry**. 4.ed. New York: W.H. Freeman, 1995. p.1064.

SWETT, W.W.; MATTHEWS, C.A.; FOHRMAN, M.H. Development of the foetus in the dairy cow. **Tech. Bull. U.S. Dep. Agric.**, n.964, 1948.

TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; VAN DE VELDE, A.; JU, J.C.; 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. **An. Reprod. Sci.**, n.42, p.227-238, 1996.

THOMPSON, J.G.; ALLEN, N.W.; MCGOWAN, L.T.; BELL, A.C.; LAMBERT, M.G.; TERVIT, H.R. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture

medium on bovine embryo development in vitro and following transfer.

Theriogenology, v.49, p.1239-1249, 1998.

THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos a decade of achievement. **An. Reprod. Sci.**, v.60, p.263-275, 2000.

VAN SOON, A.; KRUIF, A. Comparative study of in vivo and in vitro derived bovine embryos. **Proceedings...** 12th Int. Congr. Anim. Reprod., v.3, p.1363-1365, 1992a.

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, 1992b.

VOTTA, R.A. Aplicaciones clínicas del estudio de la creatinina del líquido amniótico. In: _____. **Investigaciones clínicas al conocimiento del estado fetal**. México: Panamericana, 1975. p. 59-63.

YOUNG, L.E.; SINCLAIR, K.D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev. Reprod.**, v.3, p.155-163, 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.

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.

WALES, R.G.; MURDOCH, R.N. Changes in the composition of sheep foetal fluids during early pregnancy. **J. Reprod. Fertil.**, v.33, p.197-205, 1973.

WATSON, A.J.; WATSON, P.H.; WARNES, D.; WALKER, S.K.; ARMSTRONG, D.T.; SEAMARK, R.F. Pre-implantation development of in vitro-matured and in vitro-fertilized- ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell minelayers and culture under low oxygen atmospheres. **Biol. Reprod.**, v.50, p.715-724, 1994.

WILLIAMS, K. Amniotic fluid assessment – review. **Obstet. Gynecol. Surv.**, v.48, p.795-800, 1993.