

Morfologia ovariana em novilhas bubalinas terminadas em confinamento em função do uso de promotor de crescimento ou esferas de chumbo no útero

Karina Perehouskei Albuquerque¹, Jair de Araújo Marques², Ivanor Nunes do Prado^{1*}, Erica Kutsunugi¹ e Rosa Maria Gomes de Macedo³

¹Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

²Centro Integrado de Ensino Superior, Campo Mourão, Paraná, Brasil. ³Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Universidade Estadual de Maringá. *Autor para correspondência: inprado@uem.br

RESUMO. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de promotor de crescimento (Synovex-H® - 20mg de Benzoato de estradiol e 200mg de testosterona) e 100 esferas de chumbo no útero sobre a atividade ovariana de novilhas bubalinas em confinamento e alimentadas *ad libitum*. Foram utilizadas 20 novilhas bubalinas da raça Murrah, com peso vivo médio de 350kg e 16 meses de idade, distribuídas ao acaso em 3 tratamentos: novilhas vazias (VAZ), novilhas com promotor de crescimento (PRC) e novilhas com esferas de chumbo (CHU) introduzidas no útero. As novilhas foram pesadas a cada 28 dias. Ao final do experimento, foram abatidas, e o aparelho reprodutor coletado. Os úteros foram analisados macroscopicamente. Os ovários foram cortados longitudinalmente e fixados em líquido de Bouin por 24 horas para análises microscópicas. Posteriormente, os ovários foram incluídos em parafina e cortados com 5µm de espessura e submetidos à técnica de coloração Hematoxilina-Eosina, para identificação do desenvolvimento folicular. Nos tratamentos VAZ e CHU, as análises macroscópicas dos úteros não diferiram entre si, apresentando aspecto normal. No tratamento PRC, foi observada uma musculatura mais espessa, maior tamanho e coloração mais escura. As esferas de chumbo não interferiram na atividade ovariana. Isso deve ter ocorrido porque as esferas de chumbo não permaneceram no interior do útero, com exceção de um animal que apresentou esferas de chumbo. Nesse caso, o útero apresentava aspecto edemaciado. Nas observações microscópicas, constatou-se atividade ovariana nos três tratamentos.

Palavras-chave: búfalas, confinamento, ovário, reprodução.

ABSTRACT. Ovary morphology of buffalo heifers fattened in feed lot in response of the utilization of growth promoter or leads sphere introduced in the uterus. The objective of this work was to evaluate the hormonal implant use (Synovex-H® - 20mg of benzoate of estradiol and 200mg of testosterone) and 100 lead spheres in the uterus on the ovary activity of buffalo heifers in feed lot. Twenty buffalo heifers of breed Murrah were used, with live weight of 350kg and 16 months of age, distributed at random in three treatments: empty heifers (EMH), heifers with growth promoter (GPR) and heifers with lead sphere (LEA) introduced in the uterus. The heifers were weighed each 28 days. At the end of the experiment, the heifers were slaughtered and the reproductive system was collected. The uterus was analyzed microscopically. The ovaries were longitudinally cut and fixed in Bouin liquid for 24 hours to microscopic analyses. After, the ovaries were included in paraffin and cut with 5µm of thickness and submitted to the Hematoxylin-Eosin color technique for identification of follicular development. In the treatments EMH and LEA the uterus microscopic analyses did not present differences between themselves, presenting normal aspect. In the treatment GPR, it was observed thicker muscles, bigger size and darker color. In addition, the lead spheres did not interfere in the ovary activity. This must have happened because the lead spheres were not kept in the interior of the uterus, with exception of one animal that presented lead spheres. In this case, the uterus presents an aspect inflated. In the microscopic observations, ovary activity was consisted of three treatments.

Key words: female buffalos, feedlot, ovary, reproduction.

Introdução

Os ovários da maioria dos animais são formados por duas zonas diferentes: o córtex, ou zona parenquimatosa, e a medula, ou zona vascular. O córtex contém numerosos folículos em vários estágios de desenvolvimento, corpos lúteos, assim como células intersticiais e elementos do estroma. A medula se caracteriza pela presença dos grandes vasos sanguíneos, linfáticos, nervos e algumas estruturas embrionárias remanescentes. É um tecido conjuntivo frouxo, rico em fibras elásticas e fibras reticulares. Os constituintes medulares são contínuos ao ligamento mesovárico.

O folículo ovariano é uma agregação esférica de células que contém o gameta em desenvolvimento. A continuidade cíclica do desenvolvimento folicular se caracteriza por meio da identificação dos folículos específicos - folículo primordial, folículo primário, folículo secundário e folículo maduro. A ativação do folículo primordial resulta em um folículo primário, envolvendo alterações do ovócito primário das células foliculares, que se tornam cúbicas ou prismáticas, e de outros elementos do estroma. O folículo secundário é identificado pelo aumento no número de células foliculares associadas ao ovócito primário e pelo desenvolvimento de uma zona pelúcida entre o ovócito primário e as células foliculares.

A membrana granulosa é formada pelas células foliculares mitoticamente ativas. Já, as células do estroma se diferenciam em duas camadas: teca interna e teca externa. O crescimento do folículo e o desenvolvimento dos envoltórios multilamelares tecais são acompanhados pelo deslocamento do folículo secundário da superfície cortical.

O desenvolvimento do folículo terciário (folículo vesicular) resulta da atividade secretora das células granulosas. As lacunas ou fendas intercelulares são preenchidas com líquido folicular, confluem e formam o antro folicular. Esses eventos são acompanhados pelo crescimento contínuo do folículo. O ovócito primário ainda está circundado em um agrupamento de células granulosas que continua com a membrana granulosa, que está deslocada para periferia.

Os folículos pré-ovulatórios também são chamados folículos maduros ou folículos de Graff, os quais se estendem desde uma protuberância superficial até a região mais profunda do córtex.

Fatores que alteram o comportamento da reprodução de ruminantes, a implantação de dispositivos intra-uterinos (DIU, Alcalde *et al.*, 1999), aplicação de promotores de crescimento (Ono *et al.*, 1996), retirada completa dos ovários (ovariectomia, Marques *et al.*, 2001) ou implantação de dispositivos estranhos ao organismo (esferas de chumbo, Marques *et al.*, 2001), poderiam impedir a

manifestação do estro e proporcionar melhores resultados sobre o desempenho de animais terminados em curto espaço de tempo (confinamento) e alimentados *ad libitum*. O uso de dispositivos estranhos ao organismo pode desencadear um processo de rejeição e, por conseqüência, determinar a formação de um processo inflamatório com alterações significativas no útero do animal e suas adjacências (Albuquerque *et al.*, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de hormônios exógenos (Synovex-H® - 20mg de benzoato de estradiol e 200mg de testosterona) e a implantação de 100 esferas de chumbo no corno uterino, sobre a atividade ovariana (análises macroscópicas e histológicas) de novilhas búfalas da raça Murrah, terminadas em confinamento.

Material e métodos

Local

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), no setor de Bovinocultura de Corte, da Universidade Estadual de Maringá (UEM). As análises morfológicas e histológicas foram realizadas no Laboratório de Histologia da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná.

Animais e instalação

Foram utilizadas 20 novilhas bubalinas da raça Murrah, com peso vivo médio de 350kg e aproximadamente 16 meses de idade. As búfalas foram distribuídas ao acaso em 3 tratamentos, sendo 1 com 6 e 2 com 7 animais. Ao chegarem no local do experimento, as búfalas foram pesadas, identificadas com um brinco plástico na orelha direita, receberam 8mL de vermífugo, à base de ivermectina (Ivomec®) e foram alojadas em 3 piquetes de 270m² com pouca arborização. Cada piquete dispunha de 6m lineares de comedouro em concreto e bebedouro com bóia de vazão total e capacidade de 250 litros. Foram disponibilizados 18m² de sombra artificial para cada piquete. Os piquetes eram cercados com 5 fios de arame liso, com palanques dispostos a uma distância de 6m e um sexto fio, que era eletrificado.

Alimentação

A ração completa (silagem de cana-de-açúcar + 1% de uréia e milho em grãos quebrados + farelo de soja + sal mineral) foi fornecida duas vezes ao dia (8 e 16 horas). As composições percentuais e químicas das rações estão apresentadas na Tabela 1. A ração foi fornecida a uma taxa de 2,3% do peso vivo das búfalas. Segundo NRC (1996), para bovinos de corte, a ração foi calculada para proporcionar um ganho de peso vivo médio de 1,0kg/animal/dia. As sobras das rações foram coletadas uma vez por semana para

possibilitar os ajustes necessários.

Tabela 1. Composição percentual (%/MS) e química (%/MS) da ração utilizada.

Ingredientes	MS	PB	MO	EM*	FDN	FDA	Cinzas
Silagem de cana	25,64	7,55	94,83	2,05	40,62	43,63	5,17
Milho quebrado	88,41	8,80	98,96	3,25	8,37	3,94	1,04
Farelo de soja	88,62	50,58	95,09	3,15	14,96	10,10	4,91
Uréia	98,00	262	-	-	-	-	-
Sal mineral [†]	95	-	-	-	-	-	-
Ração	41,21	12,53	96,30	2,62	67,20	26,32	3,35

Dados obtidos do Laboratório de Análises de Alimentos e Alimentação Animal do Departamento de Zootecnia/UEM. *Mecalorias/Kg. [†] Níveis de garantia por kg de sal mineral: 130g Ca, 65g P, 12g S, 12gmg, 1500mg Fe, 1170mg Mn, 1300mg Cu, 71mg Co, 71mg I, 21mg Se, 3200mg Zn, 138g Na, 650mg F.

Tratamentos

Foram estudados 3 tratamentos: VAZ - novilhas vazias com atividade ovariana; PRC - novilhas com promotor de crescimento (Synovex-H[®] - 20mg de Benzoato de estradiol e 200mg de testosterona); e CHU - novilhas com 100 esferas de chumbo introduzidas no corno uterino, usando pipeta de inseminação artificial. Foi realizada palpação retal nas 20 búfalas, 30 dias antes do início do experimento, para avaliar as condições reprodutivas. O período de adaptação foi de 30 dias. Após esse período, iniciou-se o experimento com sincronização de cio pelo protocolo "Ovsynch", conforme descrito por Pursley *et al.* (1995), sendo aplicados 2mL de conceptual[®] (GnRH - 200 µg) no dia zero; 7 dias após, aplicaram-se 2mL de preloban[®] (PGF2α - 150µg) e após 2 dias aplicaram-se 2mL de conceptual[®] (GnRH - 200µg). 16 horas após o término desse protocolo, fez-se a colocação do chumbo nas búfalas do tratamento CHU, e o promotor de crescimento nas búfalas do tratamento PRC. Para colocação do chumbo, as búfalas foram contidas, e o procedimento foi semelhante ao da inseminação artificial. A diferença dos métodos foi que, ao passar com a pipeta através do cérvix, a bainha foi direcionada para a extremidade cranial de um dos cornos uterino. As esferas contidas na bainha foram impulsionadas utilizando um expansor. Foram colocadas 100 esferas de chumbo de 4mm de diâmetro, esterilizadas previamente com álcool a 96%. As búfalas do tratamento PRC foram implantadas no mesmo dia. O implante contendo 200mg de Testosterona e 20mg de Benzoato de Estradiol (Synovex-H[®]) foi colocado na orelha direita com auxílio de uma pistola própria.

Período

O experimento teve início no dia 10 de setembro e término no dia 03 de dezembro de 2001. O experimento teve duração de 84 dias e após esse período, as novilhas foram abatidas em frigorífico da região.

Coleta e preparo do material

No momento do abate, o aparelho reprodutor foi

coletado. Os úteros foram condicionados em sacos plásticos, identificados e mantidos em caixa térmica com gelo. Esse material foi transportado para o laboratório de histologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), onde foi realizada a macroscopia, incluindo a observação da distribuição das esferas de chumbo no útero. Os ovários foram retirados, identificados, cortados longitudinalmente e fixados em líquido de Bouin, para completa fixação, e conservados por 24 horas em etanol 70%. Posteriormente, foram desidratados por um processo de passagem em série crescente de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina em seu eixo maior, para obtenção de cortes transversais com 5µm de espessura. Foram feitas duas lâminas por ovário, utilizando a técnica de Hematoxilina-Eosina (Lillie, 1954), para corar células ovarianas, para contagem dos folículos ovarianos, presença de corpo lúteo e características gerais da camada cortical e medular.

Resultado e discussão

Análises macroscópicas

Nas novilhas bubalinas dos tratamentos VAZ (animais não-gestantes) e CHU (implantadas com esferas de chumbo no útero), as análises macroscópicas não mostraram alterações morfológicas aparentes nos aspectos uterinos (Figuras 1a e 1c). O aspecto macroscópico do útero das novilhas desses dois tratamentos era normal. No útero de algumas novilhas bubalinas, dos dois tratamentos, foi constatada presença de muco cristalino. Todavia a presença desse muco cristalino não estaria relacionada ao tratamento. A presença do muco se deu em razão da manifestação do cio em algumas novilhas, mesmo naquelas implantadas com as esferas de chumbo.

Por outro lado, no tratamento com implante de promotor de crescimento (PCR), no que concerne às análises macroscópicas, verificaram-se alterações nos aspectos morfológicos dos úteros das novilhas. O útero dessas novilhas estava com a musculatura mais espessa e coloração mais escura. As alterações morfológicas observadas no útero das novilhas desse tratamento poderiam ser atribuídas ao efeito anabolizante do implante à base de testosterona que foi utilizado. Observou-se ainda o revestimento diferenciado do útero, assim como tamanho superior ao útero das novilhas dos demais tratamentos. Assim como nos outros tratamentos, também foi observada a presença de muco cristalino no útero de algumas novilhas. Como no caso precedente, a presença de muco cristalino estaria relacionada à manifestação do cio em algumas novilhas.

No tratamento CHU, apenas uma novilha apresentou as esferas de chumbo na bifurcação dos

cornos uterinos (Figura 2a) e a presença de um processo inflamatório avançado (Figura 2b).

As esferas encontradas estavam na bifurcação dos cornos uterinos na camada serosa. Nesse caso, o útero apresentava secreção purulenta no seu interior, maior tamanho, aspecto túrgido e edemaciado, devido ao processo inflamatório causado pela presença do chumbo. A presença de corpo estranho em qualquer parte do organismo poderá desencadear um processo de resposta imunológica, com a presença de células de defesa do organismo. Nesse caso, ocorre um processo inflamatório.

Análises microscópicas

Em todos os tratamentos foram observadas as seguintes características histológicas dos ovários: camada cortical e camada medular (Figuras 3a, b, c).

A camada cortical apresentava-se revestida externamente por tecido epitelial cúbico simples. Abaixo do epitélio, observava-se uma camada delgada de tecido conjuntivo, rico em fibras de colágenos. Este era seguido pelo estroma ovariano, composto de tecido conjuntivo frouxo, células intersticiais e células germinativas contidas nos folículos ovarianos em desenvolvimento. Na camada medular, foi observado tecido conjuntivo frouxo, no qual se verificou a presença de células musculares lisas, vasos sanguíneos e linfáticos e nervos.

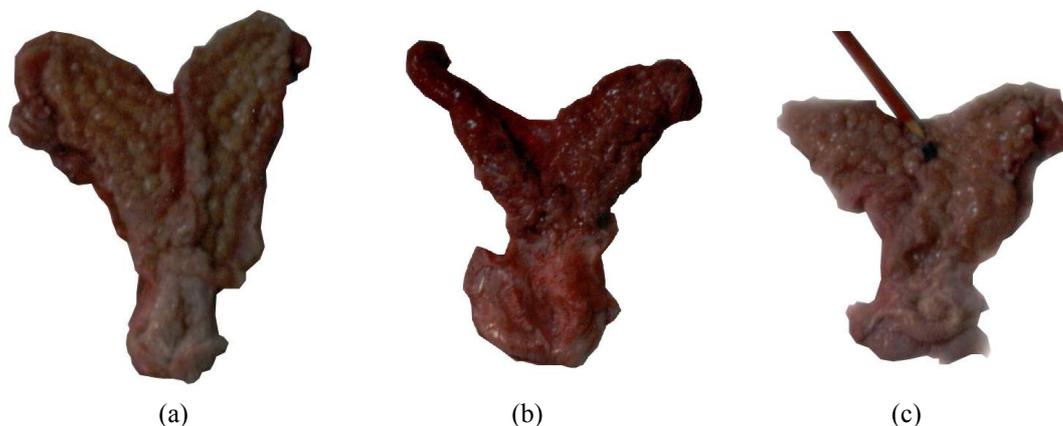


Figura 1. Morfologia uterina de novilhas bubalinas vazias (VAZ - a), com implante de promotor de crescimento (PRC - b) e esferas de chumbo no útero (CHU - c).

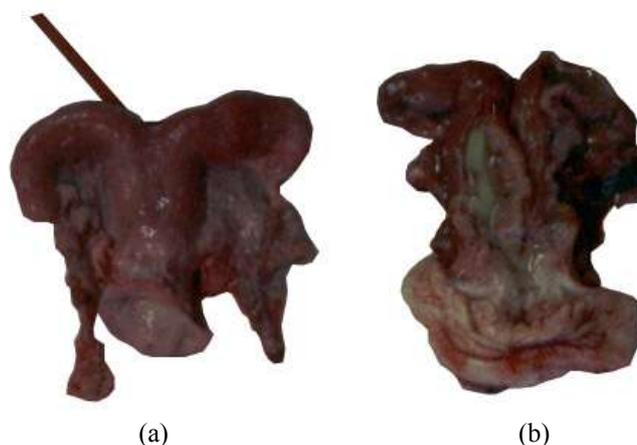


Figura 2. Morfologia uterina de novilhas bubalinas com implante de esferas de chumbo (CHU) na bifurcação dos cornos uterinos (a) e processo inflamatório (b).

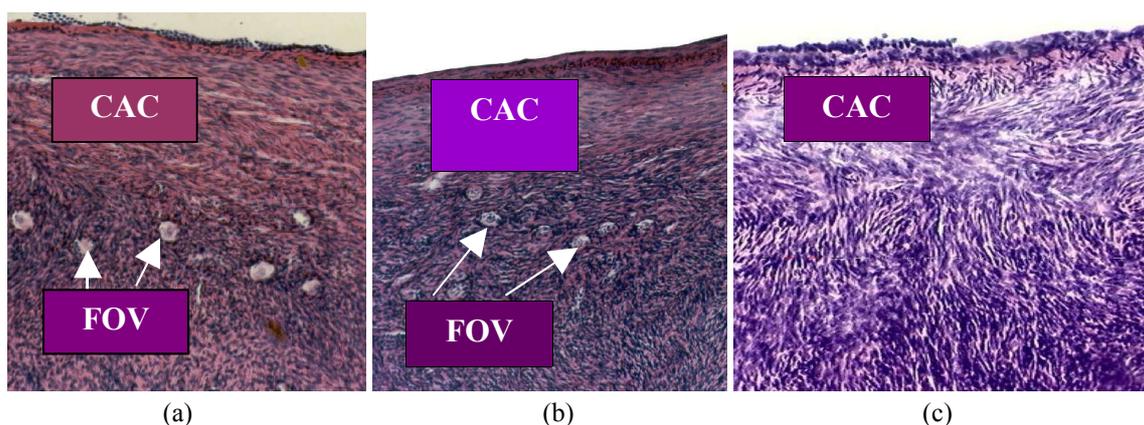


Figura 3. Fotomicrografia de ovário de novilhas bubalinas vazias (VAZ - Fig. a), com promotor de crescimento (PRC - Fig. b) e esferas de chumbo (CHU - Fig. c) na bifurcação dos cornos uterinos. Camada cortical (CAC) e folículos ovarianos (FOV). Coloração: HE, 60 X.

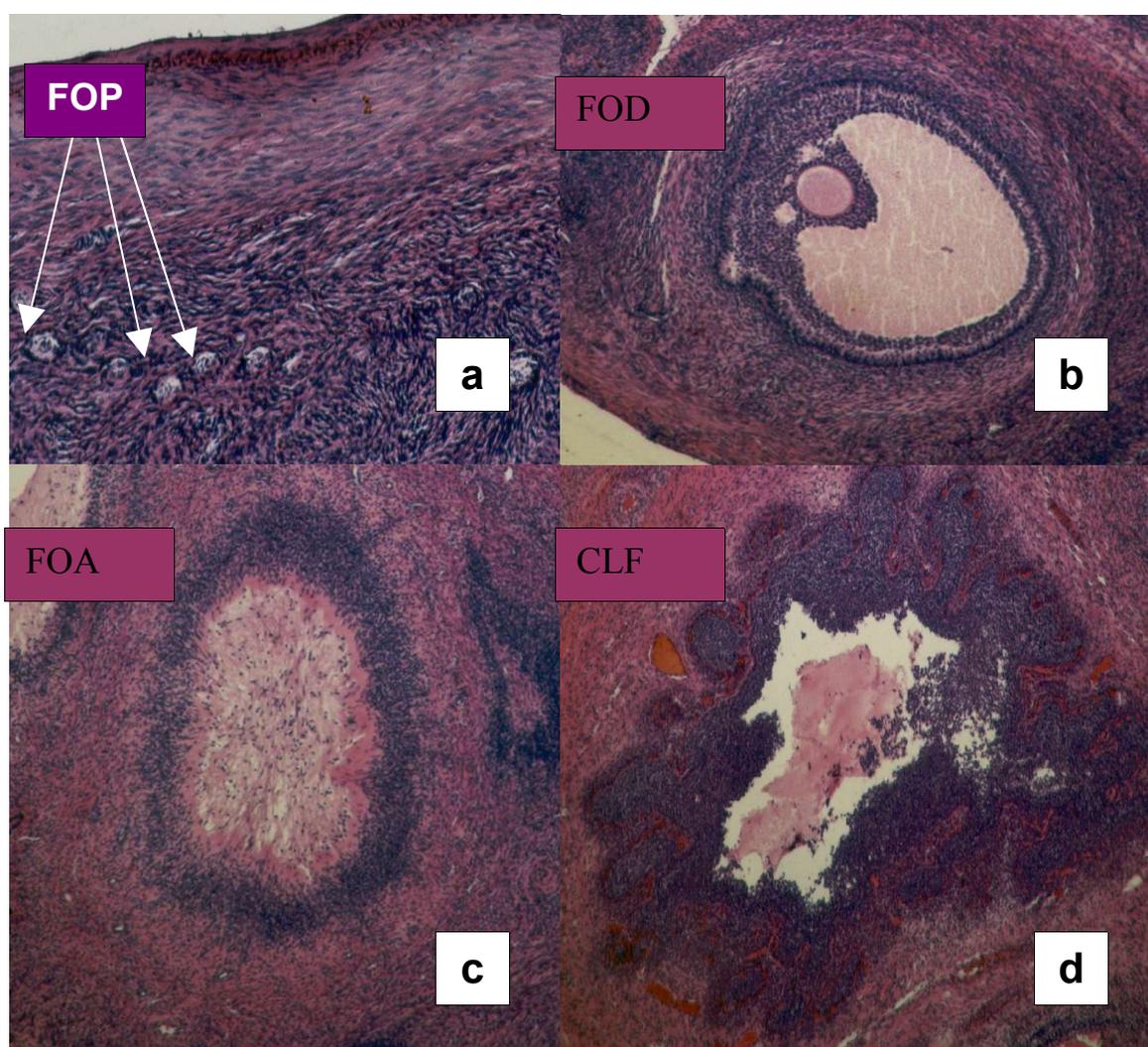


Figura 4. Fotomicrografia de ovário de novilhas bubalinas vazias (VAZ). Folículos primordiais (FOP - a), folículos em desenvolvimento (FOD - b), folículo atrésico (FOA - c) e corpo lúteo em formação (CLF - d). Coloração: HE, 60 X.

O implante de promotor de crescimento ou esferas de chumbo no útero não alterou a camada cortical e

nem a camada medular dos ovários de novilhas bubalinas, terminadas em confinamento e alimentadas *ad libitum*.

Nas novilhas bubalinas do tratamento VAZ, foram observados vários folículos primordiais (Figura 4a), folículos em desenvolvimento (Figura 4b), folículo atresico (Figura 4c) e corpo lúteo em formação (Figura 4d). As presenças dessas estruturas atestam que as novilhas desse tratamento estavam ovulando normalmente. Dessa forma, em boas condições de alimentação, as novilhas bubalinas poderiam apresentar ciclos estrais em qualquer época do ano. Este trabalho foi realizado no segundo semestre do

ano. No entanto, Zicarelli (1997) enfatizaram que a maior parte das bubalinas estariam aptas a ciclarem normalmente apenas no primeiro semestre do ano.

Nas novilhas do tratamento com implante de promotor de crescimento, foram encontrados resultados semelhantes àquele do tratamento VAZ. Foi possível observar a presença de folículos primordiais (Figura 5a), folículos em desenvolvimento (Figura 5b), folículos atresicos (Figura 5c) e corpo lúteo em formação (5d) em 83,3% das novilhas avaliadas. Essa percentagem foi inferior à percentagem observada para as novilhas do tratamento VAZ (100%).

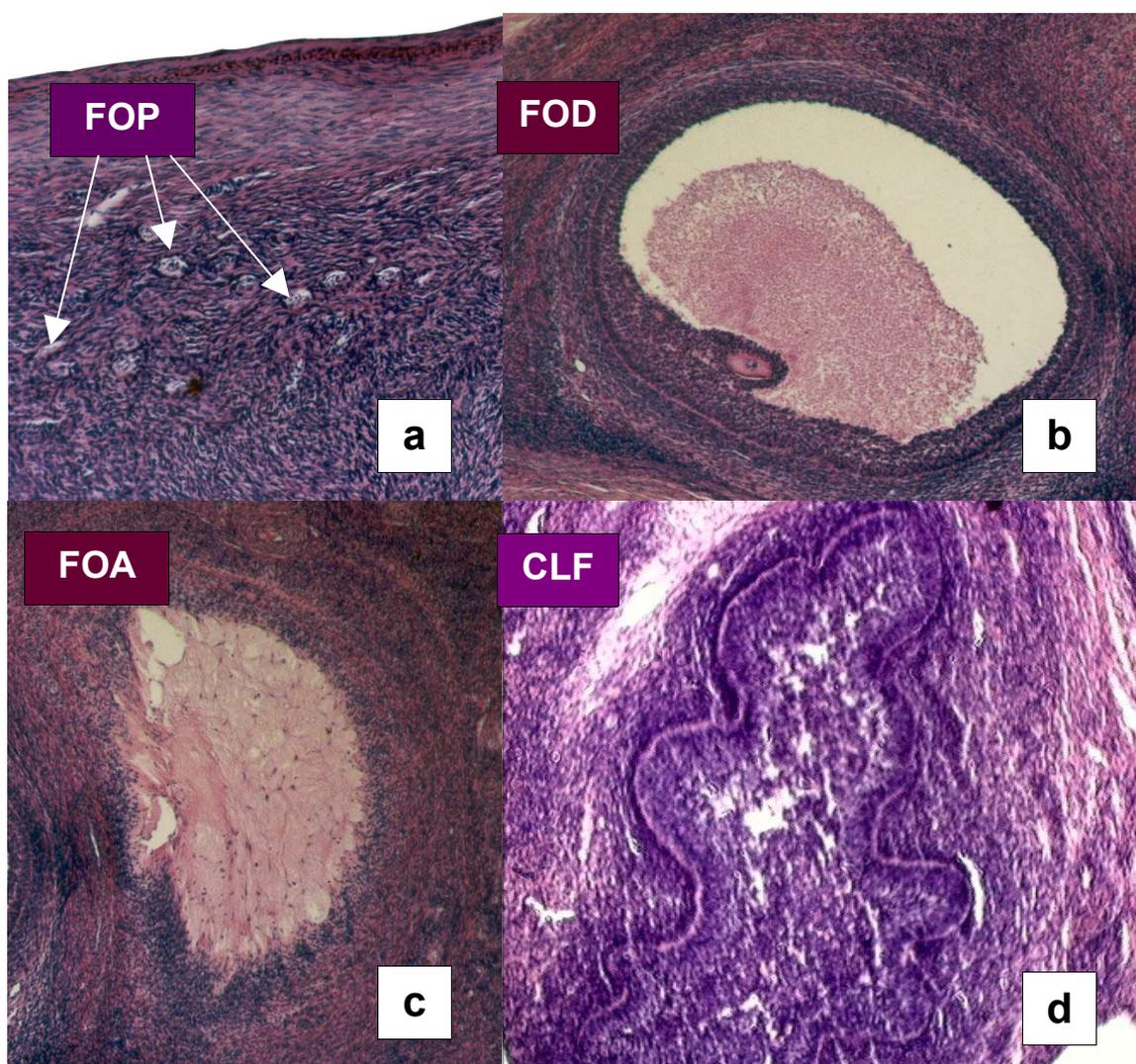


Figura 5. Fotomicrografia de ovários de novilhas bubalinas com promotor de crescimento (PRC). Folículos primordiais (FOP - a), folículos em desenvolvimento (FOD - b), folículo atresico (FOA - c) e corpo lúteo em formação (CLF - d). Coloração: HE, 60 X.

Dessa maneira, o implante de promotor de crescimento em novilhas bubalinas não alterou o comportamento reprodutivo desses animais,

embora esse implante tenha ocasionado lesões no interior do útero.

Da mesma forma, como para os tratamentos VAZ e PCR, as novilhas bubalinas com implante de esferas de chumbo no útero mostraram a presença

de folículos primordiais (Figura 6a), folículos em diferente estágio de desenvolvimento (Figura 6b), folículos atrésicos (6c) e presença de corpo lúteo em formação (Figura 6d).

Como descrito na análise morfológica (Figura 2), um animal apresentou algumas esferas de chumbos e processo inflamatório no interior do útero. Embora esse animal apresentasse esferas de chumbos na bifurcação dos cornos uterinos, pôde ser observado corpo lúteo em formação (Figura 6). Ainda nesse tratamento, constatou-se que 71,4% dos animais apresentaram formação inicial de corpo lúteo.

Esse resultado poderia ter ocorrido, provavelmente porque a implantação das esferas de chumbo não teria sido realizada no local correto, facilitando a expulsão destas em pouco tempo, ou devido ao peristaltismo uterino que as expulsaram, independentemente do local do implante. A expulsão de dispositivos colocados no interior do útero de ruminantes ocorre em função das contrações peristálticas. Alcade *et al.* (1999) observaram uma grande migração de DIU implantados no corno uterino de novilhas da raça Nelore.

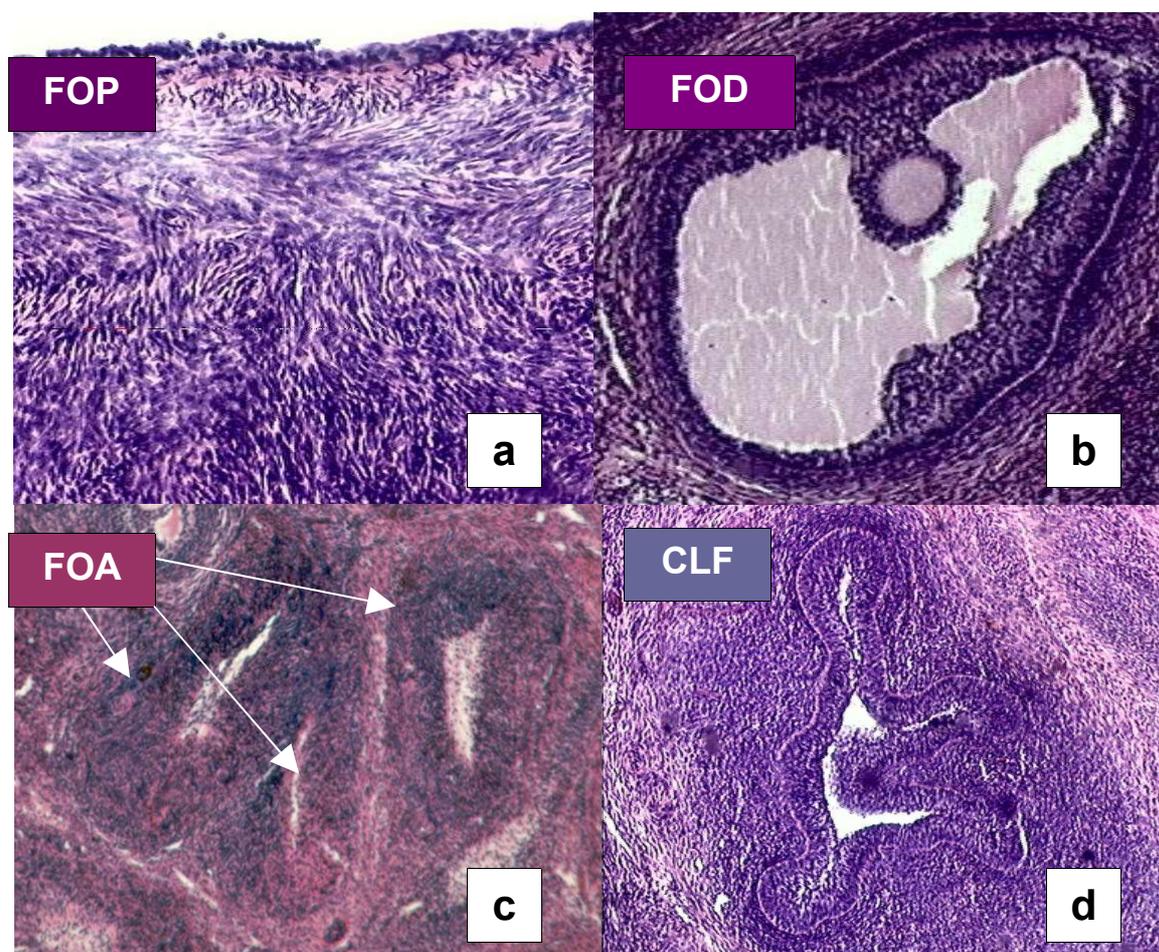


Figura 6. Fotomicrografia de ovários de novilhas bubalinas com esferas de chumbo (CHU). Folículos primordiais (FOP - a), folículos em desenvolvimento (FOD - b), folículo atrésico (FOA - c) e corpo lúteo em formação (CLF - d). Coloração: HE, 60 X.

inibição da ovulação relacionada à utilização de implantes de promotores de crescimento ou esferas de chumbo. Resultados contrários foram obtidos por Marques *et al.* (2001), que, trabalhando com novilhas mestiças (Nelore x Angus) implantadas com 50 esferas de chumbo no útero, observaram a inibição do estro, assim como maior desempenho das mesmas. Mesmo sendo realizada a sincronização do estro no início do experimento, o promotor de crescimento e o

Os resultados deste experimento não mostram a

pouco tempo que as esferas de chumbo permaneceram no útero certamente perturbaram a regularidade do ciclo entre os animais do mesmo lote, assim como de tratamentos diferentes. É possível que 100% das búfalas dos 3 tratamentos estivessem ciclando. Entretanto não seria possível observarmos 100% das búfalas ovulando exatamente juntas, nem observarmos histologicamente os mesmos estágios de desenvolvimento de folículos e formação de corpo lúteo. Existe entre as fêmeas bubalinas uma particularidade e variação nata entre cada uma delas. O ciclo estral das búfalas é de 21 dias, sendo essa duração uma média, pois é possível haver ciclos com duração de 18 a 22 dias.

As alterações ovarianas são semelhantes àquelas das fêmeas bovinas. Danell (1987) observou duas ondas de crescimento folicular, sendo a primeira no terceiro dia do ciclo, indo até o 13.º dia; e a segunda, do 9.º até o final do ciclo ponto. Estudos inerentes à dinâmica folicular em bubalinos ainda são escassos.

Conclusão

As novilhas bubalinas apresentavam atividade ovariana, mesmo estando em situação de foto-período crescente (setembro a dezembro). A implantação de hormônio exógeno e de esferas de chumbo no interior do útero de novilhas bubalinas alterou os aspectos macroscópicos dos úteros. Todavia, não alteraram a atividade ovariana desses animais. As novilhas continuaram apresentando ciclo estral normal, com a presença de corpo lúteo nos 3 tratamentos.

Referências

ALCALDE, C. R. *et al.* Avaliação do desempenho de novilhas nelore implantadas com dispositivo intra-uterino (DIU) recebendo ou não sal mineral. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.21, n.3, p 633-636, 1999.

ALBUQUERQUE, K. P. *et al.* Avaliação da atividade ovariana em novilhas bubalinas implantadas com hormônio estrogênico ou esferas de chumbo. Recife, In: Anais... REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39, 2002, Recife. *Anais...*, Recife, PE. 2002.

DANELL, B. *Oestrus behavior, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers*. 1987. Thesis (PhD) - Sveriges Lantbruksuniversitet., Uppsala, 1987.

LILLIE, R. D. *Histopathologic TCHUnic and Pratical Histochemistry*. 2^{ed}, New York, Blakiston, 1954. p.501.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. - NRC. 1996. *Nutrient requirements of beef cattle*, Washington, D.C. 242p.

MARQUES, J. A. *et al.* Avaliação do desempenho de novilhas mestiças em diferentes condições reprodutivas confinadas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. *Anais...*, Piracicaba, SP. 2001. p. 960-962.

ONO, Y. *et al.* Effects of synovex-S and recombinant growth hormone (Somavubove) on growth responses of steers: II. Muscle morphology and proximate composition of muscles. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v.74, p. 2929-2934, 1996.

PURSLEY, J. R. *et al.* Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GRNH. *Theriogenology*, New York, v.44, p. 915-923, 1995.

ZICARELLI, L. News on buffalo cow reproduction. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5, 1997, Caserta. *Anais...*, Caserta, 1997. p. 124-141.

Received on July 15, 2003.

Accepted on February 27, 2004.