

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL

CARLOS OTÁVIO DE PAULA VASCONCELOS

ESTUDO BACTERIOLÓGICO DAS VAGINITES E ALTERAÇÕES NA
MICROBIOTA VAGINAL DETERMINADAS POR IMPLANTES
INTRAVAGINAIS EM OVELHAS

NITERÓI
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CARLOS OTÁVIO DE PAULA VASCONCELOS

ESTUDO BACTERIOLÓGICO DAS VAGINITES E ALTERAÇÕES NA
MICROBIOTA VAGINAL DETERMINADAS POR IMPLANTES
INTRAVAGINAIS EM OVELHAS

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientadores: Prof. Dr. Walter Lilenbaum
Prof^a. Dr^a. Tânia Góes de Pinho
Co-Orientador: Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão

NITERÓI
2009

CARLOS OTÁVIO DE PAULA VASCONCELOS

ESTUDO BACTERIOLÓGICO DAS VAGINITES E ALTERAÇÕES NA
MICROBIOTA VAGINAL DETERMINADAS POR IMPLANTES
INTRAVAGINAIS EM OVELHAS

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Apresentada em: 20 de julho de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Walter Lilenbaum
Universidade Federal Fluminense

Dra. Rachel Ferreira
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Prof. Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca
EMBRAPA Caprinos e Ovinos

Prof. Dr. Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. José Antônio Silva Ribas
Universidade Federal Fluminense

NITERÓI
2009

Aos meus filhos **Pedro e Thia**
representantes de tudo o que há
de bom em minha vida, por habitarem
meus pensamentos e coração, se
são a motivação para tudo o que faço

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Paulo César de Vasconcelos e Yêda Barros de Paula Vasconcelos pela minha existência;

À Universidade Federal Fluminense representada pelas professoras Ana Maria Reis Ferreira e Nádia Almosny;

Aos meus amigos de trabalho Renato Luiz Silveira, Mauro Roberto Rodrigues, Suzane Therezinha (Tuti), Fabiana Knackfuss e demais companheiros por terem sido fundamentais nos momentos difíceis que passei durante a realização do Doutorado;

Em especial à minha amiga e parceira de trabalho Janaína Barcelos Porto Ferreira por ter sido minha conselheira durante todo este tempo e por sua ajuda direta na confecção desta tese;

Ao professor Irineu Benevides Filho pela oportunidade que permitiu o início de minha carreira letiva e por suas críticas que hoje entendo terem sido sempre construtivas;

À Dra. Maria Tereza Bueno Correia e Castro que me devolveu a razão e me fez enxergar um novo rumo para minha vida;

Aos professores Felipe Zandonadi Brandão, Walter Lilenbaum e Tânia Góes de Pinho por terem me orientado na realização deste trabalho;

Aos colegas do curso de mestrado Bruno Ribeiro, André Soares (*In memoriam*), Prieto Dourado, Aline Pinna, Amanda Cavalcanti e Mariana Boité pela amizade que consolidamos durante a fase de obtenção dos créditos;

A todas as outras pessoas que eu possa estar esquecendo de citar aqui e que de forma direta ou indireta ajudaram na realização deste trabalho.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência e a etiologia microbiana das vaginites e alterações na microbiota vaginal determinadas por implantes intravaginais em ovelhas. Estudou-se 24 ovelhas Dorper e Dorper/Santa Inês, divididas em três grupos (GI, GII e GIII) que receberam dispositivos intravaginais por seis dias. Um dos grupos recebeu dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (n=8), outro com esponjas vaginais sem progesterona (n=8) e o terceiro foi tratado com esponjas vaginais impregnadas com Medroxiprogesterona (n=8). GI e GII receberam por via intramuscular 12,5 mg da PGF₂α natural e 300 UI de gonadotrofina coriônica eqüina, enquanto que GIII recebeu 1,5 mL de solução salina, 24 horas antes da retirada do dispositivo. O muco vaginal foi colhido com auxílio de swabs estéreis de algodão (antes da inserção, no dia da retirada, 24 e 48 horas após a retirada do implante) e transportado até o Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense. As amostras foram semeadas em Agar Sangue e após o crescimento as colônias identificadas e contadas. Realizou-se ainda o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Ao início do experimento obteve-se 68,2% isolados com características do gênero *Staphylococcus*, cinco em cada grupo, sendo 60% *Staphylococcus* coagulase-positivos (CoPS), classificados como *Staphylococcus aureus*. Verificou-se que 66,6% dos isolados demonstraram resistência a pelo menos uma droga testada. No dia da retirada dos implantes, 100% das ovelhas apresentaram sinais de vaginite. Das amostras estudadas, 72,7% foram identificadas como *Escherichia coli*, 18,2% como *Klebsiella pneumoniae*, e 9,1% como *Staphylococcus epidermidis*. Todos os isolados demonstraram resistência à pelo menos uma droga testada. A análise quantitativa demonstrou que em todos os momentos de avaliação os animais dos três grupos estudados apresentaram contagens de colônias similares (inferior a 300 UFC/mL). Já a análise qualitativa demonstrou ao início do experimento 68,2% de cocos Gram-positivos nos três grupos. No momento da retirada dos implantes, verificou-se a predominância de bastonetes Gram-negativos do grupo coliforme (90,9%), nos três grupos estudados, retornando a microbiota normal 24 e 48 horas após a retirada. Conclui-se que *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* são os constituintes predominantes da microbiota vaginal normal de ovelhas e os coliformes identificados como oportunistas predominantes nos casos de vaginite, não sendo a progesterona a única implicada nesta ocorrência, visto que uma associação entre seu efeito imunossupressor e a irritação mecânica do dispositivo foi verificada.

Palavras-chave: vaginite, microbiota vaginal, ovelha, implante intravaginal.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to evaluate the incidence and microbial etiology of vaginitis in ewes, as well as the changes in their vaginal microflora caused by the use of intravaginal implants. Twenty-four (24) Dorper and Dorper/Santa Inês ewes divided in three groups (GI, GII and GIII) were studied. Intravaginal devices were placed in the ewes for six days, according to the following: the first group received progesterone-releasing intravaginal devices (n=8), the second group, vaginal sponges without progesterone (n=8) and the third group, vaginal sponges impregnated with Medroxyprogesterone (n=8). GI and GII received 12.5 mg of natural PGF₂α and 300 IU equine chorionic gonadotrophin, while GIII received 1.5 mL of saline solution 24 hours before the device was removed. Vaginal mucus samples were collected using sterile cotton swabs (before the insertion, at the day the implant was removed, 24 and 48 hours after the implant was removed) and taken to the Laboratory of Veterinary Bacteriology of Universidade Federal Fluminense. The samples were cultured in blood agar, and then the colonies were identified and counted. An antimicrobial susceptibility test was also conducted. At the beginning of the trial, 68.2% of the cultures isolated presented characteristics of the genera *Staphylococcus*, five in each group, of which, 60% were coagulase-positive *Staphylococcus* (CoPS), classified as *Staphylococcus aureus*. Sixty-six percent (66.6%) of the isolates were resistant to at least one of the drugs tested. On the day the implants were removed, 100% of the ewes had developed signs of vaginitis. Of the samples studied, 72.7% were identified as *Escherichia coli*; 18.2% as *Klebsiella pneumoniae*; and 9.1% as *Staphylococcus epidermidis*. All the isolates showed resistance to at least one of the drugs tested. Quantitative analysis demonstrated that animals from the three groups studied showed similar colony counts (lower than 300 CFU/mL) throughout the assessment. The qualitative analysis showed 68.2% of Gram-positive cocci in the three groups at the beginning of the trial. At the time the implants were removed, the three groups studied showed predominance of coliform Gram-negative rods (90.9%). Microflora returned to normal levels 24 to 48 hours after the implants were removed. In conclusion, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* are the predominant components of the regular vaginal microflora of ewes and coliforms are identified as the predominant opportunistic agents in cases of vaginitis. Progesterone was not the only agent involved in such event, since an association between the immunosuppressive effect of progesterone and the mechanical irritation caused by the implant device could also be observed.

Key words: vaginitis, vaginal microflora, ewe, intravaginal implant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Unidades formadoras de colônia observadas antes da colocação do implante intra-vaginal, no dia da retirada, 24 e 48 h após a retirada do mesmo, nos grupos GI (CIDR), GII (esponja sem progesterona) e GIII (esponja com progesterona), p.50

Figura 2: Alterações na microbiota vaginal de ovelhas após o uso de implantes intravaginais, p.51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos Experimentais de 24 ovelhas, p.39

Tabela 2: Prevalência de bactérias isoladas da vagina de ovelhas antes dos implantes, p.43

Tabela 3: Padrões de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus sp.* obtidos da vagina de ovelhas antes da colocação dos implantes intravaginais, p.44

Tabela 4: Prevalência de bactérias isoladas da vagina de ovelhas após o uso de implantes intravaginais, p.46

Tabela 5: Padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos *in vitro* de coliformes obtidos da vagina de ovelhas após a retirada dos implantes, p.47

Tabela 6: Unidades formadoras de colônia observadas antes da colocação do implante intra-vaginal, no dia da retirada, 24 e 48 h após a retirada do mesmo, nos grupos GI (CIDR), GII (esponja sem progesterona) e GIII (esponja com progesterona), p.49

LISTA DE ABREVIATURAS

μg – micrograma
CIDR - Controlled internal drug release dispenser
CL - Corpo lúteo
CoNS - *Staphylococcus* coagulase negativa
CoPS – *Staphylococcus* coagulase positiva
 E_2 - Estrógeno
eCG - Gonadotrofina coriônica eqüina
FGA - Acetato de fluorogestona
FSH - Hormônio folículo estimulante
GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina
IATF - Inseminação artificial em tempo fixo
IgG – imunoglobulina G
IgM – imunoglobulina M
IL - interleucina
LH - Hormônio luteinizante
MAP - Acetato de medroxiprogesterona
mg - miligrama
mL - mililitro
MR – Methyl Red (Vermelho de metila)
 P_4 - progesterona
PBS – solução fosfatada tamponada de Dulbecco
 PGE_2 – prostaglandina E_2
 $\text{PGF}_{2\alpha}$ - prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$
 $\text{PGF}_{2\alpha}$ – prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$
pH – potencial de hidrogênio
PRID – progesterone releasing intravaginal device
TSI – Triple sugar iron (tríplice açúcar ferro)
ufc – unidade formadora de colônia
UI – unidade internacional
VP – Voges Proskauer

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, p.13

2 REVISÃO DE LITERATURA, p.15

2.1 CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DOS OVINOS, p.15

2.1.1 Ciclo estral da ovelha, p.15

2.1.2 Estacionalidade Reprodutiva, p.16

2.1.3 Sincronização de estro, p.18

2.1.3.1 Implantes vaginais, p.20

2.1.4 Microbiota vaginal, p.22

2.1.4.1 Mecanismos de defesa da vagina, p.26

2.2 ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA VAGINAL, p.29

2.2.1 Vaginites, p.29

2.2.1.1 Anormalidades de origem traumática, p.29

2.2.1.2 Anormalidades de origem parasitária, p.32

2.2.1.3 Anormalidades de origem infecciosa, p.32

2.2.1.3.1 Infecções específicas, p.32

2.2.1.3.2 Infecções inespecíficas, p.33

2.3 O GÊNERO *Staphylococcus* sp. , p.34

2.3.1 Características gerais, p.34

2.3.2 Principais enfermidades reprodutivas determinadas nos ovinos, p.35

2.3.3 Susceptibilidade aos antimicrobianos, p.35

2.4 BASTONETES GRAM-NEGATIVOS: COLIFORMES, p.36

2.4.1 Características gerais, p.36

2.4.2 Susceptibilidade aos antimicrobianos, p.36

3 OBJETIVOS, p.37

3.1 OBJETIVO GERAL, p.37

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p.37

4 MATERIAL E MÉTODOS, p.38

4.1 DESENHO DO ESTUDO, p.38

4.2 PERÍODO EXPERIMENTAL, LOCALIZAÇÃO E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS, p.38

4.3 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS, p.39

4.4 PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO E AMOSTRAS, p.40

4.5 CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS, p.40

4.6 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS, p.41

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p.41

5 RESULTADOS, p.42

5.1 PREVALÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS **IN VITRO** DE ESTAFILOCOCCOS ISOLADOS DA VAGINA DE OVELHAS SADIAS, p. 42

5.2 PREVALÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS **IN VITRO** DE BACTÉRIAS DA VAGINA DE OVELHAS APÓS O USO DE ESPONJA INTRAVAGINAL, p.45

5.3 ALTERAÇÕES OBSERVADAS NA MICROBIOTA VAGINAL DE OVELHAS APÓS A UTILIZAÇÃO DE IMPLANTES INTRAVAGINAIS, p.48

6 DISCUSSÃO, p.52

7 CONCLUSÕES, p.58

8 REFERÊNCIAS, p.59

9 ANEXOS, p.70

1 INTRODUÇÃO

A procura por carne ovina vem crescendo consideravelmente no Brasil, sendo a demanda atual bem maior do que a oferta. No entanto, para atender este mercado e manter o crescimento deste agronegócio é necessário que a produção de cordeiros seja suficiente e constante durante todo o ano. O país detém apenas 1,45% do efetivo do rebanho mundial de ovinos e indicadores de desempenho inferiores à média mundial, com desfrute de 30,00%, enquanto a média mundial foi de 47,30% (SIMPLÍCIO; SIMPLÍCIO, 2006).

A criação tecnificada de ovinos no Estado do Rio de Janeiro é um fenômeno recente. A reprodução é um pré-requisito para qualquer sistema de produção animal e a eficiência reprodutiva tem papel primordial neste contexto. Uma das formas de melhorar a eficiência reprodutiva ocorre com a utilização de biotécnicas da reprodução, que levam a redução do intervalo de partos.

A indução e sincronização do estro por implantes intravaginais impregnados por progesterona são ferramentas de manejo usadas em rebanhos ovinos tanto no período reprodutivo como no anestro. Esta ferramenta permite programar as estações de acasalamento e nascimento, permitindo driblar as variações sazonais da oferta de forragens, além de concentrar o manejo do rebanho. Entretanto, na retirada do implante ao término do tratamento, muitas vezes observa-se uma descarga vaginal mucopurulenta e um aumento na microbiota bacteriana vaginal, podendo levar a baixas taxas de prenhez.

Em ovelhas, observou-se que a população bacteriana, apesar de aumentar temporariamente, muitas vezes retornava ao normal dois dias após a retirada da esponja (SUAREZ et al., 2006); entretanto, a comparação da população bacteriana durante o estro de animais submetidos a tais implantes não foi descrita. Estas mudanças na microbiota vaginal podem ser atribuídas à ação física dos implantes e também devido à constante absorção e retenção das secreções vaginais pelos implantes vaginais durante o tratamento hormonal, o que estimula o crescimento microbiano.

O conhecimento sobre a microbiota vaginal normal é de extrema importância para o diagnóstico, prognóstico e tratamento adequados das anormalidades do trato reprodutivo em diversas espécies. A vaginite é uma das mais comuns infecções que afetam o trato reprodutivo, e pode ser determinada por microrganismos que agem como invasores secundários e oportunistas. Dentre estes, membros do gênero *Staphylococcus* sp., os mais comuns dentre os microrganismos encontrados na microbiota vaginal normal, têm sido relatados, não somente em ovinos mas também em outros ruminantes, como bovinos e caprinos.

Desta forma, uma melhor compreensão das espécies que ocorrem na microbiota vaginal e de sua susceptibilidade aos antimicrobianos certamente serão de grande valia para o correto manejo das vaginites nos animais com implantes vaginais, contribuindo para a eficiência reprodutiva dos rebanhos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DOS OVINOS

2.1.1 Ciclo estral da ovelha

Estudos têm mostrado que a taxa de gestação de um rebanho está relacionada às taxas de ovulação, concepção e mortalidade embrionária (PLANT, 1981; GUNN et al.1984). Estes três fatores são, de certa maneira, influenciados tanto pelo manejo quanto pelo nível nutricional. Problemas sanitários podem agravar ainda mais o quadro, por levarem a uma perda do estado nutricional do rebanho, (SILVA, 1992).

Moraes et al. (2002); Suiter (2004) sugeriram que para a obtenção de ótima produtividade é necessário que as ovelhas estejam, preferencialmente, com escore da condição corporal 3 (anexo 9.1), lembrando que o parto e a lactação levam a perdas normais da condição corporal. Gunn et al. (1984) sugeriram 2,5 como escore corporal médio para se obter taxas de ovulação satisfatórias, pois constataram pouca influência do estado nutricional na taxa de ovulação, no decorrer do período de monta.

O ciclo estral é um conjunto de eventos que se repetem, sucessivamente, como resultado da interação coordenada de quatro entidades: sistema nervoso central, eixo hipotálamo-hipófise, ovários e útero (GONZALEZ, 2002). Na ovelha, tem duração média de 17 a 21 dias, apresentando uma fase lútea de 13 a 17 dias e

uma fase folicular de quatro dias. Nesta última, os hormônios FSH e LH, secretados pela hipófise, controlam o desenvolvimento folicular e a esteroidogênese, culminando na secreção de estrógenos que levam ao comportamento de estro (FONSECA, 2005).

A fase lútea inicia-se logo após a ovulação, num processo chamado luteinização, no qual as células da teca interna e da granulosa sofrem alterações morfoquímicas marcadas pela intensa angiogênese, proliferação de células fibroblásticas e hipertrofia das células lúteas. À medida que a fase lútea progride, o corpo lúteo (CL) sintetiza uma concentração crescente de progesterona até que chegue a um platô, por volta do dia seis, e que se mantém até a luteólise (MORAES, 2002).

Gonzalez (2002) considera que, de forma geral, o período de receptividade ao macho tem duração de 24 a 48 horas, podendo variar de acordo com a raça e a taxa de ovulação. Entretanto, para Mobini (2002), o estro na ovelha varia de 15 a 45 horas (média de 30 horas).

A ovulação é espontânea e ocorre por volta de 24 a 27 horas (CAVALCANTI, 2008) ou 21 a 45 horas (MOBINI, 2002) após o início do estro.

2.1.2 Estacionalidade Reprodutiva

A influência do ambiente sobre o organismo é um fenômeno em constante modificação e adaptação. Um dos mecanismos adaptativos é a estacionalidade reprodutiva, que permite as espécies gerar crias em momentos de maior probabilidade de sobrevivência, quer pela adequação climática-ambiental, quer pela disponibilidade de alimentos (BICUDO; SOUSA, 2003).

A ovelha é um animal poliéstrico estacional de dia curto. O estímulo para a manifestação e/ou intensificação dos fenômenos reprodutivos é o decréscimo no número de horas de luz por dia (fotoperíodo) (SENGER, 1999; FONSECA, 2005).

A duração da estação sexual varia de acordo com a extensão do dia, com a raça e com a nutrição. Nas zonas tropicais, onde essa variação é menor, a tendência dos ovinos e caprinos locais é reproduzir-se durante o ano todo (SASA et al., 2002; JAINUDEEN et al., 2004). Por esse motivo, quando as raças das zonas temperadas são introduzidas nos trópicos, elas perdem essa estacionalidade gradualmente e

adquirem os padrões de reprodução característicos do novo ambiente. Ovinos mantidos mais próximos à linha do equador são, habitualmente, menos vulneráveis às variações sazonais (BICUDO; SOUSA, 2003; JAINUDEEN et al., 2004).

Ovinos das raças Santa Inês, Morada Nova ou de raças nativas brasileiras apresentam atividade reprodutiva durante todo o ano, mesmo em áreas próximas aos trópicos, o que não acontece com ovinos lanados (Ille de France, Suffolk, Merino) (FONSECA, 2005). Segundo Traldi (2000), as raças deslanadas não apresentam estacionalidade reprodutiva na região sudeste do Brasil.

As informações do fotoperíodo são transmitidas por um caminho complexo que envolve etapas neurais e humorais. O fotoperíodo é primeiramente percebido pela retina e, então, o estímulo nervoso resultante é transmitido por um caminho neural que envolve o núcleo supraquiasmático e o gânglio cervical superior para glândula pineal, onde a mensagem modula o ritmo de secreção de melatonina. A duração da secreção de melatonina é, então, processada para regular a atividade do hipotálamo, hipófise e eixo gonadal. A melatonina é secretada somente na escuridão e, portanto, a duração da secreção difere entre os dias longos e curtos (KARSCH et al., 1988). A melatonina age no hipotálamo mediobasal para modular a pulsatilidade da secreção de GnRH (LINCOLN; MAEDA, 1992; MALPAUX et al., 1993).

Próximo ao final do anestro estacional, a atividade dos mecanismos inibitórios sobre a frequência e amplitude dos pulsos do LH está diminuída (KARSCH et al., 1988). A liberação da melatonina é o modulador nesse processo, tornando os centros hipotalâmicos de liberação tônica de GnRH menos sensíveis ao controle retrógrado negativo exercido pelo E₂, restaurando, progressivamente, os padrões de secreção de LH, com conseqüente estimulação da produção de E₂ pelos folículos ovarianos. Quando as concentrações de E₂ atingem o limiar estimulatório nos centros pré-ovulatórios de LH, ocorre o pico de liberação deste hormônio que promoverá a ovulação dos folículos que estejam suficientemente desenvolvidos (BICUDO; SOUSA, 2003).

Quando o primeiro pico pré-ovulatório de LH é induzido, os grandes folículos nem sempre estão maduros a ponto de responder a liberação de LH e desenvolverem um CL normal. Durante a fase de transição, tem-se observado fase lútea de curta duração, podendo ser resultado da ovulação de um folículo antral prematuro (LEGAN et al., 1985). O aumento da concentração plasmática de P₄ ocorre, aproximadamente, quatro dias antes da primeira ovulação da estação

reprodutiva, sugerindo a possibilidade de luteinização dos folículos anovulatórios (BARTLEWSKI et al., 1998) ou de um CL de curta duração (HUNTER et al., 1989).

As secreções circulantes de FSH sofrem poucas mudanças estacionais quando comparada com a liberação de LH (KARSCH et al., 1984). As concentrações de FSH estão relacionadas com a emergência de um folículo, durante e fora da estação reprodutiva (BARTLEWSKI et al., 1998).

2.1.3 Sincronização de estro

A sincronização de estro em bovinos e ovinos é uma biotécnica reprodutiva que permite a concentração da inseminação e da parição em épocas desejáveis dentro dos sistemas de produção (MORAES, 2002). O principal objetivo é conseguir sincronizar o momento da ovulação e trabalhar com Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).

É importante observar a diferença entre indução e sincronização de estro. Segundo Moraes (2002), a sincronização consiste em encurtar ou prolongar o ciclo estral através da utilização de hormônios ou associações hormonais que induzam a luteólise ou prolonguem a vida do corpo lúteo (CL). Ao contrário, a indução de estros consiste em induzir o estro de animais em anestro, pela utilização de hormônios ou práticas de manejo.

Existem diversos métodos de indução e sincronização de estro em pequenos ruminantes, tais como: efeito macho (LUCIDI et al., 2001), indução hormonal por esponjas vaginais de progesterona e injeção de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (GORDON, 1997), indução hormonal por implante de melatonina (TRALDI, 2000), uso de prostaglandinas (RUBIANES; MENCHACA, 2003), e utilização de fotoperíodo artificial (MOBINI et al, 2002).

A resposta ovariana em ovelhas e cabras à sincronização do estro varia com o tipo de esponja vaginal e de progestágeno utilizados, com o estágio da estação reprodutiva, com o estado nutricional, com o meio ambiente, com o estresse e com o efeito macho (AMARANTIDIS et al., 2004). Outros autores também consideram a raça, a época do ano e se a fêmea é nulípara ou plurípara (LUCIDI et al., 2001; CAVALCANTI, 2008).

Os tratamentos clássicos de indução e sincronização de estro com progestágenos em ovelhas são largamente usados e duram de 12 a 14 dias. A utilização de esponjas impregnadas com progesterona ou similares, por períodos longos, baseia-se no fato de que haverá período suficiente para que ocorra regressão luteal natural, sem a necessidade do uso de agentes luteolíticos independentemente da fase do ciclo estral (MENCHACA; RUBIANES, 2001). Porém, alguns autores (VIÑOLES et al., 2001; MENCHACA; RUBIANES, 2004) relatam que esses tratamentos resultam numa alta porcentagem de animais em estro, mas com fertilidade mais baixa do que a dos animais com estro natural.

Segundo Menchaca; Rubianes (2004) a explicação para isso é que durante o ciclo estral normal a concentração de progesterona aumenta gradualmente até a luteólise, o contrário do que acontece quando se utiliza dispositivos impregnados com progestágenos. Nesse caso, ocorre primeiramente uma alta concentração de progesterona (supraluteal) na circulação nos seis primeiros dias e após isso concentrações baixas (subluteais). E acrescentaram que, em ovelhas, concentrações subluteais de progesterona causam crescimento excessivo e persistência do maior folículo, pois promovem o aumento da pulsatilidade do LH sem, no entanto, promover o pico pré-ovulatório (VIÑOLES et al., 1999) aumentando desta forma a idade do folículo ovulatório (JOHNSON, 1996).

Já Viñoles et al. (2001) observaram que tratamentos de 12 dias com progestágenos induziram a ovulação de folículos velhos. Além disso, alguns autores relatam que inibem a emergência de uma nova onda folicular. Em contraste, altas concentrações de progesterona têm um efeito positivo no estímulo folicular diminuindo o crescimento do folículo dominante e promovendo a retroalimentação (*feed-back*) folicular. Fonseca e Bruschi (2006) obtiveram bons resultados em cabras com o uso de esponja intravaginal por seis e nove dias associada à aplicação de prostaglandina.

Até 1964 o controle da reprodução em ovelhas envolvia o uso de repetidas doses de P4 ou administrações orais de progestágenos; o tempo e o trabalho gastos constituíam um grande obstáculo para a aceitação do uso dessas técnicas comercialmente (GORDON, 1997). O período necessário à administração dos progestágenos tornou os métodos injetável e oral pouco práticos em relação ao manejo (GODFREY et al., 1997). A administração de progestágenos se tornou comercialmente viável através dos esforços de Robinson e seus colaboradores, em

Sydney (ROBINSON, 1967; GORDON, 1997), que desenvolveram esponjas intravaginais impregnadas com progestágeno.

2.1.3.1 Implantes vaginais

Desde os primeiros trabalhos realizados por Robinson em 1967, implantes intravaginais impregnados por progesterona têm sido utilizados para sincronização e indução de estro, bem como para pré-tratamento em programas de superovulação em cabras e ovelhas (MENCHACA; RUBIANES, 2004; SUÁREZ et al., 2006). Entretanto, na retirada do implante ao término do tratamento freqüentemente observa-se uma descarga vaginal pútrida (SCUDAMORE, 1988; SUÁREZ et al., 2006) acompanhada de aumento na microbiota bacteriana vaginal (AMIN, 1996; SUÁREZ et al., 2006).

Dentre os diversos tipos existentes, os implantes intravaginais de progesterona (CIDR) e as esponjas intravaginais impregnadas com progestágenos, como o acetato de medroxiprogesterona (MAP) ou o acetato de fluorogestona (FGA), são comumente utilizados para sincronização do estro em ovelhas (DELIGIANNIS et al., 2005; LUTHER et al., 2007). Segundo Martinez-Garcia et al (2007) os tratamentos com progestágenos exercem seu efeito alterando a liberação de gonadotrofinas, o crescimento folicular e o ambiente uterino.

A liberação inicial de progestágeno das esponjas intravaginais é alta, mas diminui 63% entre dois e 13 dias de uso (GREYLING et al., 2004). Similarmente, a liberação de progesterona do CIDR resulta em um aumento nas concentrações plasmáticas de progesterona durante três a quatro dias e a partir do sexto dia essas concentrações diminuem (WHEATON et al., 1993; RUBIANES et al., 1998). Ao final do tratamento por 12 dias com esponjas impregnadas com MAP, Barret et al. (2004) obtiveram concentrações plasmáticas de progesterona entre 0 e 1ng/mL, o que corresponde a concentrações subluteais.

Em bovinos, se forem mantidas concentrações subluteais de progesterona (1 a 2 ng/mL) ocorrerá o crescimento prolongado do folículo ovulatório, dando origem a folículos persistentes (SIROIS; FORTUNE, 1990), devido ao aumento na freqüência dos pulsos de LH (MIHM et al., 1999). Estas concentrações de progesterona ocorrem quando as fêmeas bovinas, sem atividade de CL, são tratadas com

dispositivo intravaginal por longos períodos e a liberação de progesterona do dispositivo diminui (SIROIS; FORTUNE, 1990). Nesta espécie, os oócitos dos folículos persistentes sofrem maturação prematura *in vivo*, ou seja, uma precoce resolução da meiose, o que provavelmente favorece a baixa fertilidade (REVAH; BUTLER, 1996). A meiose encontra-se parada no estágio de diplóteno e normalmente se reinicia com o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas. Estas suprimem a produção do fator inibidor de meiose pelas células da granulosa, desencadeando seu reinício (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Bicudo; Sousa (2003) testaram em ovelhas um protocolo de indução/sincronização de estro de curta duração (seis dias) comparando-o ao protocolo tradicional de longa duração (12 dias), durante a estação reprodutiva, em 260 ovelhas da raça Suffolk, na região de Araçatuba, SP. Foi utilizada esponja vaginal impregnada com 60mg MAP associada a 100µg de cloprostenol e 350 a 400 UI de eCG via intramuscular dois dias antes da retirada da esponja (D4) no protocolo de curta duração e no momento da retirada do implante no protocolo de longa duração. No D6 ou D12 a esponja vaginal foi removida. Verificou-se que no período compreendido entre 55 e 72 horas, os percentuais de ocorrência de estro foram 100% no protocolo de curta duração e 88,5% no de longa. O protocolo curto apresentou menor dispersão na manifestação do estro e foi eficaz na indução/sincronização do estro de ovelhas durante a estação reprodutiva, com a totalidade delas manifestando estro em até 72 horas após a retirada do implante de progesterona.

Dixon et al. (2006) compararam o uso de dois CIDR's por 12 dias com o estro natural e observaram 97,7% das ovelhas em estro 60h após a introdução do macho no grupo tratado e 41,6% no grupo controle ($P < 0,01$). Apesar da diferença do número de animais em estro, os autores não observaram diferenças no desenvolvimento folicular e na taxa de concepção. Este estudo demonstrou que a sincronização com uma maior concentração de progesterona (dois dispositivos) resulta em grande resposta de estro, porém a fertilidade se mantém comparável a obtida com estro natural, em contraste à redução na fertilidade nas ovelhas tratadas com baixas dosagens de progesterona observadas em alguns estudos (ALLISON; ROBINSON, 1970; VIÑALES et al., 2001), embora não em outros (EVANS et al., 2001).

Em outro estudo, Viñoles et al. (2001) comparando a duração do tratamento com progestágenos em ovelhas reportaram que um tratamento longo, de 12 dias de duração, provocaram a ovulação de folículos com idade de $7,8 \pm 0,2$ dias em comparação aos folículos de $5,4 \pm 0,4$ dias do tratamento curto (seis dias). Essas diferenças foram refletidas na fertilidade, que foi menor no grupo com tratamento longo (63%) quando comparado com o grupo com tratamento curto (87%).

Prosperi et al. (2003) avaliaram a utilização de esponjas intra-vaginais contendo MAP por um período de seis dias contra nove dias em cabras Saanen nulíparas e a taxa de gestação foi de 100% nos dois grupos avaliados, mostrando assim, a eficácia da indução do estro em protocolos curtos em caprinos.

Fonseca et al. (2005) conseguiram bons resultados em cabras Toggenburg com o uso de esponja intravaginal associada à aplicação de prostaglandina. E observaram que 89,5% e 84,2% das fêmeas apresentaram estro após o tratamento com progestágenos de seis e nove dias, respectivamente ($P > 0,05$).

Em experimento com ovelhas rabo largo no Irã, Shahneh et al. (2006) observaram, durante o anestro, que sete dias de tratamento com progesterona (CIDR) comparado com 12 dias, ambos associados a 600 UI eCG, aumentou significativamente a taxa de gestação no primeiro estro após a introdução do carneiro ($70 \pm 4,8\%$ vs $37,5 \pm 5,2\%$).

Knights et al. (2001) demonstraram que o pré-tratamento com progesterona por cinco dias antes da introdução do macho foi suficiente para induzir o estro em ovelhas e aumentar as taxas de gestação de 20% para 77%. Os autores enfatizaram que o período mínimo de exposição à progesterona, necessário para induzir o comportamento de estro seria, provavelmente, de três a cinco dias. E associaram que o aumento da fertilidade em ovelhas sincronizadas com altas dosagens de progesterona pode ser devido à melhora do transporte espermático, à sincronia no início do estro com o pico de LH ou ao padrão de desenvolvimento folicular.

2.1.4 Microbiota vaginal

O trato genital feminino possui características únicas que favorecem o crescimento de microrganismos específicos. É composto de diversos microambientes, tais como o epitélio escamoso vaginal, o epitélio colunar da cérvix e

as glândulas cervicais. Cada um desses locais hospeda sua própria microbiota bacteriana com uma pequena diferença de padrão bioquímico e físico, fortemente associado com as características da microflora bacteriana (BEZIRTOGLOU et al., 2008).

Estudos realizados em mulheres demonstraram que a microbiota vaginal não é uma entidade estática, apresentando um padrão dinâmico, com variações ocorrendo durante o ciclo reprodutivo (BARA et al., 1993; BEZIRTOGLOU et al., 2008). Esta modificação também está correlacionada ao grau de maturação do epitélio vaginal (BEZIRTOGLOU et al., 2008). Em cadelas, resultados similares demonstrando a influência da progesterona como fator predisponente a infecções vaginais e uterinas foi também descrita (DHALIWAL et al., 1999), demonstrando que aparentemente este mecanismo se mantém em todas as fêmeas de mamíferos.

Embora microrganismos estejam adaptados a mudanças no seu ambiente, estes são caracteristicamente afetados tanto quantitativamente quanto qualitativamente por mudanças no substrato em que eles se desenvolvem. Como exemplo, observa-se que as mudanças reprodutivas na mulher demonstram variações fisiológicas e hormonais que são invariavelmente acompanhadas por alterações da microbiota (BARA et al., 1993; BEZIRTOGLOU et al., 2008).

Existem evidências clínicas que alterações hormonais influenciam na manifestação de episódios de candidíase vulvovaginal havendo grande incidência de vaginite por *Candida albicans* em mulheres gestantes, mulheres recebendo doses elevadas de estrogênio contraceptivo ou em tratamento de reposição de estrogênio no período pós-menopausa. O estradiol seria responsável por estimular *C. albicans* a mudar da forma leveduriforme para a forma filamentar que atravessam o epitélio vaginal cornificado após tratamento com este hormônio. Por outro lado, a progesterona parece ter um efeito inibitório na patogenicidade de *Candida sp.*, possivelmente por inibição da função dos monócitos (SONNEX, 1998).

A microbiota de cada tecido é um ecossistema em miniatura que é afetado por uma variedade de fatores endógenos e exógenos. Em particular a cérvix e vagina representam nichos verdadeiros para organismos específicos, sendo predominantemente observados Lactobacilos (50-75%) na microbiota normal da mulher (BEZIRTOGLOU et al., 2008) e ovelhas (MARTINS et al., 2009).

Este gênero possui papel crítico ao prevenir a excessiva proliferação de microrganismos, impedindo o aparecimento de cervicites e vaginites. Este efeito é

resultado da associação entre os lactobacilos e o epitélio vaginal, levando à formação de uma biopelícula que o protege (MARTIN et al., 2008).

É importante frisar que, na mulher e na rata, a recuperação de bactérias anaeróbicas, caracterizando uma microbiota bastante diversificada, composta por microrganismos tais como *Bacteroides* (34%), *Peptococcus* (32%), *Clostrídium* (17%), *Eubacterium* (10%), *Fusobacterium* (8%), *Bifidobacterium* (3%) e *Veillonella* (2%) e aeróbicas facultativas tais como *Staphylococcus epidermidis* (35-80%), *S. aureus* (5-15%) e *Streptococcus sp.* (40%) em número significativo é determinante para a função balanceada do epitélio vaginal (BARA et al., 1993; BEZIRTZOGLU et al., 2008).

Alterações relativas a gêneros bacterianos e frequência de isolamento também foram identificadas em fêmeas caprinas (BARA et al., 1993; DHALIWAL, 2001) e bovinas (OTERO et al., 2000), estando relacionadas a oscilações hormonais características do ciclo estral, em especial durante a fase estrogênica (BARA et al., 1993; OTERO et al., 2000; DHALIWAL, 2001).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* têm sido descritas como membros da microbiota normal da vagina de primatas não-humanos como chimpanzés, babuínos, bugios e macacos Rhesus. O gênero *Staphylococcus* está presente também na microbiota de mico leão dourado tendo sido recuperado em 100% das amostras de swabs vaginais. Nestes primatas, *Staphylococcus* coagulase negativa foi o mais freqüentemente encontrado, representando 68% dos isolados. A espécie mais isolada foi *S. simulans* seguida de *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* e *S. arlettae* (LILENBAUM et al., 2006).

Sob condições naturais o ambiente é estável, protegendo o hospedeiro de microrganismos patogênicos ou saprófitas potencialmente patogênicos. Esta microbiota é composta de bactérias dos gêneros *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* e, em menor escala, de membros do grupo coliformes. *Staphylococcus* coagulase negativa e *Streptococcus* α -hemolítico são também isolados da vagina de vacas adultas durante diversos períodos do ciclo reprodutivo. Com relação ao grupo coliforme a espécie mais observada é *Escherichia coli* (OTERO et al., 2000).

Em bovinos, o número de Lactobacilos observado é pequeno, contrariamente aos resultados descritos para a vagina humana, do camundongo e macaco, entretanto este número aumenta com a maturidade hormonal e durante o estro. Estes, assim como no ser humano, têm importante participação na defesa do trato

reprodutor. Este fato pode ser confirmado pela inoculação intra-uterina de Lactobacilos, haja vista que esta foi capaz de estimular as células do sistema imune (OTERO et al., 2000).

Já PETIT et al. (2009) e SHELDON et al. (2008) complementam que, além de *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.* também pode ser isolado de fêmeas saudáveis. Os mesmos autores, em vacas com alterações reprodutivas, verificaram a presença de *Arcanobacterium pyogenes*, *E. coli* e anaeróbios Gram negativos, tais como *Fusobacterium necrophorum* e *Prevotella melaninogenica*.

Em búfalas este achado é corroborado por Jadon et al. (2005). Estes autores citam como organismos componentes da microbiota *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *E. coli*, *Corynebacterium spp.*, *Proteus spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Segundo BARON et al (1994) a frequência de *Staphylococcus spp.* coagulase negativa está diretamente associada a facilidade de acesso a região cérvico-vaginal, por ser membro da microbiota normal da superfície epitelial íntegra e genitália externa, uma vez que nesses locais o meio ambiente é favorável ao seu desenvolvimento. Para a espécie *Streptococcus spp.* sua ocorrência também pode ser atribuída às adaptações que permitiram que estes microrganismos encontrassem condições favoráveis ao seu desenvolvimento na região genital, proporcionado pelo fácil acesso e ampla distribuição no meio ambiente (SAWYER, 1977).

No entanto, espécies patogênicas dos *Streptococcus spp.* foram descritas na mucosa do trato genital de fêmeas caprinas (CARTER, 1988). Já *Staphylococcus coagulase positiva* é uma bactéria comensal de pele e membranas mucosas, além de possuir grande capacidade de sobreviver no hospedeiro animal. Porém, em situações de diminuição da resposta imunológica do hospedeiro, torna-se responsável pelo desencadeamento de desordens infecciosas (MAHAJAN; KATOCH, 1997).

A presença de *E. coli* é atribuída também à facilidade de acesso à cérvix e vagina, decorrente da disposição anatômica da vulva nas fêmeas caprinas (FASANYA et al., 1987). Já a presença de *Staphylococcus aureus* e *E. coli* foi evidenciada em swabs vaginais de cabras pluríparas e primíparas até 25 dias após parto (ABABNEH; DEGEFA, 2006).

Em ovelhas a presença de *Achromobacter spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp.* e *E.coli.* na microbiota normal da vagina e cérvix foi descrita (SAWYER, 1977).

2.1.4.1 Mecanismos de defesa imune da vagina

A vagina, cérvix e útero de fêmeas humanas e muitos animais domésticos contém diversas células do sistema imune que são responsáveis tanto pela imunidade inata quanto pela específica. Entretanto, o número e atividade da maioria destes tipos celulares varia significativamente durante as fases do ciclo reprodutivo, o que se acredita ser controlado por mudanças na concentração de hormônios sexuais femininos, tais como estradiol e progesterona (BARA et al., 1993; BEAGLEY; GOCKEL, 2003). Em mulheres, foi demonstrado que o recrutamento de neutrófilos para o trato reprodutor feminino, concentração de anticorpos nos fluidos cérvico vaginais, respostas de células T e susceptibilidade a doenças sexualmente transmissíveis são afetadas pelo estágio do ciclo estral (BEAGLEY; GOCKEL, 2003).

Além das defesas específicas, características próprias do ambiente vaginal interferem na microbiota local. O pH fisiológico da vagina é de aproximadamente 4,0. Este ambiente ácido inibe parcial ou totalmente o desenvolvimento da maior parte das bactérias procedentes do trato digestivo e do ambiente, sendo assim um mecanismo de proteção da mucosa muito eficaz. Já em casos de vaginite, o exsudato verificado apresenta pH próximo à neutralidade (MARTINS et al., 2008).

Na maioria das fêmeas, inclusive em vacas e ovelhas, o útero parece ser capaz de impedir as bactérias, que normalmente o colonizam no pós parto, de se proliferarem e causarem infecções (LEWIS, 1997; SEALS et al., 2002 a,b).

Segundo Sonnex (1998) as citocininas e os hormônios sexuais possuem um papel central na regulação da resposta imune de mucosas no trato reprodutor feminino. A presença de progesterona leva a um comprometimento da função imune enquanto que a presença de estrógenos, na maioria das circunstâncias está associada com função imune elevada (EWIS, 1997; RAMADAN et al, 1997). Uma curta exposição à progesterona luteal ou exógena irá desregular as funções imunológicas e, em alguns animais, inclusive em ovelhas, transformar o útero de um

órgão resistente a um órgão susceptível a infecções (BLACK et al., 1953; ROWSON et al., 1953; SEALS et al., 2002b; LEWIS, 2003a; SEALS et al., 2003).

Porém, pouco além do fato da progesterona induzir a síntese uterina de proteínas imunossupressoras é conhecido sobre o mecanismo responsável na transformação do útero de resistente a susceptível a infecções (RAMADAN et al., 1997; SEGERSON et al., 1997, SEALS et al., 2002b; LEWIS, 2003b; SEALS et al., 2003).

Uma explicação para este fato parece ser a influência deste hormônio na síntese de compostos biologicamente ativos, tais como prostaglandinas e leucotrienos. Estudos demonstram que a PGE_2 pode levar a redução, principalmente da função de células de defesa, mais precisamente linfócitos e neutrófilos, e a $PGF_2\alpha$ ao aumento da função das células relacionadas à imunidade (TIZARD, 1996; SEALS et al., 2002b, SEALS et al., 2003; WULSTER-RADCLIFFE et al, 2003).

Logo, mudanças no padrão de secreção de $PGF_2\alpha$ e PGE_2 podem mediar o efeito da progesterona na resposta à infecção bacteriana. Este fato pode ser confirmado pela inoculação intra-uterina com bactérias patogênicas em ovelhas no pós-parto ou ovariectomizadas neste período. A ausência fisiológica de progesterona observada nestes casos não parece favorecer a ocorrência de infecções do trato reprodutivo; no entanto, após tratamento com progesterona de origem exógena, tal ocorrência parece ser aumentada, conforme verificada para diversas espécies, como vacas, porcas e coelhas (SEALS et al., 2002b).

Sob a influência da progesterona, linfócitos apresentam uma resposta proliferativa reduzida, além de redução da quimiotaxia de neutrófilos, produção de anions superóxido e destruição final de patógenos (SEALS et al., 2003).

Estrógenos aumentam a migração neutrofilica e a quimiotaxia. Influenciam também a resposta humoral, uma vez que aumentam a produção de IgM em resposta a antígenos T dependentes, aumentam a expressão de imunoglobulinas nas células plasmáticas e a proliferação de células B (SONNEX, 1998).

As mudanças endócrinas durante o ciclo estral regulam os níveis de IgA e IgG nas secreções uterina e cérvico-vaginal de ratas. Durante o estro há um decréscimo da concentração nível de IgG na vagina, um fato provavelmente relacionado à diminuição da transudação de IgG do soro, secundária ao espessamento do epitélio vaginal que ocorre neste estágio do ciclo. O aumento de células plasmáticas IgA nos tecidos genitais do camundongo durante o proestro e estro parece estar

correlacionado ao aumento de IgA neste momento. Com relação à apresentação antígeno vaginal esta é inibida pelo estradiol, mas não pela progesterona (SONNEX, 1998).

Em ovelhas a porcentagem de linfócitos na veia cava e estímulo à atividade mitótica dos linfócitos B e T foram maior durante o estro que no diestro. Estas fêmeas em estro foram resistentes à infecção uterina, porém o mesmo não foi observado no diestro (EWIS, 1997).

Os hormônios ovarianos parecem ser fatores reguladores que favorecem a presença de uma grande variedade de bactérias que são membros da microbiota normal do trato genital. Como exemplo, a presença de *Lactobacillus* na microbiota vaginal está associada a efeitos protetores contra várias bactérias patogênicas (BEZIRTOGLOU et al., 2008).

É importante relatar que o trato urogenital e o trato urinário baixo são sensíveis aos efeitos do estrogênio e progesterona durante a vida adulta, enquanto que disfunções ovarianas resultam em alterações anormais da microbiota. Estudos epidemiológicos na mulher implicam a deficiência de estrogênio na etiologia de sintomas do trato urinário baixo e seu aumento na incidência de infecções urogenitais que acontecem após a menopausa. Também em ratas ovariectomizadas observa-se o aumento de *Lactobacillus*, assim como de *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. perfringens* e *Bacteroides* (BEZIRTOGLOU et al., 2008).

A resposta uterina a infecção por *E.coli* e *A. pyogenes* durante o estro e a fase luteal do ciclo estral em porcas foi semelhante à resposta uterina reportada em ovelhas e vacas. Funções de defesa, mensuradas pela proliferação de linfócitos e alterações nos demais leucócitos, podem ser confirmadas com o estabelecimento ou ausência de infecções uterinas foram aumentadas no estro e diminuídas durante a fase luteal. Na presença ou ausência de contaminação bacteriana intrauterina, a atividade linfocitária se altera durante o ciclo estral na espécie suína (WULSTER-RADCLIFFE et al, 2003).

Durante a fase folicular, o número de linfócitos circulantes disponíveis parece aumentar enquanto o de neutrófilos parece diminuir. O aumento no número de linfócitos da veia cava pode refletir o movimento das células imunocompetentes dos tecidos linfóides secundários para o sangue. A diminuição dos neutrófilos circulantes pode ser atribuída ao movimento dos neutrófilos da corrente circulatória para o útero

para combater organismos patogênicos que entram no útero durante a cobertura (WULSTER-RADCLIFFE et al, 2003).

A progesterona reduz a atividade de moléculas inflamatórias e inibe a produção de interleucinas (IL), principalmente IL-8 que estimulam a quimiotaxia, além da liberação de superóxidos e liberação de grânulos pelas células fagocitárias nos tecidos reprodutivos. Esta também suprime a produção de IL- 6 e IL-12, que promovem respectivamente a diferenciação de células B e produção de proteínas da fase aguda, e indução da produção de interferon- γ e aumento da citotoxicidade das células “natural killer” (LEWIS; WUSLTER-RADCLIFFE, 2006).

2.2 ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA VAGINAL

2.2.1 Vaginites

Uma das alterações mais freqüentes no trato genital das diversas espécies de mamíferos é a vaginite (LILENBAUM et al., 2006; ROOT-KUSTRITZ, 2006), que pode ocorrer como resultado de infecção ascendente ou exposição a substâncias irritantes, ou secundária a alterações como pneumovagina, urovagina, laceração perinatal, fístula retovaginal, acasalamento, endometrite, aborto, parto ou distocia (SMITH, 2006). Ocasionalmente as feridas traumáticas podem ser infectadas com microrganismos anaeróbios, entretanto a maior parte das infecções é inespecífica (LILENBAUM et al., 2006; SMITH, 2006).

A vaginite pode contribuir para doenças clínicas e até aborto séptico, sendo usualmente caracterizada por sintomas clínicos como hiperemia da vagina, descarga amarelada e leucócitos vaginais abundantes (DONDEERS et al., 2002).

2.2.1.1 Anormalidades de origem traumática

Infecções vaginais em vacas têm sido observadas após o término do tratamento com implantes vaginais (PRID) (BULMAN et al., 1978). Situação semelhante ocorre em ovelhas, sendo observado que a população bacteriana retorna ao número similar ao observado antes da inserção da esponja dois dias após sua retirada (AMIN, 1996; SUÁREZ et al., 2006).

A diversidade de crescimento de colônias diminui claramente do dia 5 ao 13 após o tratamento com esponja vaginal, sugerindo que não há competição entre as bactérias. Outro ponto importante que precisa ser elucidado é a influência dos progestágenos nos componentes do sistema imune que respondem ao crescimento bacteriano (SUÁREZ et al., 2006).

Tais mudanças na microbiota vaginal podem ser atribuídas à ação física dos implantes, pois estes funcionam como corpos estranhos, capazes de provocar reações inflamatórias (AL-HAMEDAWI et al., 2003; SUÁREZ et al., 2006; TECNOPEC, 2007), e também devido à constante absorção e retenção das secreções vaginais pelos implantes durante o tratamento hormonal, o que estimula o crescimento das bactérias (AL-HAMEDAWI et al., 2003; SUÁREZ et al., 2006).

As esponjas são os dispositivos que causam maior intensidade de reação por parte da fêmea. Sua constituição à base de espuma de poliuretano, material poroso e altamente irritante, pode provocar vaginites supurativas de grande intensidade, além de aderências do material à mucosa, podendo interferir com a fertilidade dos animais. É importante frisar que as esponjas também impedem a saída do muco produzido durante a fase estral, criando condições favoráveis à proliferação de bactérias e possível instalação de infecções secundárias (TECNOPEC, 2007)

Além deste fato, a presença de refluxo vaginal (coleção muco-purulenta) tem sido correlacionada com a alta ocorrência de estruturas não-fertilizadas em ovelhas superovuladas, determinando desta forma prejuízo no desenvolvimento embrionário e também a uma baixa taxa de fertilidade dos embriões transferidos (SCUDAMORE, 1988; SUÁREZ et al., 2006).

Para minimizar estes efeitos recomenda-se a utilização de antimicrobianos no momento da inserção das esponjas. No entanto, a microbiota vaginal parece não se diferenciar significativamente com o uso de tetraciclina nas esponjas (AHERN, 1976; SUÁREZ et al., 2006), enquanto a aplicação de gentamicina parece ser eficiente na prevenção das vaginites em decorrência do uso de implantes em cabras (GUERRA et al., 2002; SUÁREZ et al., 2006).

Suárez et al. (2006) avaliaram as mudanças na microbiota bacteriana aeróbica vaginal, bem com a sua susceptibilidade a diferentes antibióticos em ovelhas tratadas com implantes de progesterona por diferentes períodos. Os autores observaram que diferentes intervalos de tratamento com implantes de progesterona

não afetaram a capacidade da ovelha em controlar a vaginite determinada pelo uso dos implantes, ou seja, a microbiota bacteriana voltou à normalidade quando a fêmea entrou em estro em decorrência do protocolo de indução de cio. Os autores observaram ainda que a cefalotina e a gentamicina foram as drogas mais eficientes em prevenir o crescimento microbiano.

Com o surgimento dos dispositivos de progesterona de silicone, vários avanços foram obtidos, se comparados às esponjas vaginais. No tocante à ocorrência de vaginites, estes dispositivos se mostraram bem menos irritantes, gerando inflamações de pequena intensidade sem aderências. Além disso, como não obstruem a liberação do muco produzido na fase estral, não se notam mais a instalação de infecções secundárias, ou seja, as vaginites são de baixa gravidade, auto-limitantes e não interferem na fertilidade da fêmea (TECNOPEC, 2007).

Entretanto, verificou-se que a incidência de vaginites é maior durante a reutilização dos dispositivos de silicone. Este fato pode ser explicado pela utilização de desinfetantes irritantes à mucosa vaginal, como os produtos à base de iodo, cloro e amônia quaternária, freqüentemente utilizados na higienização dos dispositivos. Esses produtos químicos, ao agregarem-se ao silicone, produzem uma irritação relativamente séria na vagina e a conseqüente vaginite com presença de secreção (TECNOPEC, 2007).

Em contrapartida Villarroel et al. (2004) demonstraram que a reação local ao implante utilizado em vacas não influenciou na taxa de gestação, quando comparado a fêmeas não tratadas, apesar de 50% das vacas tratadas terem apresentado vaginite localizada. Porém, no estudo de Walsh et al. (2007a) a progesterona diminuiu a quantidade de descarga vaginal no momento da remoção do implante, uma vez que 65% das vacas testadas não demonstraram evidências de vaginite, 28% tiveram pequena quantidade de secreção vaginal e apenas 6% apresentaram sinais evidentes de vaginite. Este fato também não afetou a taxa de gestação ao primeiro serviço. Verificou-se ainda uma cultura baixa ou moderada de bactérias não patogênicas após 14 dias de tratamento com implante, e nenhum crescimento foi observado em amostras coletadas sete dias após a anterior (WALSH et al., 2007b).

Em humanos a utilização de dispositivos intrauterinos também é implicada no desenvolvimento de vaginites uma vez que estes inibem o desenvolvimento dos lactobacilos. Já em cabras o uso de implantes intravaginais de liberação lenta de progesterona leva a problemas relacionados à vaginite, além de apresentar

implicações negativas para o estabelecimento de limites legais de resíduos deste hormônio no leite (LÓPEZ-SEBASTIAN et al., 2007).

2.2.1.2 Anormalidades de origem parasitária

A principal enfermidade de origem parasitária da esfera reprodutiva é a tricomoníase. Esta é uma infecção venérea de bovinos causada pelo protozoário flagelado *Tritrichomonas foetus*. A infertilidade é caracterizada por alta porcentagem de animais retornando ao estro ou encontradas não-prenhes depois da estação de monta. Piometras e abortamentos ocasionais são os sinais clínicos mais comuns desta enfermidade. Os abortamentos geralmente ocorrem na primeira metade da prenhez com índices entre 5 e 30%, e a placenta pode ser expelida ou ficar retida (PELLEGRIN, 1997). *Tritrichomonas foetus* ao início da infecção produz vaginite granulosa com grânulos de cor cinza a cinza amarelado nas fêmeas. Muitas vezes há discreto corrimento catarral ou catarral purulento, porém esta fase geralmente passa despercebida (PELLEGRIN, 1997).

A tricomoníase é transmitida por via venérea de machos infectados para fêmeas e vice-versa. Os microrganismos colonizam a vagina, cérvix, útero, e tubas uterinas, contudo sem interferirem, em geral, na concepção. Com frequência ocorre morte embrionária nos dois primeiros meses de infecção, seguida por um período de dois a seis meses de imunidade à reinfecção. A eliminação da infecção em vacas ocorre comumente dentro de 95 dias, raramente persistindo até seis meses (SMITH, 2006).

2.2.1.3 Anormalidades de origem infecciosa

2.2.1.3.1 Infecções específicas

A campilobacteriose genital bovina é uma doença infecciosa de caráter venéreo, determinada pelo *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis*. A doença é responsável por prejuízos econômicos na bovinocultura por causar repetições de cio, morte embrionária e esterilidade enzoótica das fêmeas infectadas (DEKEYSER, 1984) como resultado de cervicite, endometrite e salpingite (STOESSEL, 1982).

O histórico usual inclui alta porcentagem de vacas expostas pela primeira vez retornando ao estro ou encontradas não prenhes depois da estação de monta ou vacas parindo tardiamente porque retornaram ao estro uma ou mais vezes (SMITH, 2006). A infecção geralmente resulta em doença subclínica que, muitas vezes, passa despercebida na maioria das propriedades (STOESSEL, 1982).

Após uma semana de infecção vaginal, o microrganismo se estabelece no útero causando endometrite mucopurulenta que persiste por três a quatro meses. A infecção intrauterina impede a concepção ou causa morte embrionária e as novilhas infectadas retornam ao estro por volta de 40 dias (SMITH, 2006).

Já a candidíase é classificada como uma levedurose com apresentações clínicas múltiplas ocorrendo sob forma aguda, subaguda e crônica determinada por *Candida albicans*. Este microrganismo se adere às células do trato gastrointestinal, vaginal, da mucosa oral, da córnea, dos endotélios vasculares e plaquetas por meio de um componente glicoprotéico da sua parede (ASBURY; LYLE, 1993). Como as mucosas normais são o habitat do fungo, não há medidas profiláticas a recomendar e é fato que a *Candida albicans* aproveita baixa de resistência local, tratamentos prolongados com antibióticos e outros estados em que haja desequilíbrio de flora ou de resistência do animal para desenvolver a patogenicidade (GENOVEZ, 1997).

Além dos agentes acima citados algumas viroses podem desencadear um processo de vaginite. Em bovinos o herpesvírus-1 bovino é o agente etiológico da rinotraqueíte infecciosa bovina, que tem como um dos sintomas reprodutivos a vulvovaginite pustular infecciosa, caracterizada por micção freqüente, elevação da cauda e corrimento vaginal moderado. A vulva fica edemaciada, com pequenas pápulas, seguida de erosões e úlceras na superfície da mucosa. Estas úlceras podem se unificar, levando a destruição do tecido necrótico acastanhado (RADOSTITS et al., 2000).

2.2.1.3.2 Infecções inespecíficas

Mudanças no ambiente vaginal podem desenvolver alterações na microflora, como por exemplo, modificações no pH durante o estro ou gestação (MARTINS et al., 2008). Assim, a vaginite pode ser determinada por microrganismos que agem como invasores oportunistas secundários (ROOT-KUSTRITZ, 2006) impedindo o

desempenho reprodutivo e determinando importantes prejuízos (MARTINS et al., 2008).

Dentre os microrganismos oportunistas, membros do gênero *Staphylococcus* sp foram descritos, não só em ovelhas (SAWYER, 1977), mas também em outros ruminantes como vacas (OTERO; NADER-MACÍAS, 2006) e cabras (ABABNEH; DEGEFA, 2006). Além destes, os coliformes, principalmente a espécie *Escherichia coli* tem sido freqüentemente descrita, não somente em ovelhas (SARGISON et al., 2007), mas também em outros animais de produção, como cabras (ABABNEH; DEGEFA, 2006) e vacas (SHELDON et al., 2008).

Em suínos, culturas bacterianas mistas foram isoladas de casos clínicos de descarga vulvar, incluindo *E. coli*, *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., *Pasteurella multocida*, *S. aureus*, *Eubacterium suis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Haemophilus* spp., *Proteus* spp., *Actinobacillus* spp., *Streptococcus uberis*, *S. faecium* e *S. faecalis* (BARA et al., 1993).

2.3 O GÊNERO *Staphylococcus* sp.

2.3.1 Características gerais

Os estafilococos pertencem à família *Staphylococcaceae* ao gênero *Staphylococcus*. São microrganismos esféricos, Gram-positivos, imóveis, com 0,8-1,0 nm de diâmetro. Não formam esporos e em algumas amostras produzem cápsula. São anaeróbicos facultativos, crescem bem em ágar-sangue incubado a 37°C e em 24 horas produzem colônias. A patogenicidade dos estafilococos é bastante variável com a amostra ou raça e se relaciona com uma série de enzimas e toxinas que esses microrganismos podem produzir. Entre as espécies do gênero, as três mais patogênicas são *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (BRITO et al., 2002).

O habitat natural primário dos estafilococos é a superfície corporal dos mamíferos. A resistência destas bactérias é excepcional considerando serem microrganismos na maioria das vezes sem cápsula e sempre sem esporos: resistem a 60°C por meia hora, ao fenol a 2% por 15 minutos e ao formol a 10% por 10 minutos; no pus dissecado e em crostas de feridas sobrevivem por vários meses, o

que explica sua permanência em ambientes contaminados (BRITO et al., 2002; SÁ et al., 2004).

2.3.2 Principais enfermidades reprodutivas determinadas nos ovinos

Foi demonstrado que *Staphylococcus aureus* é o microrganismo mais comumente isolado de vaginites em ovelhas e pode ocorrer associado a eritema, descarga amarelada e leucócitos vaginais abundantes (DONDEERS et al., 2002). Amostras deste gênero têm sido isoladas da genitália (MARSHALL et al., 1983) de ovelhas, assim como em infecções intrauterinas ascendentes (MAVROGIANNI et al., 2007), sendo capazes de causar morte embrionária precoce (MARTINS et al., 2008).

2.3.3 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Membros do gênero *Staphylococcus* apresentam padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos bastante variável, o que pode comprometer a eficácia da terapia com antibióticos (LILENBAUM et al., 1999; MARTINS et al., 2008). Sendo assim, um melhor entendimento da espécie de estafilococos que ocorrem na microbiota vaginal e sua susceptibilidade a agentes antimicrobianos pode contribuir para um manejo correto da vaginite assim como de outras infecções do trato reprodutivo de ovelhas.

Estafilococos isolados de diferentes espécies e em diferentes países podem apresentar padrões muito semelhantes de resistência aos antimicrobianos, o que sugere que esta resistência pode ser inerente a população vaginal de estafilococos de ruminantes (MARTINS et al., 2009).

O padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos de *S. aureus* e *S. epidermidis* de origem bovina foi estudado por Nunes et al. (2007), que descreveram uma alta resistência a penicilina G e baixa resistência a gentamicina. Uma alta susceptibilidade destas bactérias a cefalosporina também foi reportada, o que concorda com achados de estafilococos originários de ovelhas (MARTINS et al., 2009).

Em primatas, a resistência a antibióticos foi frequentemente observada e 88% dos isolados apresentaram resistência a pelo menos uma droga. Resistência foi observada principalmente a penicilina G, tetraciclina, rifampicina, ampicilina e

estreptomicina. Os agentes antimicrobianos mais ativos contra *Staphylococcus* isolados da vagina de mico leões dourados sadios foram o cloranfenicol e a gentamicina (LILENBAUM et al., 2006).

2.4 BASTONETES GRAM-NEGATIVOS: COLIFORMES

2.4.1 Características gerais

Escherichia coli é uma enterobactéria Gram-negativa cujo isolamento é relativamente fácil. É membro da microbiota normal dos intestinos, sendo bastante resistente à dessecação e, em fezes ao abrigo do sol, pode manter-se viva por várias semanas, bem como na água e alimentos contaminados por fezes. Apesar de ser mais resistente que outras enterobactérias, os desinfetantes comuns como os cresóis são bastante eficientes contra a espécie (CHEN et al., 2003). Os coliformes formam um grupo de bactérias de origem fecal que agem como patógenos oportunistas no trato reprodutivo. Elas apresentam um grande e variável padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos, o que compromete a eficácia das terapias empíricas com antibióticos (CARSON et al., 2008).

2.4.2 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Como existe pouca informação científica a respeito do uso de antibióticos no controle de infecções reprodutivas em ovelhas (SUÁREZ et al., 2006), um melhor conhecimento das espécies de bactérias que ocorrem nas vaginites e sua susceptibilidade aos agentes antimicrobianos pode contribuir para um melhor tratamento da vaginite assim como outras infecções do trato reprodutivo de ovelhas. Carson et al. (2008) não evidenciaram resistência deste microrganismo a ceftriaxona, gentamicina, ácido nalidíxico e ciprofloxacina. Menos de 1% dos isolamentos foram resistentes ao ceftiofur ou amoxicilina-ácido clavulânico e menos de 5% a drogas como tetraciclina, estreptomicina e sulfametoxazol.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações na microbiota vaginal determinadas por implantes intravaginais em ovelhas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar e identificar membros da microbiota vaginal normal de ovelhas submetidas a implantes vaginais.
2. Isolar e identificar agentes infecciosos oportunistas determinantes de vaginites em ovelhas submetidas a implantes vaginais.
3. Realizar teste de sensibilidade aos antimicrobianos com os microrganismos isolados da microbiota normal e das vaginites.
4. Avaliar a interferência do tipo de implante de progesterona na ocorrência da vaginite e na alteração da microbiota vaginal normal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

O experimento foi realizado no município de Cachoeiras de Macacu (RJ), utilizando-se 24 ovelhas previamente avaliadas quanto ao escore de condição corporal (ECC) e aparelho reprodutor. Estes animais foram divididos em três grupos, sendo um deles tratado com dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (n=8), outro com esponjas vaginais sem progesterona (n=8) e o terceiro grupo tratado com esponjas vaginais impregnadas com Medroxiprogesterona (n=8). Os animais foram avaliados clinicamente e por cultura bacteriológica e testes de susceptibilidade aos antibióticos quanto à manifestação de vaginites em decorrência da utilização de diferentes tipos de implantes vaginais de progesterona ou progestágeno.

4.2 PERÍODO EXPERIMENTAL, LOCALIZAÇÃO E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

O estudo foi realizado no município de Cachoeiras de Macacu, localizado na mesorregião Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, Brasil (latitude 22°27'52.90" S, longitude 43°39'06.95" W). Segundo a classificação de Köeppen o clima da região é classificado como CWa, de inverno seco e verão chuvoso, com temperatura anual

variando de 18 a 23°C e precipitação pluviométrica anual variando de 2.000 a 2.600mm³. Este experimento foi realizado nas instalações da Fazenda Jororó do Sertão entre os meses de novembro de 2007 a abril de 2008.

4.3 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas 24 ovelhas pluríparas das raças Santa Inês (n=16) e mestiços Dorper/Santa Inês (n=8) de dois a quatro anos de idade. Antes do início do experimento, as fêmeas foram submetidas a exame ginecológico, quando por meio do exame ultrassonográfico foi avaliado o sistema genital, não tendo sido determinada a condição de ciclicidade e o estágio do ciclo estral em que estas se encontravam. Neste momento, as fêmeas foram pesadas e tiveram determinado o seu escore da condição corporal segundo as recomendações de Suiter (2004) (Anexo 9.1). Somente animais sadios e com escore variando entre 2,5 e 3,5 foram selecionados para o experimento (Anexo 9.2).

Quanto ao manejo nutricional das ovelhas, estas permaneciam durante o dia em piquetes formados por *Brachiaria brizantha* e durante a noite, recolhidas ao aprisco recebendo ração comercial. Nos piquetes e nas baias os animais recebiam sal mineral e água à vontade.

Os animais selecionados foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais (oito por grupo), envolvendo a avaliação das vaginites em decorrência da utilização de diferentes tipos de implantes vaginais de progesterona e progestágeno (Tabela 1).

Tabela 1: Grupos Experimentais de 24 ovelhas

Grupos Experimentais	
GI	Animais que receberam dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (n=8)
GII	Animais que receberam esponjas vaginais sem progesterona (n=8)
GIII	Animais que receberam esponjas vaginais impregnadas com Medroxiprogesterona (n=8)

4.4 PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO E AMOSTRAS

As ovelhas receberam dispositivos intravaginais por seis dias contendo progesterona [GI: 0,3 g de Progesterona (CIDR[®]-Pfizer do Brasil Saúde Animal, São Paulo, Brasil); GII: esponja confeccionada sem progesterona e GIII: 60 mg de Medroxiprogesterona (Progespon[®]-Syntex, Argentina)] e 12,5 mg de dinoprost de trometamina, via intramuscular (Lutalyse[®], Pfizer do Brasil Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 300 UI de gonadotrofina coriônica eqüina – eCG, também via intramuscular (Novormon[®], Syntex, Argentina) no GI e GIII. Enquanto que em substituição ao dinoprost de trometamina e ECG o GII recebeu 1,5 mL de solução salina por via intramuscular, 24 horas antes da retirada do dispositivo. O estro foi monitorado duas vezes ao dia (manhã e tarde) durante um período de 20 minutos, com auxílio de rufiões confeccionados pela técnica de desvio lateral de pênis, previamente marcados com tinta apropriada na região esternal. Foram considerados em estro, aqueles animais que aceitavam a monta pelos rufiões ou que amanheciam marcadas. Estes procedimentos foram iniciados 12 horas após a retirada do implante e repetidos até completar 60 horas.

O muco vaginal foi colhido com auxílio de swabs estéreis de algodão passado no assoalho da região cranial da vagina após higienização da vulva com álcool 70° GL. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente e em seguida transportadas até o Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense em meio de transporte de Stuart (Merck) com intervalo máximo de 4 horas.

Amostras foram colhidas antes da inserção do implante, no dia da retirada do implante, 24 horas após a retirada e 48 horas após a retirada.

4.5 CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

Para contagens bacterianas de aeróbios totais, os swabs colhidos eram vigorosamente resuspendidos em 1mL de solução salina (PBS), pH 7.4, em vortex por um minuto a fim suspender as bactérias. A suspensão resultante foi diluída em série e as bactérias foram contadas em placas de Agar-sangue e incubadas por 48 h em 37 °C. No que se refere á quantificação das colônias, adotou-se três categorias:

placas com até 300 colônias eram contadas; placas com colônias isoladas em número superior á 300 eram classificadas como “>300 UFC/mL” enquanto placas com colônias coalescentes eram classificadas como “incontáveis”.

Não foi empregada metodologia para o isolamento de bactérias anaeróbias, pois a finalidade do estudo não visava o cultivo das mesmas, visto que a microbiota vaginal e os microrganismos oportunistas encontrados neste trato não apresentam esse perfil metabólico exclusivo.

Ocorrendo o crescimento após 24 ou 48 h de incubação, esfregaços foram realizados e corados pelo método de Gram, sendo examinados ao microscópio. Amostras Gram-negativas foram transferidas para meio Agar EMB Teague (Merck) e colônias sugestivas de *Staphylococcus sp.* transferidas para Mannitol-salt-Agar (Merck).

Após o crescimento, as bactérias foram identificadas com base nas características das colônias, coloração de Gram, produção de pigmento e reações bioquímicas, incluindo agar Triple Sugar Iron (TSI), citrato, urease, indol, Methyl Red (MR), Voges Proskauer (VP), nitrato e teste de motilidade, teste de atividade da catalase, teste de coagulase em tubo, e fermentação aeróbica de vários carboidratos. As bactérias foram classificadas como descrito por Otero et al. (2000) e de acordo com o Manual de determinação bacteriológica de Bergey (Holt et al., 1994).

4.6 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Amostras das unidades formadoras de colônia foram semeadas diretamente em meio Agar Mueller-Hinton (Merck) de acordo com o Comitê Nacional de Protocolos de Laboratório Clínico (2003), onde em seguida foram colocados os discos contendo gentamicina (10 µg), cefalotina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), nitrofurantoina (300 µg), ampicilina (10 µg), e amoxicilina (10 µg). Testou-se ainda trimetoprim-sulfametoxazol (25 µg) para bactérias Gram-negativas ou penicilina G (10 U) para cocos Gram-positivos. O diâmetro da zona antimicrobiana foi mensurado e as amostras classificadas em susceptíveis ou resistentes de acordo com o crescimento bacteriano.

A escolha das drogas antimicrobianas foi baseada nas metodologias utilizadas em estudos prévios como Suárez (2006), além da inclusão de antimicrobianos de amplo espectro com o objetivo de abranger toda a gama de microrganismos isolados no estudo para avaliação da sua susceptibilidade aos mesmos.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, constituindo de três grupos experimentais, sendo cada um com oito repetições. Os resultados obtidos a partir das unidades formadoras de colônias/mL na colocação do implante, na retirada e 24 e 48 horas após a retirada do mesmo foram submetidos à análise descritiva. As diferenças na frequência de sensibilidade de cada amostra a diferentes antibióticos foi analisada pelo teste de χ^2 (qui-quadrado).

5 RESULTADOS

5.1 PREVALÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS *in vitro* DE BACTÉRIAS ISOLADAS DA VAGINA DE OVELHAS ANTES DOS IMPLANTES

Das 24 ovelhas estudadas, duas pertencentes aos Grupos I e III perderam seus implantes durante o experimento e foram excluídas do estudo. Das 22 ovelhas restantes, foram obtidas 15 cepas com características típicas do gênero *Staphylococcus* (68,2%), sendo cinco em cada grupo de estudo. Sete ovelhas apresentaram crescimento de outros gêneros bacterianos, o que não foi considerado neste experimento (cinco colônias de Gram-negativas e duas colônias de outros Gram-positivos). *Staphylococcus* coagulase-positivos (CoPS) foi o grupo mais freqüente, representando 60% dos isolamentos (nove isolados), todos eles classificados como *Staphylococcus aureus*. Já os *Staphylococcus* coagulase-negativos (CoNS) foram isolados de seis animais; todos eles classificados como *Staphylococcus epidermidis* (Tabela 2).

No que se refere à susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos testados, verificou-se que 66,6% dos isolados (dez amostras) demonstraram resistência a pelo menos uma droga testada. Resistência à penicilina G foi um achado comum e pôde ser observada em seis (40%) dos quinze isolados. Resistência a outras drogas foi também observada, visto que quatro isolados foram resistentes a ampicilina (26,6%), três a tetraciclina (20%), três a amoxicilina (20%) e duas a gentamicina (13,3%), conforme Tabela 3.

O agente antimicrobiano mais ativo contra os *Staphylococcus* isolados da vagina de ovelhas sadias foi a ciprofloxacina, para o qual todos os isolados foram susceptíveis, seguida da cefalotina e nitrofurantoína, com uma amostra resistente cada. Os CoPS foram significativamente ($p < 0,05$) mais frequentemente resistentes aos antibióticos (77,7%) do que os CoNS (50%). Este fenômeno foi particularmente evidente para a penicilina G ($p < 0,05$), para a qual 55,5% dos CoPS e somente 16,6% dos CoNS foram resistentes (Tabela 3).

Tabela 2: Prevalência de bactérias isoladas da vagina de ovelhas imediatamente antes da colocação dos implantes vaginais impregnados ou não com progesterona ou progestágenos.

Animal	Espécie	Coagulase
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negativo
3	Excluído do estudo	-
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo
5	Coliforme*	-
6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negativo
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo
9	Coliforme*	-
10	Coliforme*	-
11	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo
12	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo
13	Gram-positivo não <i>Staphylococcus</i>	-
14	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negativo
15	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negativo
16	Coliforme*	-
17	Coliforme*	-
18	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negativo
19	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo
20	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negativo
21	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo
22	Excluído do estudo	-
23	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo
24	Gram-positivo não <i>Staphylococcus</i>	-

* Membros do grupo coliforme não foram identificados ao nível de espécie

Tabela 3: Padrões de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus sp.* obtidos da vagina de ovelhas antes da colocação dos implantes intravaginais.

Microrganismo	Isolados resistentes	Padrões de resistência microbiana (Nº de isolados suscetíveis)
<i>S.aureus</i>	07/09 (77,7 %)	PN (3); TE PN (1); AP AM TE CF GN (1); AP AM GN (1); AP (1)
<i>S.epidermidis</i>	3/6 (50,0 %)	AP AM PN (1); TE (1); NT PN (1)
TOTAL	10/15 (66,6 %)	PN (3); TE PN (1); AP AM TE CF GN (1); AP AM GN (1); AP (1); AP AM PN (1); TE (1); NT PN (1)

AP - ampicilina. AM - amoxicilina. TE - tetraciclina. CF - cefalotina. GN - gentamicina. NT - nitrofurantoina. CI-ciprofloxacina.
PN - penicilina G.

5.2 PREVALÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS *in vitro* DE BACTÉRIAS ISOLADAS DA VAGINA DE OVELHAS APÓS O USO DE IMPLANTES INTRAVAGINAIS

Seis dias após a colocação dos implantes intravaginais, 100% das ovelhas (22) desenvolveram sinais visíveis de vaginite, tais como secreção amarelada e inflamação local. Assim, amostras para processamento bacteriológico foram coletadas de todos os 22 animais estudados.

Todas as amostras apresentaram abundante crescimento bacteriano. Nos casos em que mais de um tipo de colônia bacteriana pôde ser observada, aquela com maior contagem de colônias foi considerada como agente da infecção. Em consequência, para cada animal, uma amostra foi colhida e uma espécie de bactéria foi identificada. Das 22 amostras estudadas, 16 (72,7%) foram identificadas como *Escherichia coli*, quatro como *Klebsiella pneumoniae* (18,2%), que também é um membro do grupo dos coliformes, e duas (9,1%) amostras foram classificadas como *Staphylococcus epidermidis*, um coco Gram-positivo (Tabela 4).

Todos os isolados demonstraram resistência pelo menos a uma droga testada. Com relação aos 20 isolados do grupo coliforme (16 *E. coli* + 4 *K. pneumoniae*), a resistência a drogas de amplo espectro da classe das penicilinas foi um achado freqüente, principalmente perante a ampicilina (95% de amostras resistentes) e a amoxicilina (80% de resistência). Resistência a outras drogas foi também observada, principalmente à tetraciclina (85%), gentamicina (70%) e cefalotina (70%). As drogas mais eficientes contra as amostras de coliformes isoladas de vaginites de ovelhas foram a ciprofloxacina e o trimetoprim-sulfametoxazol, para as quais todos os isolados se mostraram sensíveis *in vitro*, seguidas de nitrofurantoina, para a qual quatro isolados foram resistentes. Amostras de *S. epidermidis* apresentaram uma freqüência baixa de resistência e os dois isolados (100%) foram resistentes somente à penicilina G. O padrão de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* dos coliformes isolados é mostrado na Tabela 5.

Tabela 4: Prevalência de bactérias isoladas da vagina de ovelhas no dia da retirada dos implantes intravaginais

Animal	Espécie
1	<i>Escherichia coli</i>
2	<i>Escherichia coli</i>
3	Excluído do estudo
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
5	<i>Escherichia coli</i>
6	<i>Escherichia coli</i>
7	<i>Escherichia coli</i>
8	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
9	<i>Escherichia coli</i>
10	<i>Escherichia coli</i>
11	<i>Escherichia coli</i>
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
14	<i>Escherichia coli</i>
15	<i>Escherichia coli</i>
16	<i>Escherichia coli</i>
17	<i>Escherichia coli</i>
18	<i>Escherichia coli</i>
19	<i>Escherichia coli</i>
20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
21	<i>Escherichia coli</i>
22	Excluído do estudo
23	<i>Escherichia coli</i>
24	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

Tabela 5: Padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos *in vitro* de coliformes obtidos da vagina de ovelhas no dia da retirada dos implantes.

Microrganismo	Isolados resistentes	Padrões de resistência microbiana (Nº de isolados suscetíveis)
<i>E. coli</i>	16/16 (100%)	AP AM TE CF NT (1); AP AM TE CF (1); AP AM CF GN NT (1); AP AM TE CF GN (7); AP AM GN NT (1); GN (1); AP AM TE GN (2); AP AM TE (1); AP TE CF GN (1)
<i>K. pneumoniae</i>	4/4 (100%)	AP TE CF (1); CF NT (1); AP AM (1); AP AM TE CF GN (1)
TOTAL	20/20 (100%)	AP AM TE CF NT (1); AP AM TE CF (1); AP AM CF GN NT (1); AP AM TE CF GN (8); AP AM GN NT (1); GN (1); AP AM TE GN (2); AP AM TE (1); AP TE CF GN (1); AP TE CF (1); CF NT (1); AP AM (1)

AP - ampicilina. AM - amoxicilina. TE - tetraciclina. CF - cefalotina. GN - gentamicina. NT - nitrofurantoina

5.3 ALTERAÇÕES OBSERVADAS NA MICROBIOTA VAGINAL DE OVELHAS APÓS A UTILIZAÇÃO DE IMPLANTES INTRAVAGINAIS

No que se refere à análise quantitativa da microbiota vaginal das ovelhas estudadas, observou-se que, na coleta de amostra realizada antes da colocação dos implantes intravaginais os animais dos três grupos estudados apresentaram contagens de colônias similares, sendo esta inferior a 300 UFC/mL verificadas em 50,0%, 62,5% e 50,0%, respectivamente para os grupos GI, GII e GIII. Verificou-se ainda que, no Grupo I, não havia amostras com contagem $> 10^5$ UFC/ml, assim como nas amostras do Grupo II, ao passo que 37,5% (3/8) das amostras do Grupo III apresentaram tal resultado. No entanto, para fins estatísticos, os resultados contagem >300 e $> 10^5$ UFC/ml foram agrupados para melhor compreensão dos achados (Tabela 6).

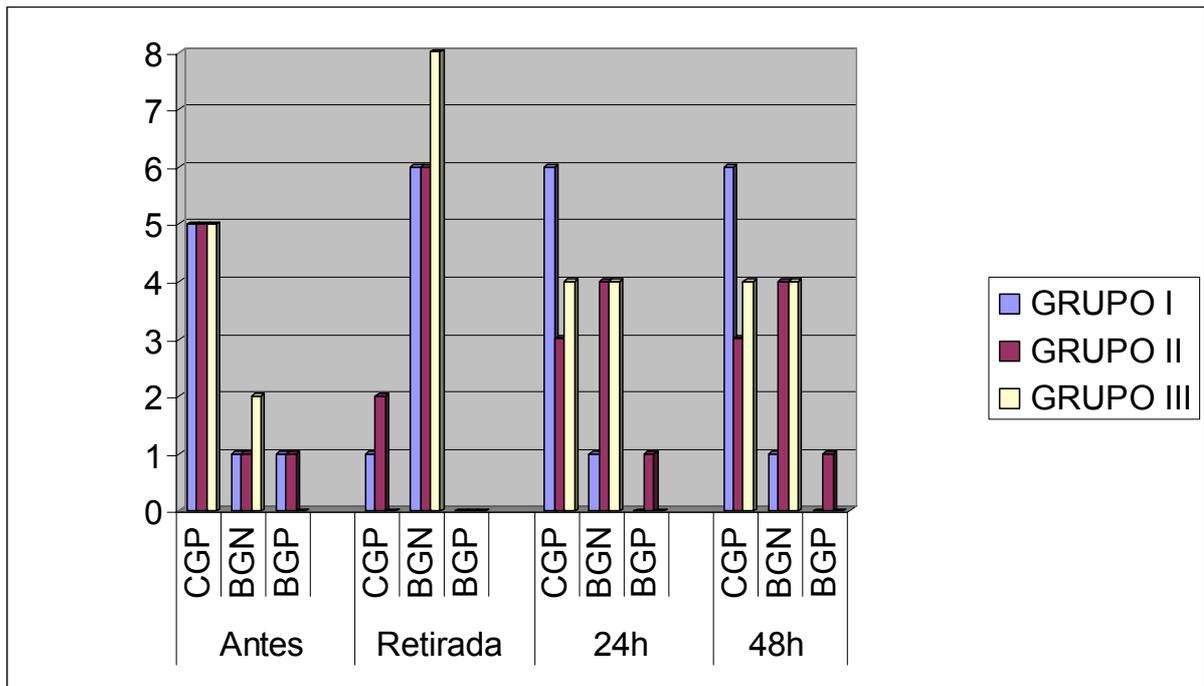
No momento da retirada do implante observou-se que esta semelhança foi mantida nos três grupos, uma vez que contagens >300 UFC/mL foram verificadas em 100% das fêmeas avaliadas. Tais achados repetiram-se nas coletas realizadas 24 e 48 h após a retirada do implante, e são condizentes com o achado de 100% dos animais com sinais clínicos evidentes de vaginite (Tabela 6).

Já no que se refere à análise qualitativa da microbiota vaginal das ovelhas estudadas, observou-se que, na coleta de amostra realizada antes da colocação dos implantes intravaginais os animais dos três grupos estudados apresentavam predominância (68,2%) de cocos Gram-positivos, com cinco isolados de membros do gênero *Staphylococcus sp.* em cada grupo. Entretanto, no momento da retirada dos implantes, verificou-se uma mudança na distribuição, em especial dos membros da microbiota, com predominância de bastonetes Gram-negativos do grupo coliforme (90,9%), nos três grupos estudados. Naquele momento, os estafilococos representavam apenas 9,1% dos isolados obtidos. Nos momentos posteriores - 24 e 48 horas após a retirada dos implantes - a microbiota voltou a ser constituída majoritariamente por membros do gênero *Staphylococcus sp.* - 59,1% dos isolados, enquanto a ocorrência de bastonetes Gram-negativos do grupo dos coliformes caiu de 90,9% no momento da retirada para 40,9% após 24 e 48hs, também distribuídos de maneira uniforme entre os grupos de estudo, mesmo sem a instalação de terapêutica antimicrobiana específica (Figuras 1 e 2).

Tabela 6: Unidades formadoras de colônia observadas antes da colocação do implante intra-vaginal, no dia da retirada, 24 e 48 h após a retirada do mesmo, nos grupos GI (CIDR), GII (esponja sem progesterona) e GIII (esponja com progesterona)

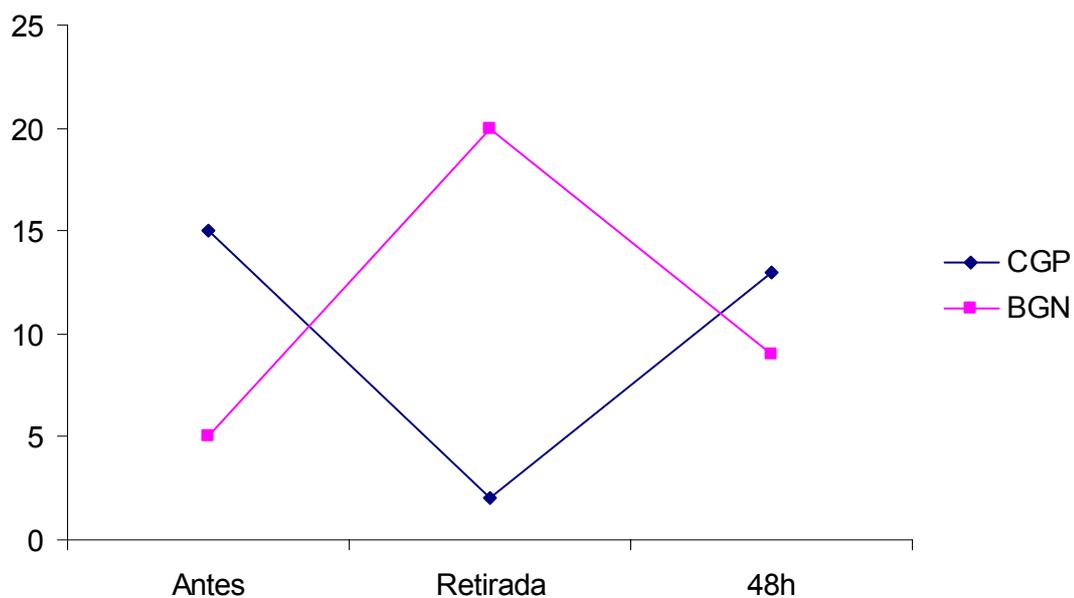
Momento	UFC/mL	GI	GII	GIII	Total
Antes	<300	50,0% (4/8)	62,5% (5/8)	50,0% (4/8)	54,2% (13/24)
	>300	50,0% (4/8)	37,5% (3/8)	12,5% (1/8)	33,3% (8/24)
	incontáveis	0,0% (0/8)	0,0% (0/8)	37,5% (3/8)	12,5% (3/24)
Retirada do implante	<300	0,0% (0/7)	0,0% (0/7)	0,0% (0/8)	0,0% (0/22)
	>300	42,8% (3/7)	100,0% (7/7)	0,0% (0/8)	45,4% (10/22)
	incontáveis	57,1% (4/7)	0,0% (0/7)	100,0% (8/8)	54,6% (12/22)
24h após retirada	<300	0,0% (0/7)	0,0% (0/7)	0,0% (0/8)	0,0% (0/22)
	>300	0,0% (0/7)	14,3% (1/7)	12,5% (1/8)	9,1% (2/22)
	incontáveis	100,0% (7/7)	85,7% (6/7)	87,5% (7/8)	90,9% (20/22)
48h após retirada	<300	0,0% (0/7)	0,0% (0/7)	0,0% (0/8)	0,0% (0/22)
	>300	0,0% (0/7)	0,0% (0/7)	0,0% (0/8)	0,0% (0/22)
	incontáveis	100,0% (7/7)	100,0% (7/7)	100,0% (8/8)	100,0% (22/22)

Figura 1: Predominância do tipo de microbiota vaginal no momento da introdução do implante intra-vaginal, no dia da retirada, 24 e 48 h após a retirada do mesmo, nos grupos GI (CIDR), GII (esponja sem progesterona) e GIII (esponja com progesterona), em número de animais.



CGP: Cocos Gram-Positivos; BGN: Bastonetes Gram-negativos; BGP: Bastonetes Gram-positivos

Figura 2: Alterações na microbiota vaginal de ovelhas no momento da introdução do implante intra-vaginal, no dia da retirada e 48 h após a retirada do mesmo, em número de animais.



CGP: Cocos Gram-Positivos; BGN: Bastonetes Gram-negativos

6 DISCUSSÃO

O presente estudo confirmou a predominância de membros do gênero *Staphylococcus* sp. na microbiota vaginal normal de ovelhas, devido ao isolamento de diferentes espécies de estafilococos da vagina de animais clinicamente sadios, antes dos implantes intravaginais. A alta ocorrência de membros deste gênero já era esperada, visto que a presença de bactérias Gram-positivas na genitália externa já havia sido descrita em ovelhas (BOYD, 1969; SAWYER, 1977; DONDERS et al., 2002). Também em outras espécies membros deste gênero são comuns na microbiota vaginal normal, como na mulher, rata, primatas não humanos, vacas, búfalas e cabras (OTERO et al., 2000; JADÓN et al., 2005; LILENBAUM et al., 2006; BEZIRTZOGLU et al., 2008).

O isolamento de nove amostras de *S. aureus* é um achado importante já que estas bactérias são reconhecidamente mais virulentas e estão freqüentemente relacionadas a infecções supurativas agudas em seres humanos e animais (HOLT et al., 1994). CoPS têm sido descritos em casos de vaginite clínica e metrites em ovelhas (MARSHALL et al., 1983), assim como em outros ruminantes como vacas (WILLIAMS et al., 2005) e cabras (SUÁREZ et al., 2006). *S. aureus* também foi descrito em outras infecções em ovelhas como mastite (MØRK et al., 2007) e dermatite (KOUTINAS et al., 2007).

Com relação à etiologia da vaginite clínica supurativa observada após a utilização dos implantes intravaginais, o presente estudo confirmou a importância dos coliformes, principalmente *Escherichia coli*, como agente oportunista das

vaginites bacterianas, o que concorda com os estudos conduzidos não somente em ovelhas (DONDEERS et al., 2002; TZORA et al., 2002; SARGISON et al., 2007), mas também em cabras (ABABNEH; DEGEFA, 2006) e vacas (PADULA; MACMILLAN, 2006; SHELDON et al., 2008). Em suínos, *E. coli* foi isolada de casos clínicos de descarga vulvar, juntamente com outros microrganismos (BARA et al., 1993).

A respeito da susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de estafilococos obtidas neste estudo, alguns alarmantes resultados foram observados. Como somente animais sadios sem histórico recente de tratamento antimicrobiano foram estudados, era de se esperar que os membros da microbiota vaginal normal fossem altamente sensíveis aos antibióticos. Entretanto, 66,6% dos isolados (dez amostras) demonstraram resistência a pelo menos uma droga testada e somente uma droga (ciprofloxacina) foi efetivamente eficaz contra todos os isolados. Um histórico clínico detalhado do rebanho não evidenciou exposição prévia a nenhum dos antibióticos testados que poderia justificar a taxa de resistência observada.

Existe uma carência de estudos a respeito da susceptibilidade antimicrobiana dos estafilococos de origem vaginal em ovelhas. Ao estudarem membros deste gênero de origem mamária em ovelhas na Grécia, Saratsi et al. (1998) relataram um preocupante aumento na resistência aos antimicrobianos dos isolados de *S. aureus*. Naquele estudo, a resistência à penicilina G foi maior (65%) do que a aqui observada (40%), assim como a resistência à ampicilina foi superior naquele estudo (65%) do que nas amostras do presente experimento (26,6%). No mesmo país e no mesmo ano, Fthenakis et al. (1998) estudaram isolados de *S. aureus* de mastite aguda em ovelhas e encontraram índices ainda mais preocupantes de resistência à ampicilina e à penicilina G (79,2%). Já na Itália, Lollai et al. (2008) verificaram índices bastante reduzidos de resistência à penicilina e ampicilina, de 4,1 e 3,5%, respectivamente, em isolados de *S. aureus* obtidos de leite não-mastítico de ovelhas.

No que se refere a isolados de outros ruminantes, verifica-se que *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* de origem bovina em Portugal também apresentaram grande percentual de resistência à penicilina G e baixa resistência à gentamicina (NUNES et al., 2007). Grande sensibilidade destas bactérias a drogas do grupo das cefalosporinas também foi descrita, o que concorda com os achados do presente estudo com estafilococos de origem ovina.

A sensibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas da vagina de ovelhas pode variar não somente de acordo com a etiologia da infecção, mas também com a

região aonde o estudo foi conduzido. Apesar de Suárez et al. (2006) sugerirem que cefalotina e gentamicina são os antibióticos mais efetivos na prevenção do crescimento bacteriano depois da utilização de esponjas intravaginais impregnadas com hormônio, no presente estudo estas drogas se apresentaram menos efetivas, com 63,3% dos isolados resistentes a cada uma destas drogas. Em um estudo mais recente conduzido em isolados de *E.coli* de origem fecal em vacas no Canadá (CARSON et al., 2008), evidenciou-se alta sensibilidade dos coliformes à ciprofloxacina e ao trimetoprim-sulfametoxazol, o que concorda com os resultados deste estudo. Ao estudarem isolados de *E.coli* obtidos de leite não-mastítico de ovelhas Lollai et al. (2008) verificaram que tais microrganismos foram significativamente mais resistentes aos antimicrobianos do que os isolados de estafilococos, o que está de acordo com os achados do presente estudo.

Verificou-se que estafilococos coagulase-positivos mostraram-se predominantes na microbiota normal vaginal das ovelhas estudadas antes da colocação dos implantes intravaginais. Sabendo-se de seu potencial patogênico em diferentes infecções em ovelhas (BERGONIER et al., 2003) e em outros ruminantes (SÁ et al., 2004), era de se esperar que, após a colocação dos implantes, estes mesmos microrganismos se multiplicassem, levando à inflamação local determinando vaginites. Ao estudarem as alterações na microbiota vaginal de ovelhas após o tratamento com esponjas intravaginais, Suarez et al. (2006) formularam a hipótese de que as bactérias presentes no momento da inserção das esponjas intravaginais podem posteriormente determinar inflamação. No entanto, uma vez que os autores não identificaram os isolados obtidos, tendo apenas quantificado-os, esta afirmação não foi comprovada. **No presente estudo, demonstrou-se que, apesar da inserção de dispositivos intravaginais atuar como fator predisponente da infecção local bacteriana, os microrganismos responsáveis por tal inflamação não foram aqueles que predominavam anteriormente á sua inserção, no caso, membros do gênero *Staphylococcus* sp., mas microrganismos Gram-negativos do grupo coliforme, provavelmente de origem fecal.**

Sabe-se que uma das funções de microrganismos da microbiota vaginal seja a colonização de nichos ecológicos e a produção de bacteriocinas que atuam impedindo a adesão e instalação de bactérias invasoras (HOLT et al., 1994). Desta forma, sugere-se que a manutenção da população de *Staphylococcus* na vagina da ovelha garantiria um equilíbrio desta microbiota evitando a colonização por

coliformes. No entanto, em função das alterações determinadas pelo uso dos implantes intravaginais, tal população de *Staphylococcus spp* autóctone teria sido alterada, permitindo a colonização por microrganismos oportunistas exógenos que se manifestaram causando infecções.

Sabe-se que o uso de implantes intravaginais com hormônios em ovelhas saudáveis pode agir como um fator predisponente para vaginites determinadas por microrganismos oportunistas (SUÁREZ et al., 2006; SARGISON et al., 2007; YESILMEN et al., 2008), visto que a presença de progesterona leva a um comprometimento da função imune local no trato reprodutor feminino (EWIS, 1997; RAMADAN et al., 1997). Uma curta exposição a progesterona luteal ou exógena irá desregular as funções imunológicas e, em alguns animais, inclusive em ovelhas, transformar o útero de um órgão resistente a um órgão susceptível a infecções (BLACK et al., 1953; ROWSON et al., 1953; SEALS et al., 2002b; LEWIS, 2003b; SEALS et al., 2003).

Este hormônio atua na síntese de prostaglandinas, em especial da PGE₂, levando à redução da função de linfócitos e neutrófilos (SEALS et al., 2002b, WULSTER-RADCLIFFE et al., 2003). Sob a influência da progesterona, linfócitos apresentam uma resposta proliferativa reduzida, além de redução da quimiotaxia de neutrófilos, produção de ânions superóxido e destruição final de patógenos (SEALS et al., 2003).

No presente estudo não houve diferença entre os três grupos estudados quanto ao desenvolvimento de vaginite, independentemente do tipo de implante e da presença ou não de progesterona. A totalidade dos animais estudados desenvolveu sinais clínicos compatíveis com vaginite, o que foi confirmado pela contagem bacteriana >300 UFC/mL em todas as amostras obtidas no momento da retirada dos implantes, o que se manteve nas 24 e 48 horas seguintes.

A ocorrência de vaginite em 100% dos animais dos três grupos deixa dúvidas quanto a real influência da progesterona no desenvolvimento desta infecção. A interferência deste hormônio reduzindo a ação dos mecanismos locais de defesa já foi bastante descrita, e não pode ser desprezada. No entanto, mesmo os animais do grupo II - em que se implantou esponjas intravaginais sem progesterona - também desenvolveram vaginites, o que demonstra que a ação do hormônio pode não ser o único fator envolvido. A ação física dos implantes, que atuam como corpos estranhos, é capaz de provocar reações inflamatórias alterando o ambiente vaginal

(Al-HAMEDAWI et al., 2003; SUÁREZ et al., 2006; TECNOPEC, 2007). Também a constante absorção e retenção das secreções vaginais pelos implantes durante o tratamento hormonal estimula o crescimento das bactérias (Al-HAMEDAWI et al., 2003; SUÁREZ et al., 2006).

Outro fato que deve ser considerado é a alta concentração de progesterona plasmática obtida com o uso de implantes, o que desencadeia um pico de até 7 a 8 ng/mL, concentração muito superior a observada na fase de diestro fisiológico que varia entre 2 a 3 ng/mL (PINNA et al., 2008). Desta forma, acredita-se que possa haver um súbito desequilíbrio hormonal entre progesterona e estrógeno, acentuando o efeito imunossupressor da mesma, e tornando essas fêmeas tratadas mais susceptíveis a infecções do trato genital.

Pode-se observar ainda que, após a retirada dos implantes, houve predominância de bastonetes no grupo II, no qual apenas um animal apresentou estro, enquanto nos grupos I e III, em que quase a totalidade dos animais apresentou estro, houve predominância de cocos ou proporção semelhante entre cocos e bastonetes. Desta forma, sugere-se que tenha ocorrido uma associação entre o efeito químico da progesterona, que atua reduzindo as defesas locais da vagina das ovelhas, e o efeito mecânico causado pelo dispositivo intravaginal. Tal associação permitiu não somente o aumento numérico na microbiota vaginal, mas também alterações qualitativas caracterizadas pela mudança de colonização bacteriana, primariamente composta por estafilococos e, após os implantes, predominada por coliformes.

7 CONCLUSÕES

No presente estudo, demonstrou-se que, apesar da inserção de dispositivos intravaginais atuar como fator predisponente da infecção local bacteriana, os microrganismos responsáveis por tal inflamação não foram aqueles que predominavam anteriormente á sua inserção, no caso, membros do gênero *Staphylococcus* sp., mas microrganismos Gram-negativos do grupo coliforme, provavelmente de origem fecal.

Desta forma, sugere-se que tenha ocorrido uma associação entre o efeito químico da progesterona, que atua reduzindo as defesas locais da vagina das ovelhas, e o efeito mecânico causado pelo dispositivo intravaginal. Tal associação permitiu não somente o aumento numérico na microbiota vaginal, mas também alterações qualitativas caracterizadas pela mudança de colonização bacteriana, primariamente composta por estafilococos e, após os implantes, predominada por coliformes.

8 REFERÊNCIAS

ABABNEH, M.M., DEGEFA, T. Bacteriological findings and hormonal profiles in the postpartum Balady goats. *Reproduction Domestic Animal*, v. 41, p.12-6, 2006.

AHERN, C.P. The bacteriology of vaginal mucus and intravaginal sponges from sheep and the effect of coating sponges with antibacterial agents. *Irish Veterinary Journal*, v. 30, p. 111–117, 1976.

AL-HAMEDAWI, T.M.; KHAMMAS, D.J.; AL-UBAIDI, A.S. Effect of estrus synchronization on vaginal flora and subsequent fertility in ewes. *Iraqi Journal Veterinary Science*, v. 16, p. 73-79, 2003.

ALLISON, A.J.; ROBINSON, T.J. The effect of dose level of intravaginal progestagen on sperm transport, fertilization and lambing in the cyclic merino ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.22, p.515-531, 1970.

AMARANTIDIS, I.; KARAGIANNIDIS, A.; SARATSI, Ph.; BRIKAS, P. Efficiency of methods for estrous synchronization in indigenous Greek goats. *Small Ruminant Research*, v. 52, p. 247-252, 2004.

AMIM, J.D. Effect of fluorogesterone acetate impregnated intravaginal sponges on vaginal bacterial flora of ewes. *Nigerian Journal Animal Production*, v. 23, p. 98-100, 1996.

ASBURY, A.C.; LYLE, S.K. In: MAC KINNON, A.O.; VOSS, J.L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, cap.43, p.381-391. 1993.

BARA, M.R.; MacGOWAN, M.R.; O'BOYLE, D.; CAMERON, R.D.A. A study of the microbial flora of the anterior vagina of normal sows during different stage of the reproductive cycle. *Australian Veterinary Journal*, v.70, n.7, p.256-259, 1993.

BARON, E.; PETERSON, L.; FINEGOLD, L. *Bailey e Scott's – Diagnostic Microbiology*. 9.ed. Saint Louis: Mosby, 1994. 958p

BARRET, D.M.W.; BARTLEWSKI, P.M.; BATISTA-ARTEAGA, M.; SYMINGTON, A.; RAWLINGS, N.C. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of the eCG following a 12-day treatment with progesterone-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. *Theriogenology*, v. 61, p.311-327, 2004.

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; COOK, S.J.; RAWLINGS, N.C. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.113, p.275-285, 1998.

BEAGLEY, K.W.; GOCKEL, C.M. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.38, p.13-22, 2003.

BERGONIER, D.; CRÉMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFFOULD, G.; BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research*, v.34, p.689-716, 2003.

BEZIRTOGLOU, E. ; VOIDAROU, CH. ; PAPADAKI, A. ; TSIOTSIAS, A.; KOTSOVOLOU, O. ; KONSTANDI, M. Hormone Therapy Alters the composition of the vaginal microflora in ovariectomized rats. *Microbial Ecology*, v.55, p.751-759, 2008.

BICUDO, S. D.; SOUSA, D.B. Associação de progesterógeno, prostaglandina e eCG em protocolo de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas suffolk. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p. 473-474, 2003.

BLACK WG, SIMON J, MCNUTT SH, CASIDA LE: Investigation on the physiological basis for the differential response of the estrous and pseudopregnant rabbit uteri to induce infection. *American Journal of Veterinary Research*, v.14, p.381–383, 1953.

BOYD, H. Infertility in domesticated animals clinically attributed to uterine factors. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.8, p.9-17, 1969.

BRITO, M.A.V.P.; CAMPOS, G.M.M.; BRITO, J.R.F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. *Ciência Rural*, v.32, n. 1, p.79-82, 2002.

BULMAN, D.C.; McKIBBIN, P.E.; APPLEYARD, W.T. Effect of a progesterone-releasing intravaginal device on the milk progesterone levels, vaginal flora, milk yield and fertility of cyclic and non-cyclic dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 53, p. 289-296, 1978.

CARSON, C.A., REID-SMITH, R., IRWIN, R.J., MARTIN, W.S., MCEWEN, S.A. Antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* from 29 beef farms in Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.72, p.119-28, 2008.

CARTER, G.R. *Fundamentos de Bacteriologia e Micologia veterinária*. 1.ed. São Paulo: Roca, 1988. 249p.

CAVALCANTI, A.S. Avaliação do uso do GnRH em protocolos curtos de indução e sincronização do estro e da ovulação em ovelhas. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense. 113p. 2008.

CHEN, Y.M.M.; WRIGHT, P.J.; LEE, C.S.; BROWNING, G.F. Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. *Veterinary Microbiology*. v.94, p.57-69, 2003.

DELIGIANNIS, C.; VALASI, I.; REKKAS, C.A.; GOULAS, P.; THEODOSIADOU, E.; LAINAS, T.; AMIRIDIS, G.S. Synchronization of ovulation and fixed time intrauterine insemination in ewes. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 40, p. 6-10, 2005.

DEKEYSER, J. *Bovine Genital Campylobacteriosis*. In: BUTZLER, J.P. *Campylobacter infection in man and animal*. Boca Raton: CRC Press, p.181-191, 1984.

DHALIWAL, G.K.; ENGLAND, G.C.W.; NOAKES, D.E. The influence of exogenous steroid hormones on steroid receptors, uterine histological structure and the bacterial flora of the normal bitch. *Animal Reproduction Science*. v.56, p.259-277, 1999.

DHALIWAL, G.S.; MURRAY, R.D.; WOLDEHIWOT, Z. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Animal Reproduction Science*, v.7, p.135-152, 2001.

DIXON, A.B.; KNIGHTS, M.; PATE, J.L.; LEWIS, P.E.; INSKEEP, E.K. Reproductive performance of ewes after 5-day treatment with intravaginal inserts containing progesterone in combination with injection of prostaglandin F₂α. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, p.142-148, 2006.

DONDERS, G.G.G., VEREECKEN, A., BOSMANS, E., DEKEERSMAECKER, A., SALEMBIER, G., SPITZ, B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis, aerobic vaginitis. *Brazilian Journal of Obstetric and Gynaecology*, v.109, p.34-43, 2002.

EVANS, A.C.O.; FLYNN, J.D.; QUINN, K.M.; DUFFY, P.; QUINN, S.; MADGWICK, T.F.; CROSBY, M.P.; BOLAND, M.P.; BEARD, A.P. Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14 day progestagen estrus synchronization protocol in ewes. *Theriogenology*, v. 56, p. 923-936, 2001.

EWIS, G.S. Simpósio: Problemas de saúde da vaca leiteira no pós parto. *Journal of Dairy Science*, v.80, n.5, p.984-994, 1997.

FASANYA, O.O.A.; ADEGBOYE, D.S., MOLOKWU, E.C.I.; DIM, N.I. Microbiology of genitalia of nulliparous and postpartum Savanna Brown goats. *Veterinary Research Communications*, v.11, n.2, p. 191-198, 1987.

FONSECA, J.F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.16, p.1-9, 2005.

FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H. Reprodução assistida em pequenos ruminantes. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 43, Supl.1, 2006.

FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H.; SANTOS, I.C.C.; VIANA, J.H.M.; MAGALHÃES, A.C.M. Induction of estrus in non-lactating dairy goats with different estrous synchronization protocols. *Animal Reproduction Science*, v. 85, p.117-124, 2005.

FTHENAKIS, G.G. Susceptibility to antibiotics of staphylococcal isolates from cases of ovine or bovine mastitis in Greece. *Small ruminant research*, v. 28, p. 9-13, 1998.

GENOVEZ, M.E. *Campilobacteriose genital bovina*. In: Anais do XII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. p.49-53, 1997.

GODFREY, R.W.; GRAY, M.L.; COLLINS, J.R. A comparison of two methods of estrous synchronization of hair sheep in the tropics. *Animal Reproduction Science*, v. 47, p.99-106, 1997.

GONZALEZ, F.H.D. *Introdução à Endocrinologia Reprodutiva Veterinária UFRGS*, 87p., 2002.

GORDON, I. *Controlled Reproduction in Sheep & Goats*. Volume 2 New York/USA: CAB International, 1997. 450 p.

GREYLING, J.P.C.; KOTZÉ, W.F.; TAYLOR, G.J.; HAGENDIJK, W.J.; CLOETE, F. Synchronization of oestrus in sheep: Use of different doses of progestagen outside the normal breeding season (Short communication) *South African Journal of Animal Science*, v.24, n.1, p.33, 2004.

GUERRA, M.M.P.; MOTA, R. A.M; MERGULHÃO, F.C.C. et al. Estudo da flora microbiana e avaliação do gentocin na prevenção de infecção vaginal de cabras leiteiras submetidas a sincronização do estro. *A Hora Veterinária*, v. 22, p. 13-17, 2002.

GUNN, R.G.; DONEY, J.M.; SMITH, W.F. The effect of level of pre-mating nutrition on ovulatory rate in Scottish Blackface ewes in different body conditions at mating. *Animal Production*, v.39, p.235-239, 1984.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução animal*. São Paulo: Manole, 513p Cap.9: Implantação, p.127-140, 2004.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., WILLIAMS, S.T. *Staphylococcus spp*. In: Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th, 787p, 1994.

HUNTER, M.G.; AYAD, V.J.; GILBERT, C.L.; SOUTHEE, J.A.; WATHES, D.C. Role of prostaglandin F_{2α} and oxytocin in the regression of GnRH-induced abnormal corpora lutea in anoestrous ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.85, p.551-561, 1989.

JADON, R. S.; DHALIWAL, G.S.; JAND, S.K. Prevalence of aerobic and anaerobic uterine bacteria during peripartum period in normal and dystocia-affected buffaloes. *Animal Reproduction Science*, v.88, p.215-224, 2005.

JAINUDEEN M.R.; WAHID H.; HAFEZ E.S.E. Reprodução Animal, 7^a ed. Barueri/SP: Manole, 513 p., Cap.12: Ovinos e Caprinos, p. 173-182, 2004.

JOHNSON, S.K. Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. *Domestic Animal Endocrinology*, v.13, p. 69-79, 1996.

KARSCH, F.J.; BITTMAN, E.; FOSTER, D.L.; GOODMAN, R.L.; LEGAN, S.J.; ROBINSON, J.C. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress Hormone Research*, v.40, p.185-223, 1984.

KARSCH, F.J.; MALPAUX, B.; WAYNE, N.L.; ROBINSON, J.E. Characteristics of the melatonin signal that provide the photoperiodic code for timing seasonal reproduction in the ewe. *Reproduction, Nutrition and Development.*, v.28, p.459-472, 1988.

KNIGHTS, M.; MAZE, T. D.; BRIDGES P. J.; LEWIS P. E.; INSKEEP E. K. Short-term treatment with a controlled internal drug releasing (CIDR) device and FSH to induce fertile estrus and increase prolificacy in anestrus ewes. *Theriogenology*, v.55, p.1181-1191, 2001.

KOUTINAS, A.F., SARIDOMICHELAKIS, M.N., ARGYROUDIS, S., KOUTINAS, C.K., KARATZANOS, P., GIADINIS, N. Clinical, histopathological and therapeutic considerations in a flock of sheep with facial staphylococcal-associated dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v.18, p.211-216, 2007.

LEGAN, S.J.; IANSON, H.; FITZGERALD, B.P.; AKAYDIN, M.S. Importance of short luteal phases in the endocrine mechanism controlling initiation of estrous cycle in anestrus ewe. *Endocrinology*, v.117, p. 1530-1536, 1985.

LEWIS GS: Uterine health and disorders. *Journal of Dairy Science*, v.80, p.984–994, 1997.

LEWIS, G.S. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reproduction Biology and Endocrinology*, v.1, p.117, 2003a.

LEWIS, G.S. Role of ovarian progesterone and potential role of prostaglandin F_{2α} e prostaglandin E₂ in modulating the uterine response to infectious bacteria in postpartum ewes. *Journal of Animal Science*, v.81, p.285-293, 2003b.

LEWIS, G.S.; WULSTER-RADCLIFFE, M.C Prostaglandin F_{2α} upregulates uterine immune defenses in the presence of the immunosuppressive steroid progesterone. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 56, p. 102-111, 2006.

LILENBAUM, W., ESTEVES, A.L., SOUZA, G.N. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from saliva of clinically normal cats. *Letters Applied of Microbiology*, v.28, p.448-452, 1999.

LILENBAUM, W.; MORAES, I.A.; CARDOSO, V.S.; VARGES, R.G.; FERREIRA, A.M.R.; PISSINATTI, A. Antibiotic resistance in *Staphylococci* isolated from vaginas of captive female *Leontopithecus* (Callitrichidae-primates). *American Journal of primatology*, v.68, p.825-831, 2006.

LINCOLN, G.A.; MAEDA, K.I. Reproductive effects of placing microimplants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in ram. *Journal of Endocrinology*, v.132, p.201-215, 1992.

LOLLAI, S.A.; ZICCHEDDU, M.; DI MAURO, C.; MANUNTA, D.; NUDDA, A.; LEORI, G. Profile and evolution of antimicrobial resistance of ovine mastitis pathogens (1995–2004). *Small Ruminant Research*, v. 73, p.249-254, 2008.

LÓPEZ-SEBASTIAN, A.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; CARRIZOSA, J.A.; URRUTIA, B.; DÍAZ-DELFA, C.; SANTIAGO-MORENO, J.; GÓMEZ-BRUNET, A. New estrus synchronization and artificial insemination protocol for goats based on male exposure, progesterone and cloprostenol during the non-breeding season *Theriogenology*, v.68, p.1081-1087, 2007.

LUCIDI, P.; BARBONI, B.; MATTIOLO, M. Ram-induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen semen in sheep. *Theriogenology*, v. 55, p. 1797-1805, 2001.

LUTHER J.S., GRAZUL-BILSKA A.T., KIRSCH J.D., WEIGL R.M., KRAFT K.C., NAVANUKRAW C., PANT D., REYNOLDS L.P., REDMER D.A. The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrous synchronization following laparoscopic AI in ewes. *Small Ruminant Research*, v.72, p.227-231, 2007.

MAHAJAN, A.K.; KATOCH, R.C. Aerobic microbial flora association with endometritis in sheep and goats. *Indian Journal of Animal Sciences*, v.67, p.290-291, 1997.

MALPAUX, B.; DAVEAU, A.; MAURICE, F.; GAYRARD, V.; THIERY, J.C. Short days effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biology of Reproduction*, v.48, p.752-760, 1993.

MARSHALL, M.M., SONGER, J.G., CHILELLI, C.J., DEVOS, J.C. Isolations of aerobic bacteria from wild desert bighorn sheep (*Ovis canadensis nelsoni* and *O. c. mexicana*) in Arizona. *Journal of Wildlife Diseases*, v.19, p.98-100, 1983.

MARTINEZ-GARCIA, J.A.; SANCHEZ-TORRES, M.T.; CORDERO, J.L.; MENDOZA, G.D.; GARCIA-BOJALIL, C.M.; GARCIA-WINDER, M. Ovarian follicular dynamics after cauterization of the dominant follicle in anestrous ewes. *Animal Reproduction Science*, v.98, p.225–232, 2007.

MARTINS, G.; FIGUEIRA, L.; PENNA, B.; BRANDÃO, F.; VARGES, R.; VASCONCELOS, C.; LILENBAUM, W. Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progestin-impregnated intravaginal sponges. *Small Ruminant Research*, v.81, p.182-184, 2008.

MARTINS, G.; FIGUEIRA, L.; PENNA, B.; BRANDÃO, F.; VARGES, R.; LILENBAUM, W. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococci* isolated from the vagina of healthy ewes. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 2009, *in press*.

- MAVROGIANNI, V.S., AMIRIDIS, G.S., GOUGOULIS, D.A., FRAGKOU, I.A., FTHENAKIS, G.C. Efficacy of difloxacin for the control of postpartum uterine infections of ewes. *Journal of Veterinary Pharmacology Theriogenology*, v.30, p.583-5, 2007.
- MENCHACA A.; RUBIANES E. Effect of high progesterone concentrations during the early luteal phase on the length of the ovulatory cycle of goats. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.69-76, 2001.
- MENCHACA A.; RUBIANES E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, v.16, p. 403-413, 2004.
- MIHM, M.; CURRAN, N.; HYTTLE, P.; KNIGHT, P.G.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.116, p.293-304, 1999.
- MOBINI S., HEATH A.M., PUGH D.G. *Sheep and Goat Medicine* Pennsylvania – Estados Unidos: W.B. Saunders Company, 468p. Cap.6: Theriogenology of Sheep and Goats, p. 129-196, 2002.
- MORAES J.C.F.; SOUZA C.J.H.; GONÇALVES P.B.D. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela. 340p, Cap.3: Controle do Estro e da Ovulação em Bovinos e Ovinos, p.25-55, 2002.
- MØRK, T., WAAGE, S., TOLLERSRUD, T., KVITLÉ, B., SVILAND, S. Clinical mastitis in ewes; Bacteriology, epidemiology and clinical features. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.49, p.23, 2007.
- NUNES, S.F.; BEXIGA, R.; CAVACO, L.M.; VILELA, C.L. Technical note: Antimicrobial susceptibility of Portuguese isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in subclinical bovine mastitis. *Journal Dairy Science*, v.90, p.3242-6, 2007.
- OTERO, C.; SAAVEDRA, L.; SILVA DE RUIZ, C.; WILDE, O.; HOLGADO, A.R.; NADER-MACÍAS, M.E. Vaginal bacteria microflora modifications during the growth of healthy cows. *Letters in Applied Microbiology*, v.31, p.251-254, 2000.
- OTERO, M.C.; NADER-MACÍAS, M.E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal Reproduction Science*, v.96, p.35-46, 2006.
- PADULA, A.M.; MACMILLAN, K.L. Effect of treatment with two intravaginal inserts on the uterine and vaginal microflora of early postpartum beef cows. *Australian Veterinary Journal*, v.84, p.204-8, 2006.

PELLEGRIN, A.O. *Tricomomose bovina*. In: Anais do XII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. p.60-65, 1997.

PETIT, T.; SPERGSE, J.; ROSENGARTEN, R.; AURICH, J. Prevalence of potentially pathogenic bacteria as genital pathogens in dairy cattle. *Reproduction of Domestic Animals*, v. 44, n.1, p. 88-91, 2009.

PINNA, A.E. Taxa de ovulação, concentração plasmática de progesterona e fertilidade de ovelhas submetidas à indução de estro utilizando implantes intravaginais novos ou reutilizados. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense. 124p. 2008.

PLANT, J.W. Infertility in the ewe. In: Refresher course for veterinarians: Refresher course on sheep. Sidney: The post-graduate committee in veterinary science, v.58, p.675-705, 1981.

PROSPERI, C.P.; TORRES, C.A.A.; MAFFILI, V.V.; FÜRST, F.; FONSECA, J.F.; RODRIGUES, M.T. Indução do estro em cabras Saanen nulíparas, utilizando-se diferentes tempos de exposição ao progestágeno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.481-483, 2003.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Doenças causadas por vírus e *Chlamydia* II In: *Clínica Veterinária*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.22, p.1053-1062, 2000.

RAMADAN, AA.; JOHNSON III, GL.; LEWIS GS. Regulation of uterine immune function during the estrous cycle in response to infectious bacteria in sheep. *Journal of Animal Science*, v.75, p.1621–1632, 1997.

REVAH, I.; BUTLER, W.R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* v.106, p.39–47, 1996.

ROBERTSON, H.A. *Reproduction in Domestic Animals*, 3^a ed., 665p., Cap.18 *Reproduction in the ewe and the goat*, p.475-498, 1977.

ROBINSON, T.J. *The control of the ovarian cyclic in sheep*. Sydney: University Press, p.258, 1967.

ROWSON, L.E.A.; LAMMING, G.E.; FRY, R.M.; The relationship between ovarian hormones and uterine infection. *Veterinary Record*, v.65, p.335, 1953.

ROOT-KUSTRITZ, M.V. Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. *Theriogenology*, v.66, p.567-574, 2006.

RUBIANES, E.; CASTRO, T.; KMAID, S. Estrus response after a short progesterone priming in seasonally anestrous goats. *Theriogenology*, v.49, p.356, 1998.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 271-287, 2003.

SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.L.R.S.; ELIAS, A.O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.41, p.320-326, 2004.

SARATSI, P.; LEONTIDES, L.; TZORA, A.; ALEXPOULOS, C.; FTENAKIS, G.C. Incidence risk and aetiology of mammary abnormalities in dry ewes in 10 flocks in southern Greece. *Preventive veterinary medicine*, v. 37, p.173-183, 1998.

SARGISON, N.D.; HOWIE, F.; MEARN, R.; PENNY, C.D.; FOSTER, G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* as a perennial cause of abortion in a closed flock of Suffolk ewes. *Veterinary Record*, v.160, p.875-6, 2007.

SASA, A.; TESTON, D. C.; RODRIGUES, P. A.; COELHO, L. A.; SCHALCH, E. Concentrações plasmáticas de progesterona em borregas lanadas e deslanadas durante o período de abril a novembro no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, p. 1150-1156, 2002.

SAWYER, G.J. Observation on the bacterial population of the os cervix of the ewe before and after embryo death. *Australian Veterinary Journal*, v.53, p.542-4, 1977.

SCUDAMORE, C.L. Intravaginal sponge insertion technique. *Veterinary Record*, v. 123, p.554, 1988.

SEALS, R.C.; MATAMOROS, I.; LEWIS, G.S. Relationship between postpartum changes in 13, 14-dihydro-15-keto-PGF_{2a} concentrations in Holstein cows and their susceptibility to endometritis. *Journal of Animal Science*, v.80, p.1068–1073, 2002a.

SEALS, R.C.; WULSTER-RADCLIFFE, M.C.; LEWIS, G.S. Modulation of the uterine response to infectious bacteria in postpartum ewes. *American Journal of Reproduction and Immunology*, v.47, p.57–64, 2002b.

SEALS, R.C.; WULSTER-RADCLIFFE, M.C.; LEWIS, G.S. Uterine response to infectious bacteria in estrous cyclic ewes. *American Journal of Reproduction and Immunology*, v.49, p.269-278, 2003.

SEGERSON, E.C.; LI, H.; TALBOT, C.W. Estradiol-17 and progesterone increase ovine uterine suppressor cell activity. *Journal of Animal Science*. v.75, p.2778-2787, 1997.

SENGER, P.L. Pathways to Pregnancy and Parturition 2^a ed. USA: Cadmus Professional Communications. 368p. Cap. 7: Reproductive Cyclicity – Terminology and Basic Concepts, p.144–163,1999.

SHAHNEH, A.Z.; TAJANGOOKEH, H.D.; PANAH, H.S.; SAKI, A.A. Effect of controlled internal drug release device treatment duration and eCG dose on reproductive performance of seasonally anestrous fat-tailed Iranian ewes. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.9, p.1552-1555, 2006.

- SHELDON, I.M.; WILLIAMS, E.J.; MILLER, A.N.; NASH, D.M.; HERATH, S. Uterine diseases in cattle after parturition. *Veterinary Journal*, v.176, p.115-21, 2008.
- SILVA, C.A.M. Reproductive wastage in sheep. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria-FAO-UNO, 45p., 1992.
- SIMPLÍCIO, A.A.; SIMPLÍCIO, K.M.M.G. Caprinocultura e ovinocultura de corte: desafios e oportunidades. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, n.39, p.7-18, 2006.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Lengthening of the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dynamics. *Endocrinology*, v.127, p.916-925, 1990.
- SMITH, B.P. Medicina Interna de Grandes Animais. 3 ed. São Paulo: Manole, 1728p., 2006.
- SONNEX, C. Influence of ovarian hormones on urogenital infection. *Sexual Transmitted Infections*, v.74, p.11-19, 1998.
- STOESSEL, F. *Las enfermedades venereas: Trichomoniasis y vibriosis genital*. Zaragoza: Acribia, 163p., 1982.
- SUÁREZ, G.; ZUNINO, P.; CAROL, H.; UNGERFELD, R. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotics after treatment with intravaginal sponges in anestrous ewes. *Small Ruminants Research*, v.63, p.39-43, 2006.
- SUITER, J. 2004. Body condition scoring in sheep and goats. *Farmnonte* 69/94. Disponível em: <http://www.agric.wa.gov.au/content/aap/sl/m/fn069_1994.htm>. Acesso em 23 de julho de 2007.
- TECNOPEC. Uso de implantes intravaginais em ovelhas. Disponível em: <http://www.tecnopec.com.br>. Acesso em: 08 de setembro de 2008.
- TIZARD, I.R. *Veterinary Immunology: An Introduction*, 5th ed. Philadelphia, PA, W. B. Saunders Co., 1996. XXp
- TRALDI, A.S. *Controle Farmacológico do Ciclo Estral e da Superovulação em Caprinos e Ovinos*. In CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 1, 2005, São Paulo. Anais. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia: USP, 2000.
- TZORA, A.; LEONTIDES, L.S.; AMIRIDIS, G. S.; MANOS, G.; FTHENAKIS, G. C. Bacteriological and epidemiological findings during examination of the uterine content of ewes with retention of fetal membranes. *Theriogenology*, v.57, p. 1809-1817, 2002.
- VILLARROEL, A.; MARTINO, A.; BONDURANT, R.H.; DÉLETANG, F.; SISCHO, W.M. Effect of post-insemination supplementation with PRID on pregnancy in repeat-breeder Holstein cows. *Theriogenology*, v.61, p.1513-1520, 2004.

VIÑOLES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G.; RUBIANES, E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*, v.55, p.993-1004, 2001.

VIÑOLES, C.; MEIKLE, A.; FORSBERG, M.; RUBIANES, E. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology*, v.51, p.1351-1361, 1999.

WALSH, R. B.; LeBLANC, S. J.; DUFFIELD, T.D.; KELTON, D. F.; WALTON, J.S.; LESLIE, K.E. The effect of a progesterone releasing intravaginal device (PRID) on pregnancy risk to fixed-time insemination following diagnosis of non-pregnancy in dairy cows. *Theriogenology*, v.67, p.948-956, 2007a.

WALSH, R. B.; LeBLANC, S. J.; DUFFIELD, T.D.; KELTON, D. F.; WALTON, J.S.; LESLIE, K.E. Synchronization of estrus and pregnancy risk in anestrus dairy cows after treatment with a progesterone-releasing intravaginal device. *Journal of Dairy Science*, v.90, p.1139-1148, 2007b.

WHEATON J.E.; CARLSON, K.M.; WINDELS, H.F.; JOHNSTON, L.J. CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats *Animal Reproduction Science*, v. 33 (1-4), p.127-141, 1993.

WILLIAMS, E.J., FISCHER, D.P., PFEIFFER, D.U., ENGLAND, G.C., NOAKES, D.E., DOBSON, H., SHELDON, I.M. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, v.63, p.102-117, 2005.

WULSTER-RADCLIFFE, M.C.; SEALS, R.C.; LEWIS, G.S. Progesterone increases susceptibility of gilts to uterine infections after intrauterine inoculation with infectious bacteria. *Journal of Animal Science*, v.81, p.1242-1252, 2003.

YESILMEN, S.; OZYURTLU, N.; KUCUKASLAN, I.; ALTAN, F. The effect of progestagen on the changes of the vaginal flora arising from intravaginal sponge treatment and susceptibility of the vaginal flora to antibiotics in ewes. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.7, n.11, p.1418-1421, 2008.

9 ANEXOS

9.1 PARÂMETROS AVALIADOS PARA DETERMINAÇÃO DO ESCORE DA CONDIÇÃO CORPORAL

Escore	Processo espinhoso	13^a Costela	Garupa
1	Proeminente e pontudo	O final é pontiagudo e fácil sentir os espaços entre, sobre e envolta das costelas	Fina, a superfície tende a ser côncava
2	Proeminente mas macio	Final macio e arredondado; pode-se sentir os espaços entre, sobre e envolta das costelas amaciados	Razoavelmente profunda com a superfície tendendo a ser plana
3	Pode ser sentido, mas macio e arredondado	Final arredondado e com boa cobertura, uma pressão firme é necessária para sentir os espaços entre e abaixo das costelas	Repleta e arredondada
4	Detectável com pressão	Com pressão firme as costelas podem ser sentidas individualmente	Repleta e com uma camada de cobertura de gordura
5	Pode ser sentido com pressão firme	Não podem ser sentidas, nem mesmo com firme pressão	O músculo não pode ser sentido devido a uma espessa camada de gordura

Fonte: Suiter, 2004.

9.2 PESO VIVO MÉDIO (KG) E ESCORE DA CONDIÇÃO CORPORAL (0-5) DE OVELHAS TRATADAS COM DIFERENTES TIPOS DE IMPLANTES INTRAVAGINAIS (MÉDIA \pm DESVIO-PADRÃO)

Grupos experimentais	Peso médio (kg)	Escore da condição corporal (0-5)
G _{CIDR}	41,95 \pm 6,93 (8)	3,13 \pm 0,19 (8)
G _{esponja s/P4}	41,18 \pm 7,26 (8)	3,31 \pm 0,51 (8)
G _{esponja c/P4}	42,06 \pm 7,00 (8)	3,19 \pm 0,29 (8)
Total	41,73 \pm 6,76 (24)	3,21 \pm 0,35 (24)

O valor entre parênteses refere-se ao número de animais entre cada tratamento (P>0,05).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)