

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**A FASE INICIAL DA GESTAÇÃO DE BOVINOS E SUA RELAÇÃO COM A
PROGESTERONA E O ESTUDO SOBRE DIFERENTES AVALIAÇÕES DO CORPO
LÚTEO EM NOVILHAS TAURINAS DE CORTE**

GABRIELLA DOS SANTOS VELHO

PORTO ALEGRE

2019/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**A FASE INICIAL DA GESTAÇÃO DE BOVINOS E SUA RELAÇÃO COM A
PROGESTERONA E O ESTUDO SOBRE DIFERENTES AVALIAÇÕES DO CORPO
LÚTEO EM NOVILHAS TAURINAS DE CORTE**

Autora: Gabriella dos Santos Velho

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Veterinária
como requisito parcial para obtenção de
Graduação em Medicina Veterinária.**

Orientador: André Gustavo Cabrera Dalto

Coorientadora: Monique Tomazele Rovani

**PORTO ALEGRE
2019/2**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família, pelo apoio incondicional durante esses anos dedicados à graduação. Ao meu pai Cristiano, minha mãe Luciane e meu irmão Lucas, sem vocês, nada disso seria possível. À minha avó Jaci, por todo amor e carinho. E não poderia deixar de agradecer às minhas tias, Lucilene, Rúbia e Cristiane, esse sonho é nosso.

Ao meu namorado, Leonardo Glaeser Paul por todo o companheirismo, compreensão nos momentos difíceis e apoio incondicional.

Aos meus professores, André Dalto, Monique Rovani e João Batista. Sou muito grata pelos ensinamentos, conversas e mates. Vocês são meus exemplos de profissionais.

Ao Setor de Grandes Ruminantes (SGR), em que tive oportunidade de permanecer durante metade do período de graduação. Palavras não são suficientes para agradecer a esse setor que me acolheu tão bem e me ensinou tanto. Ao professor coordenador do setor André Dalto, o meu muito obrigada. Pela oportunidade de “ver vaca”, por me ensinar tanto e pela paciência. Aos meus queridos companheiros de estágio Lais Gambin, Jasmyne Robattini, Rogan Müller, Andressa Zanette, Carolina de Oliveira, Dhiego Silveira, Martin Klafke, Gabriely Pinheiro, Paola Juchem, Gabriel Rodrigues e Íris Barbosa, os quais tive oportunidade de conhecer e aprender com cada um.

Aos Médicos Veterinários, Marcelo Maronna, Fábio Guagnini e Tiago Luersen, que tive oportunidade de fazer estágio durante a graduação e aprender tanto.

Aos meus colegas de graduação, principalmente àqueles que estavam diariamente comigo Dominique Wenzen, Gabriela Oliveira, Elisar Camilotti, Juliana Krebs, Mariana Torres pelo companheirismo e pelos inúmeros mates tomados. A faculdade ficou mais leve com a convivência de tantas pessoas queridas.

À Bety Orlandi, proprietária da Fazenda Umbú, onde ocorreu o experimento. Por abrir as porteiras da propriedade, pela confiança depositada no SGR e pelo carinho conosco.

À empresa Bimeda[®] pelo fornecimento dos medicamentos utilizados no projeto.

RESUMO

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é utilizada com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho, facilitar o manejo dos animais e concentrar a estação de reprodução em um período determinado. Com o objetivo de se obter maior número de prenhez por IA, a ultrassonografia modo Doppler surgiu como ferramenta para a ressincronização precoce de vacas não gestantes, em que é possível encurtar ainda mais o período da estação reprodutiva. Além disso, também permitiu uma melhor avaliação do corpo lúteo (CL), glândula produtora de progesterona (P4), o qual é um hormônio importante e responsável pelos acontecimentos reprodutivos. No entanto, os índices elevados de perdas embrionárias, por decorrência de diversos fatores, podem estar relacionados aos níveis baixos de P4 durante a fase inicial da gestação. O objetivo desse estudo foi realizar uma revisão de literatura sobre os principais aspectos relacionados à prenhez inicial de bovinos. Essa revisão serviu de base para realização de um estudo *in vivo* apresentado em forma de artigo. No estudo foram realizadas as correlações entre a concentração sanguínea de P4, diâmetro do CL e fluxo sanguíneo luteal e taxa de prenhez cinco dias após a IATF. Este estudo buscou estabelecer uma relação entre três métodos diferentes de avaliação da produção de P4 pelo CL, que poderá servir de base para outros estudos que visem à suplementação de P4 após a IATF. Os resultados obtidos mostram que há um efeito positivo do diâmetro do CL na concentração de P4, em que quanto maior o CL, maior a P4 sérica ($p < 0,001$). Além disso, o fluxo sanguíneo luteal tem correlação positiva tanto em relação à P4 sérica quanto ao diâmetro do CL ($p < 0,001$) e que o diâmetro do CL ($> 14,95\text{mm}$) determina efeito positivo sobre a taxa de prenhez ($p < 0,001$). Portanto, este estudo pode servir de base para protocolos que visem a suplementação de P4 após a IATF e também em avaliações do CL em receptoras de embrião.

Palavras-chave: Doppler, fluxo sanguíneo, taxa de prenhez e diâmetro luteal.

ABSTRACT

Fixed-time artificial insemination (FTAI) is used to increase the herd reproductive efficiency, to facilitate animal management and to concentrate the breeding season. A Doppler mode ultrasound has emerged as tool for early resynchronization of nonpregnant cows to achieve the highest number of pregnancies *per AI*, allowing a shorter reproductive season. In addition, a better evaluation of the corpus luteum (CL), which is the gland producing progesterone (P4), an important hormone responsible for reproductive outcomes. However, high rates of embryonic losses due to several factors may be related to low P4 levels during an early pregnancy phase. The aim of this study was to perform a literature review on the main aspects related to the early pregnancy development of cattle. This review provided an insight to the *in vivo* study performed and presented as a scientific article. Our study was performed to correlate blood P4 concentration, CL diameter and luteal blood flow five days after FTAI. This study established a relationship between three evaluation methods of P4 production by CL, that could be useful for other studies aiming P4 supplementation after FTAI. The results shown that there is a positive effect on CL diameter on P4 concentration, as the higher the CL the higher serum P4 ($p < 0,001$). In addition, luteal blood flow has a positive correlation to P4 ratio and CL diameter ($p < 0,001$) and CL diameter (> 14.95 mm) determines a positive effect on pregnancy rate ($p < 0,001$).

Keywords: Doppler, blood flow, pregnancy rate and luteal diameter.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenvolvimento das membranas extraembrionárias.....	10
Figura 2	Migração das células gigantes binucleadas na placenta de ruminantes	12
Figura 3	Inibição da produção de ocitocina pelo IFNT.....	13
Figura 4	Ciclo estral da fêmea bovina representado pelos diferentes estágios.	18
Figura 5	Concentração sérica de PAG entre 20 e 50 dias após a IA.	22
Figura 6	Relação entre a concentração plasmática de P4 (P4), fluxo sanguíneo luteal (LBF) e área de CL (LS), durante o ciclo estral.	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 A FASE INICIAL DA GESTAÇÃO DE BOVINOS E SUA RELAÇÃO COM A PROGESTERONA.....	9
2.1 Início da Embriogênese	9
2.2 Desenvolvimento das membranas extraembrionárias	9
3 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO	13
4 IMPORTÂNCIA DA PROGESTERONA NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS.....	15
4.1 A progesterona na puberdade	15
4.2 Papel da progesterona no ciclo estral	17
4.3 Efeito da progesterona na gestação	19
5 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE PREENHEZ.....	21
5.1 Palpação retal.....	21
5.2 Ultrassonografia modo B.....	21
5.3 Glicoproteínas associadas à prenhez	21
5.4 Ultrassonografia modo Doppler	22
6 USO DA ULTRASSONOGRAFIA MODO DOPPLER.....	23
6.1 Uso da ultrassonografia Doppler na reprodução	24
6.2 Uso da ultrassonografia Doppler na avaliação ovariana	24
6.3 Uso da ultrassonografia Doppler em programas de ressincronização.....	26
7 CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS	28
8 ARTIGO	33

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de bovinos do mundo, considerado um dos países mais importantes no seu comércio e produção, contando com um rebanho de 214 milhões de bovinos, o que o coloca atrás apenas do rebanho da Índia. Além disso, é o maior exportador de carne bovina do mundo, sendo que no ano de 2017 exportou o equivalente a 1,5 mil toneladas de carne (FAO, 2017) para mais de 150 países (ABIEC, 2017).

O acelerado crescimento da população mundial gera um significativo aumento da demanda por alimentos, originando preocupação com a produção de proteínas de origem animal para atender o crescente número de habitantes do planeta (FAO, 2017). Desta forma, se torna imprescindível desenvolver e aprimorar tecnologias para colaborarem com o aumento da produtividade, e otimizar os sistemas de criação de bovinos para aumentar a rentabilidade dos rebanhos (BARUSELLI *et al.*, 2019).

Para aumentar a qualidade, produtividade e quantidade da produção de carne bovina, são necessários muitos fatores, dentre eles, o incremento de biotecnologias associadas à reprodução. A biotecnologia mais empregada atualmente é a inseminação artificial (IA), que permite a utilização do sêmen de touros geneticamente superiores e acelera o ganho genético, resultando em bezerros mais produtivos (BARUSELLI *et al.*, 2019). Além disso, com o objetivo de facilitar a utilização da IA, foi desenvolvida uma tecnologia de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), dispensando a necessidade de detecção de estro (BÓ *et al.*, 2007). A IATF antecipa e concentra a concepção no início da estação de reprodução, além de aumentar a eficiência reprodutiva e produtiva das propriedades (BARUSELLI *et al.*, 2018).

O uso da IATF permitiu a adoção de outras tecnologias associadas à reprodução, pois houve uma concentração do manejo reprodutivo dos animais, o que facilitou o incremento dessas técnicas. A ultrassonografia Doppler pode ser utilizada para ressincronizar precocemente a ovulação nos programas de IATF, e tem alta acurácia na detecção de vacas não gestantes (90-95%). Isso permite a redução do intervalo entre inseminações dentro de uma estação reprodutiva (PUGLIESI *et al.*, 2017).

Uma vez que as maiores taxas de perdas embrionárias ocorrem antes dos 45 dias de gestação, e são consideradas a principal causa do aumento no intervalo entre partos, tanto em bovinos de corte quanto de leite (THATCHER *et al.*, 1994). No presente estudo o objetivo foi revisar os principais aspectos relacionados à prenhez inicial de bovinos, que serviram de base para o estudo realizado *in vivo* e apresentado em forma de artigo. Foi realizada a correlação entre a concentração sanguínea de progesterona (P4), diâmetro de corpo lúteo (CL)

e fluxo sanguíneo luteal, cinco dias após a IATF, visto que a P4 é um hormônio determinante para que os eventos associados à prenhez ocorram, e a concentração sanguínea pode influenciar nas taxas de concepção. Este estudo avaliou de três formas diferentes a produção de P4 pelo CL, a fim de estabelecer uma relação entre estes métodos de avaliação e correlacionar com as taxas de prenhez.. Além disso, servir de base para outros estudos que visem a suplementação de P4 após a IATF.

2 A FASE INICIAL DA GESTAÇÃO DE BOVINOS E SUA RELAÇÃO COM A PROGESTERONA

Este tópico tem como objetivo revisar os principais assuntos referentes às mudanças hormonais e fisiológicas do início da gestação de bovinos, contextualizar a importância da P4 nos diferentes momentos após a concepção e explicar brevemente a utilização da ultrassonografia na reprodução de bovinos.

2.1 Início da Embriogênese

Após a fecundação, há a junção dos pronúcleos feminino e masculino, os quais formam a estrutura denominada zigoto. O zigoto, que por sua vez se divide em duas células, é chamado de embrião e cada uma dessas duas células são denominados blastômeros (HYTTEL, SINOWATZ, VEJLSTED, 2012). Os blastômeros sofrem divisões subsequentes em 4 e 8 células, que continuam até o estágio de 16 células, sendo então chamado de mórula (SENGER, 2003). As divisões ou clivagens prosseguem até o momento que se inicia o desenvolvimento do blastocisto, fase em que há formação de uma cavidade repleta de líquido no centro do embrião, a blastocele. Nesse período, são observados dois grupos de células: a massa celular interna, que dará origem ao embrião, e o outro grupo denominado trofotoderma, que dará origem a parte embrionária da placenta (HYTTEL, SINOWATZ, VEJLSTED, 2012).

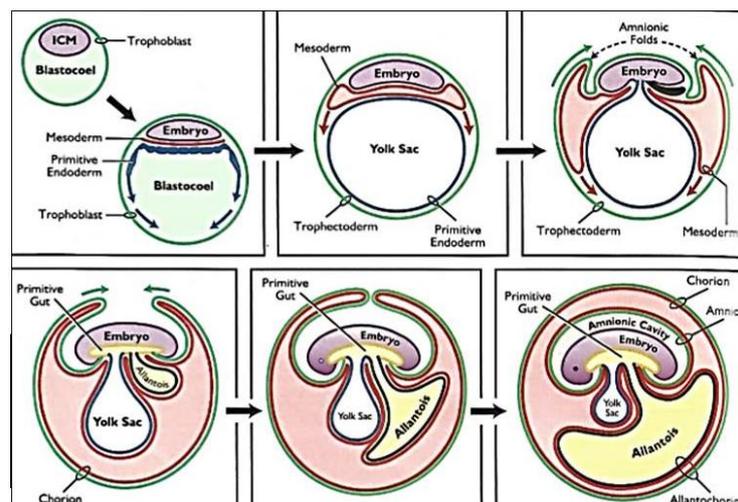
O blastocisto, que tem um crescimento muito acelerado, devido à pressão osmótica no interior da sua cavidade, eclode da zona pelúcida e forma um blastocisto eclodido, o qual flutua livremente dentro do lúmen uterino e é totalmente dependente do ambiente uterino para sua sobrevivência (SENGER, 2003; HYTTEL, SINOWATZ, VEJLSTED, 2012). Além disso, a sobrevivência precoce do embrião depende da função luteal, síntese adequada da P4 e capacidade de resposta do útero à P4 (SENGER, 2003).

2.2 Desenvolvimento das membranas extraembrionárias

A formação das membranas extraembrionárias é uma etapa obrigatória na capacidade do embrião de se fixar no útero. Esses anexos embrionários são um conjunto de quatro membranas anatomicamente distintas que se originam do trofoblasto, endoderme, mesoderme e embrião (SENGER, 2003).

O blastocisto eclodido começa a crescer e desenvolve uma camada de células denominada endoderme primitivo, o qual reveste o trofoblasto. À medida que ocorre o crescimento do endoderme, ocorre também uma evaginação da porção ventral da massa de células internas. Esta evaginação nos embriões dos animais domésticos é uma membrana extra-embriônica transitória que regride à medida que o conceito se desenvolve. O blastocisto se expande e o trofoblasto e mesoderme se tornam o córion. O córion se funde com a parte dorsal do embrião e forma por sua vez o âmnion (SENGER, 2003). O âmnion é preenchido por líquido e serve para proteger o embrião e fornecer proteção para o desenvolvimento embrionário (BALL; PETERS, 2004). Durante o mesmo período em que o âmnion está em desenvolvimento, ocorre uma evaginação da região posterior do intestino primitivo do embrião. Esta evaginação é chamada alantoide, que tem como principal função coletar resíduos fluidos do embrião. O alantoide entra em contato com o trofoblasto para formar o córion, e a partir do momento que o alantoide tem um determinado volume, se funde com o córion e as membranas são chamadas de corioalantoide. A membrana alantocoriônica é a contribuição fetal para a placenta e fornecerá a superfície para anexos ao endométrio (SENGER, 2003). Essa membrana geralmente é bem desenvolvida e eventualmente envolve o embrião, o âmnion e cavidade alantoica, tornando-se muito vascularizada, com vasos que se ramificam até o cordão umbilical (Figura 1) (BALL; PETERS, 2004).

Figura 1 – Evolução das membranas extraembrionárias.



Fonte: SENGER, 2003. *ICM* = massa celular interna; *blastocoel* = blastocel; *mesoderm* = mesoderme; *primitive* = primitivo; *endoderm* = endoderme; *trophoblast* = trofoblasto; *embryo* = embrião; *primitive endoderm* = endoderme primitivo; *yolk sac* = saco vitelínico; *trophectoderm* = trofocoterm; *amnionic folds* = dobras amnióticas; *primitive gut* = intestino primitivo; *allantois* = alantoide; *chorion* = córion; *allantochorion* = alantocoriônica; *amnionic cavity* = cavidade amniótica; *amnion* = âmnion.

A fixação do conceito, para formar uma relação temporária com o útero, é um passo evolutivo que fornece vantagens para o embrião. O desenvolvimento intrauterino garante que o embrião receba nutrição e proteção durante o seu desenvolvimento, ao contrário de animais que são ovíparos, em que as fêmeas nem sempre terminam de cuidar dos ovos até o nascimento, e ficam sujeitos à predação. Entretanto, mamíferos eutérios (animais com placenta) têm uma vantagem em relação às outras classes (SENGER, 2003).

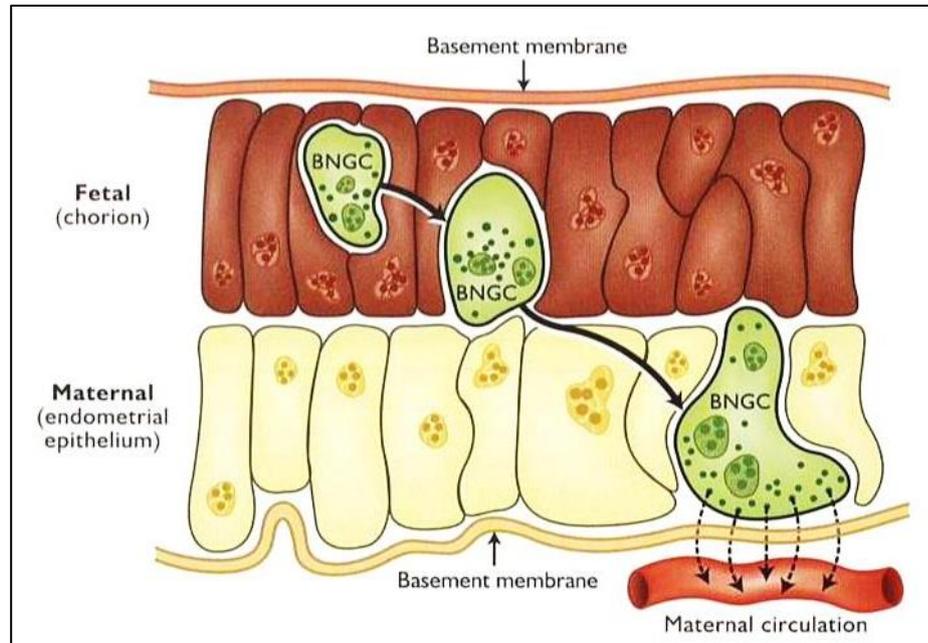
As membranas extraembrionárias irão formar um anexo com o endométrio para fornecer um elo entre a mãe e o feto. Esta ligação semipermanente é o que conhecemos como placenta. A placenta é um órgão transitório muito importante para a manutenção da gestação e é formada pelo córion e o endométrio (SENGER, 2003). Este órgão também é responsável pela troca de oxigênio, dióxido de carbono e nutrientes entre a mãe e o feto, essas trocas ocorrem por meio dos cotilédones (BALL; PETERS, 2004). O cotilédone é definido como uma unidade placentária originada do trofoblasto, composta por vasos sanguíneos e tecido conjuntivo. Entretanto, a placenta produz os hormônios que são responsáveis pelo desenvolvimento embrionário e manutenção da prenhez (SENGER, 2003).

As placentas podem ser classificadas de acordo com a distribuição das vilosidades coriônicas, as quais dão a cada tipo de placenta uma aparência anatômica distinta. Estas vilosidades são pequenas projeções em formas alongadas, que estão na superfície do córion até o endométrio. Em relação à classificação das vilosidades coriônicas, as placentas podem ser difusas, discoidais, zonárias e cotiledonárias (SENGER, 2003). Em ruminantes, a placenta é descrita como cotiledonária, uma vez que a sua fixação ocorre nas áreas endometriais denominadas carúnculas (BALL; PETERS, 2004). O placentoma é o ponto de ligação entre o cotilédone fetal e carúncula materna (oriundo das regiões carunculares do útero) (SENGER, 2003).

A classificação das placentas também pode ser feita pela sua aparência microscópica, em que é classificada pelo número de camadas placentárias que separam o sangue fetal do materno. Os ruminantes têm a placenta epiteliocorial pela classificação microscópica e, além desse fato, é encontrado um tipo único de células na placenta dos ruminantes: as células binucleadas gigantes. Essas células aparecem por volta dos 14 dias em ovelhas e entre os 18 e 20 dias de gestação em vacas, originadas das células trofoblásticas. Durante o desenvolvimento, essas células migram para o epitélio coriônico e invadem o epitélio endometrial, transportando moléculas do feto para a placenta materna (Figura 2). Além disso, essas células secretam uma proteína B específica da prenhez, denominadas glicoproteínas

associadas à prenhez (bPAGs), as quais são exclusivas de ruminantes, e também são locais importantes de esteroidogênese, produzindo P4 e E2 (SENGER, 2003).

Figura 2 - Migração das células gigantes binucleadas na placenta de ruminantes.

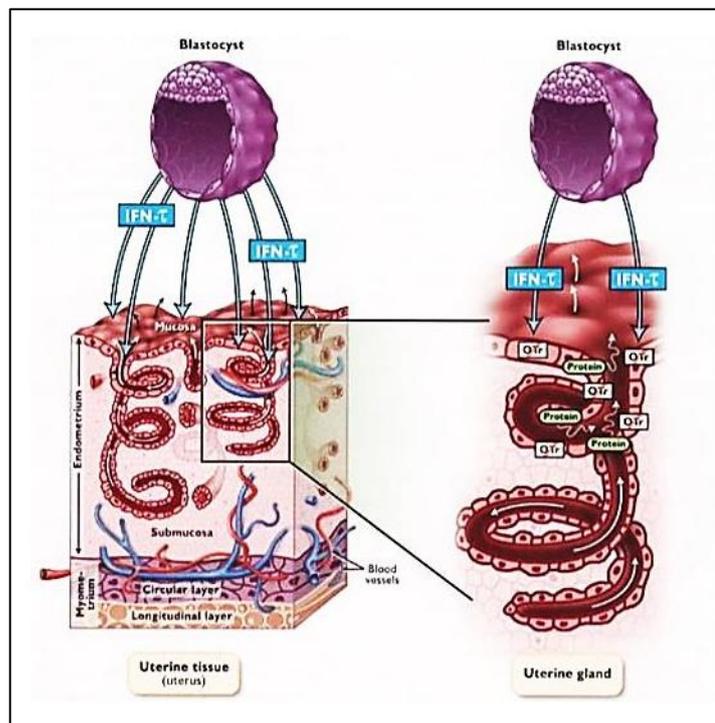


Fonte: SENGER, 2003. *Fetal (chorion)* = córion fetal; *maternal (endometrial epithelium)* = materno (epitélio endometrial); *basement membrane* = membrana basal; *maternal circulation* = circulação materna; *BNGC* = células binucleadas gigantes.

3 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO

O reconhecimento materno da gestação é o momento que o embrião sinaliza para a mãe que ele está presente no lúmen uterino (ANTONIAZZI *et al.*, 2001). Durante esse período, as células do trofoblasto do embrião secretam uma proteína denominada interferon-tau (IFNT) (SPENCER *et al.*, 2004). Essa proteína constitui uma classe de glicoproteínas não específicas produzidas por leucócitos, fibroblastos, linfócitos e células trofoblásticas, e contém ações antivirais que alteram a função da célula alvo (SENGER, 2003). O IFNT é produzido pelo conceito e age de forma parácrina no útero, inibindo a produção de ocitocina no lúmen uterino, e evitando, desta forma a liberação de prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), hormônio responsável pela luteólise (Figura 3) (ANTONIAZZI *et al.*, 2001).

Figura 3 - Inibição da produção de ocitocina pelo IFNT.



Fonte: SENGER, 2003. *Blastocyst* = blastocisto; *IFN-T* = interferon-tau; *endometrium* = endométrio; *mucosa* = mucosa; *submucosa* = submucosa; *protein* = proteína; *OTr* = receptor de ocitocina; *uterine gland* = glândula uterina; *uterine tissue* = tecido uterino; *blood vessels* = vasos sanguíneos.

Na fêmea bovina, o IFNT é sintetizado entre os dias 10 e 15 após a fecundação e alcança seus níveis máximos entre os dias 16 e 18, quando fisiologicamente começaria a liberação pulsátil de $\text{PGF2}\alpha$, e é nesse período que ocorre o alongamento do embrião (ANTONIAZZI *et al.*, 2001). Em bovinos, ovinos e caprinos, para que ocorra o reconhecimento materno da gestação, é necessário que o concepto esteja alongado de forma tubular e filamentosa para a produção do IFNT. A presença do embrião resulta no efeito antiluteolítico que atua na manutenção do corpo lúteo (CL) funcional e, conseqüentemente na secreção de P4, hormônio essencial para o desenvolvimento embrionário (SPENCER *et al.*, 2004).

4 IMPORTÂNCIA DA PROGESTERONA NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS

Há muito tempo tem sido atribuída à progesterona funções importantes da reprodução. Dentre elas a expressão de estro, função cíclica normal, relação do eixo hipófise-gônadas e manutenção da gestação (GOMES; ERB, 1965). Visto que a maioria das perdas embrionárias em bovinos ocorrem precocemente durante a gestação, em torno ou antes do reconhecimento materno da gestação. Além disso, grande parte das perdas embrionárias podem ser atribuídas a concentrações plasmáticas de P4 inadequadas. O crescimento e o desenvolvimento do embrião exige a ação da P4 no útero para regular a função endometrial, incluindo interações conceito-maternas, reconhecimento materno da gestação e receptividade uterina para implantação do embrião (LONERGAN, 2011).

4.1 A progesterona na puberdade

O início da puberdade coincide com o momento em que uma novilha se encontra apta a conceber. É definida a partir do primeiro estro seguido de ovulação e uma fase lútea normal. Porém, a detecção do estro não pode ser definida como único critério para o estabelecimento do início da puberdade, já que não é incomum que novilhas manifestem estro quando ainda não são consideradas púberes. Novilhas não púberes podem ter estro sem uma função lútea normal subsequente. Além disso, a expressão de estro em novilhas não púberes pode ser afetada por vários fatores, incluindo raça, idade ou fotoperíodo (ATKINS; POHLER; SMITH, 2013).

O hipotálamo é o principal local de alteração durante a transição para a maturidade sexual. A maturação do hipotálamo resulta da diminuição do *feedback* negativo do estradiol (E2), que leva ao aumento da frequência dos pulsos de LH (hormônio luteinizante). O aumento da liberação dos pulsos de LH durante a maturação sexual é o principal fator que regula o início da puberdade em ovelhas e novilhas. Esse aumento da frequência dos pulsos de LH melhora o desenvolvimento dos folículos ovarianos, os quais produzem E2 suficiente para induzir um estro comportamental. No período que antecede a puberdade, a luteinização dos folículos resulta em aumentos transitórios de P4, por períodos mais curtos que as fases lúteas típicas, as quais ocorrem em vacas maduras. Quando há o desaparecimento das estruturas luteais transitórias, a puberdade é atingida com a ocorrência do primeiro estro comportamental, o qual é acompanhado por ovulação e desenvolvimento de um CL funcional. No entanto, as novilhas geralmente apresentam uma fase lútea curta antes do início da

puberdade, semelhante a fases lúteas curtas observadas em vacas no pós-parto (KINDER *et al.*, 1995). Os mecanismos associados à essa função lútea anormal podem incluir: inadequado desenvolvimento folicular pré-ovulatório; diminuição da função luteotrófica e prematura secreção luteolítica em novilhas (GARVERICK; SMITH, 1986).

A fase lútea curta que antecede a puberdade tem um papel importante na regressão lútea para o próximo ciclo. Durante essa fase curta, há uma liberação prematura do hormônio luteolítico $PGF2\alpha$, que causa uma regressão lútea prematura (ATKINS; POHLER; SMITH, 2013). Se uma novilha conceber e houver liberação precoce de $PGF2\alpha$, o sinal de reconhecimento materno (IFNT) não será capaz de impedir a luteólise e ocorre uma falha na concepção. No entanto, é necessário um período de P4, seguido de um aumento de E2, para que a liberação de $PGF2\alpha$ no útero ocorra no momento apropriado e, conseqüentemente, uma fase lútea normal durante o ciclo subsequente (KIEBORZ-LOOS *et al.*, 2003).

Protocolos hormonais são utilizados para reduzir a idade à puberdade em novilhas. Desta forma, é esperado que aumente a eficiência reprodutiva do rebanho, reduzindo a idade ao primeiro parto. Estes protocolos podem ter associação de hormônios como: P4, hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), gonadotrofinas coriônicas humanas (hCG), gonadotrofina coriônicas equina (eCG), E2 e $PGF2\alpha$ (SILVA *et al.*, 2018). Os progestágenos são compostos similares à P4, que podem ser administrados por via oral, implantes subcutâneos ou dispositivos intravaginais. O uso destes compostos diminui a quantidade de receptores de estradiol no hipotálamo, o que reduz o *feedback* negativo desse hormônio sobre a liberação de GnRH, ocasionando aumento na liberação de LH. Este é o mecanismo responsável pela indução da puberdade nos tratamentos com progestágenos (DAY; ANDERSON, 1998).

Estudos realizados por Anderson, Mcdowell e Day (1996) investigaram os motivos pelos quais a administração de progestágenos induzem a puberdade em novilhas. Num primeiro experimento, novilhas pré-púberes receberam um implante auricular de P4 (Norgestomet - Crestar[®] 6 mg) por um período de 10 dias ($n = 15$) e 14 novilhas ficaram sem o implante. As taxas de animais púberes, consideradas quando excederam 1ng/mL de concentração de P4 em duas amostras consecutivas (85,7%) e a frequência dos pulsos de LH foram superiores nas novilhas tratadas em relação às novilhas controle (0%). Num segundo momento, a puberdade foi induzida em 75% de novilhas tratadas com um implante e 81% das tratadas com três implantes. A frequência dos pulsos de LH foi suprimida durante o tratamento das novilhas com três implantes. Os resultados concluem que o mecanismo pelo qual os progestágenos induziram a puberdade foi por diminuir os receptores de estradiol no hipotálamo, reduzindo o *feedback* negativo do estradiol sobre a liberação de GnRH, que por

sua vez aumentou a pulsatilidade de LH, e ocasionou um crescimento folicular. Promoveu uma maior produção de estradiol pelos folículos ovarianos e o pico pré-ovulatório de LH, resultando na ovulação.

RASBY *et al.* (1998) realizaram um experimento com o objetivo de determinar se o tratamento de novilhas de corte peri-púberes com P4 (n = 311), utilizando um dispositivo intravaginal com ou sem combinação de benzoato de estradiol, induziria o estro e causaria o desenvolvimento de CL funcional. As novilhas foram designadas para seguir os seguintes tratamentos: Tratamento 1 (placebo por 7 dias), tratamento 2 (dispositivo intravaginal de P4 por 7 dias), tratamento 3 (dispositivo intravaginal de P4 por 7 dias e 1 mg de benzoato de estradiol 24-30h após a remoção do dispositivo). Uma proporção maior de novilhas do tratamento 3 estavam em estro (81%) em relação às novilhas do tratamento 2 (37%), e formaram CL normal (68% vs 44%, respectivamente) após a remoção do dispositivo. Além disso, a concentração plasmática de P4 mostrou que novilhas com aumento de P4 ($\geq 0,5$ ng/mL) no dia 15 (D0 = inserção do dispositivo intravaginal) desenvolveram um CL funcional, quatro dias após a remoção do dispositivo. As novilhas que no dia 15 tinham P4 ($\geq 0,5$ ng/mL), mas no dia 22 tiveram uma redução para ($\leq 0,5$ ng/mL) indicaram que um ciclo estral curto ocorreu e por fim, novilhas que aumentaram as concentrações em ($\geq 0,5$ ng/mL) no dia 22, formaram um CL funcional. Portanto, o tratamento com P4 aumentou a proporção de novilhas no estro. Além disso, a adição de benzoato de estradiol aumentou ainda mais essas respostas.

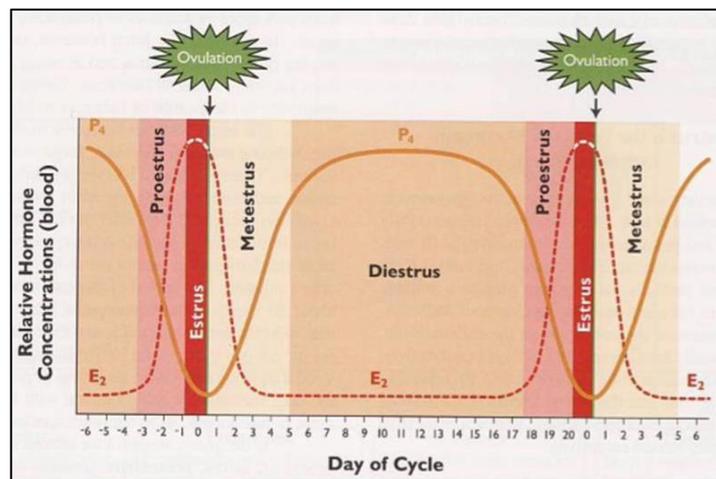
4.2 Papel da progesterona no ciclo estral

Após a puberdade, a fêmea entra no período de ciclicidade reprodutiva, que perdura durante grande parte de sua vida. O ciclo estral compreende uma série de eventos previstos antes do estro. Em geral, o ciclo estral é categorizado conforme a frequência de ocorrência no ano, e essa classificação pode ser dividida da seguinte forma: poliéstricas, poliéstricas estacionais e monoéstricas. Poliéstricas são as vacas, ratas e porcas, as quais têm uma distribuição de ciclos estrais que ocorrem regularmente durante o ano todo. No entanto, as éguas e ovelhas, são classificadas como poliéstricas estacionais, ou seja, os ciclos estrais ocorrem somente durante uma estação do ano (SENGER, 2003).

O estro nas fêmeas bovinas é observado a cada 21 dias, podendo variar entre 18 a 24 dias. É considerado o dia zero do ciclo estral, com duração média de 18 horas. A ovulação ocorre em geral, 30 horas após o início do estro, quando já não há mais sinais de estro

(GORDON, 1996). O ciclo estral é dividido em duas grandes fases, a folicular e a luteal. A fase folicular é relativamente curta, correspondendo a 20% do período do ciclo estral, sendo marcada pela regressão do CL para que ocorra a ovulação. Durante essa fase, as estruturas ovarianas primárias se desenvolvem e há o crescimento do folículo dominante, que produz estradiol, hormônio esteroide. A fase luteal, ocupa cerca de 80% do ciclo estral, e corresponde ao período que ocorre a ovulação até a regressão do CL. Nessa fase, a estrutura ovariana dominante é o CL, o qual produz P4 (SENGER, 2003). O ciclo estral na vaca pode ser dividido em quatro estágios: proestro, estro, metaestro e diestro e essas divisões compreendem as fases folicular (proestro e estro) e luteal (metaestro e diestro) (Figura 4).

Figura 4 - Ciclo estral da fêmea bovina representado pelos diferentes estágios.



Fonte: SENGER, 2003. *Proestrus* = proestro; *estrus* = estro; *metestrus* = metaestro; *diestrus* = diestro; *ovulation* = ovulação; *day of cycle* = dia do ciclo; *E2* = estradiol, *P4* = progesterona; *relative hormone concentrations (blood)* = concentração relativa de hormônio (sangue).

Durante a ovulação, ocorre o rompimento de vasos sanguíneos. Essa ruptura vascular resulta em uma estrutura denominada corpo hemorrágico, devido à sua aparência. Essa estrutura se forma logo após a ovulação e, por volta de 3 a 5 dias, o CL começa a aumentar de tamanho e perde sua aparência hemorrágica (SENGER, 2003). Ocorre uma diferenciação das células foliculares, pois as células que antes secretavam E2 passam a produzir P4, devido ao aumento do LH (BALL; PETTERS, 2004). Durante a fase lútea média (diestro), o CL é totalmente funcional e produz P4 em altas concentrações (SENGER, 2003). Essas concentrações plasmáticas de P4 começam a aumentar a partir do dia 4 do ciclo, atingindo um pico em torno do dia 8 e permanecem altas até o dia 17. Ocorrem alterações pulsáteis na concentração plasmática de P4 durante a fase lútea e estão diretamente relacionadas aos

pulsos de FSH da hipófise anterior. Além disso, os pulsos de LH são de alta amplitude e baixa frequência, embora a frequência de LH seja relativamente baixa, é suficiente para a manutenção da função lútea, considerado o principal hormônio luteotrófico na vaca não gestante (BALL; PETTERS, 2004).

O papel da alta concentração de P4 durante a fase lútea é preparar o útero para a recepção do embrião e, além disso, promove *feedback* negativo na liberação de GnRH e LH. No entanto, as ondas foliculares continuam a crescer e regredir, sendo que em cada ciclo podem ocorrer de 2 a 3 ondas foliculares (BALL; PETTERS, 2004). As duas primeiras ondas foliculares ocorrem durante a elevação da P4, no metaestro, ou durante o pico de produção no diestro. Os folículos recrutados e selecionados durante essas fases do ciclo entrarão em atresia. Entretanto, a última onda folicular, que ocorre quando ainda há progesterona circulante, resulta em um folículo dominante que irá ovular quando ocorre a luteólise (SENGER, 2003).

4.3 Efeito da progesterona na gestação

Os hormônios das gônadas induzem modificações cíclicas no endométrio uterino. O E2 influencia na congestão e edema da mucosa uterina, que tem o predomínio de células epiteliais colunares, e são preenchidas com mucina. Além disso, o E2 durante o período de proestro e estro, influencia também no crescimento das glândulas endometriais, e esta fase frequentemente é chamada de proliferativa. O desenvolvimento glandular uterino é associado ao estro, e entre 3 a 5 dias após o estro, a P4 aumenta e estimula o desenvolvimento e secreção das glândulas endometriais, chamada de fase secretora (HOPKINS, 2003).

Após a ovulação, ocorre um aumento da P4 circulante, e isso está associado ao sucesso da prenhez em rebanhos de corte ou leite (FORDE *et al.*, 2009). Estes mesmos autores estudaram como a concentração alta de P4 altera a expressão gênica endometrial para que ocorra o desenvolvimento do concepto. Observaram que P4 elevada altera a expressão gênica no endométrio, e que normalmente essas alterações ocorrem durante a prenhez, resultando em maior alongamento do concepto. Porém, tanto em fêmeas cíclicas como em gestantes, ocorrem alterações na expressão gênica do endométrio até o início do alongamento do concepto, sugerindo que o útero se prepara para uma gestação independente da concepção. Esse fato condiz com a possibilidade de transferir um embrião para um útero síncrono no dia 7 após o estro e estabelecer uma maior taxa de concepção. Isso está associado ao reconhecimento materno da gestação, que ocorre aproximadamente no dia 16 em bovinos, e

mudanças significativas no perfil transcriptômico são detectáveis entre o endométrio de uma fêmea cíclica e uma gestante, quando o endométrio responde a concentrações crescentes de IFNT secretado pelo concepto (CLEMENTE *et al.*, 2009).

A P4 desempenha um papel fundamental nos eventos reprodutivos associados ao estabelecimento e manutenção da prenhez (LONERGAN, 2011) e em várias espécies é secretado pelo CL, pela placenta ou pelos dois (PINEDA, 2003). Em bovinos, a produção de P4 pela placenta ocorre a partir dos 6 meses de gestação, antes deste período a produção de P4 é totalmente pelo CL, este por sua vez começa a se desenvolver após a ovulação e secreta P4, promovendo o aumento e multiplicação das células superficiais do endométrio (SENGER, 2003).

Para o crescimento e desenvolvimento do concepto, é necessária a ação de P4 no útero, responsável por regular a função endometrial, incluindo interações concepto-maternas, reconhecimento materno da prenhez e receptividade uterina para implantação do embrião. Os efeitos da P4 elevada logo após a concepção no alongamento do concepto foram demonstrados em bovinos e ovinos (LONERGAN, 2011). Segundo Garrett (1988), vacas que receberam 100 mg de P4 nos dias 1, 2, 3 e 4 de prenhez, tiveram aumento na concentração plasmática de P4 nos dias 2 e 5, e, conseqüentemente, resultou em conceptos maiores no dia 14. Sendo assim, os resultados da suplementação de P4 indicam um papel importante desse hormônio na regulação materna com o concepto e o desenvolvimento inicial da prenhez em bovinos. Esse estudo demonstra a importância da P4, sugerindo que ela estimula a secreção endometrial e favorece o crescimento do concepto no início do desenvolvimento embrionário.

5 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE PRENHEZ

Muitos métodos diretos e indiretos estão disponíveis para auxiliar no diagnóstico precoce de prenhez. Incluem-se nesses métodos a palpação retal, o uso da ultrassonografia, quantificação de IFNT (HAQ *et al.*, 2016) e presença de glicoproteínas associadas à prenhez (bPAGs) (FRIEDRICH; HOLTZ, 2010).

5.1 Palpação retal

A palpação retal é um método prático de diagnóstico dos órgãos genitais, utilizada em bovinos, búfalos e equinos. Em pequenos animais, esse exame é substituído por palpação abdominal. Para fins de diagnóstico de gestação, nas fêmeas bovinas, a vesícula amniótica pode ser detectada dentro do lúmen uterino a partir dos 30 dias de prenhez (KUMAR, 2009).

5.2 Ultrassonografia modo B

A ultrassonografia modo brilho (B; escala de cinza) proporciona uma imagem bidimensional dos tecidos avaliados. É muito utilizada para avaliações de matrizes no início dos protocolos de IATF e também na avaliação de receptoras de embriões (PUGLIESI *et al.*, 2017). Além disso, o diagnóstico da gestação por ultrassonografia é realizado a partir de 28 dias após a inseminação, com o objetivo de identificar as vacas prenhes precocemente e propiciar a segunda inseminação das vazias, reduzir o intervalo entre as inseminações e, desse modo, o intervalo do parto à concepção (VASCONCENLOS; GARCIA, 2006).

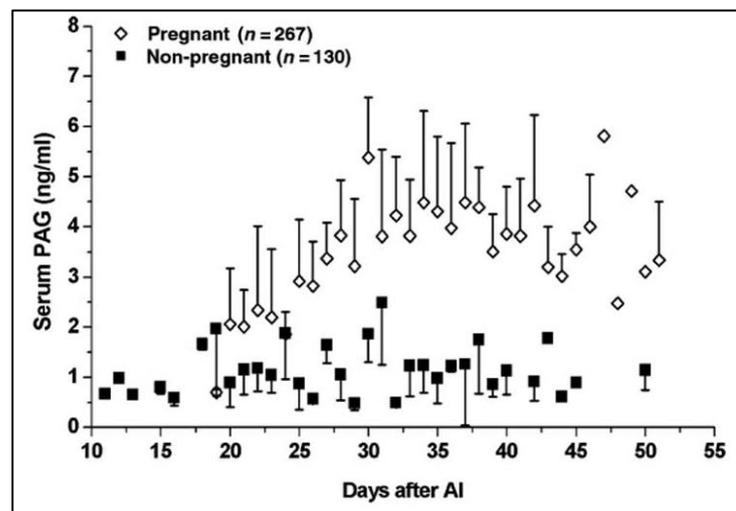
5.3 Glicoproteínas associadas à prenhez

Foi demonstrado em várias espécies de mamíferos que, durante a prenhez, as células trofoblásticas expressam uma série de glicoproteínas associadas à prenhez (bPAG). A presença da bPAG no soro de vacas gestantes pode servir como um indicador de prenhez a partir do dia 28 após a concepção (FRIEDRICH; HOLTZ, 2010).

Friedrich e Holtz (2010) observaram a concentração sérica das bPAG de 397 vacas, entre 20 e 50 dias após a inseminação (Figura 5). Observaram que a prenhez pode ser diagnosticada com 28 dias no soro e 150 dias no leite, e afirmaram que o teste de ELISA é um meio eficiente e confiável para mensurar bPAG para o estabelecimento do diagnóstico de gestação em bovinos. Entretanto, houve uma concentração elevada de bPAG em fêmeas não gestantes durante esse estudo, e este fato pode ser explicado pela bPAG residual em vacas

inseminadas antes dos 50 dias pós-parto. Segundo Zoli *et al* (1992), as concentrações séricas de bPAG aumentam à medida que a gestação avança, principalmente durante o pré-parto e atingem o pico de produção de 1 a 5 dias antes do parto. Logo após o parto, as concentrações séricas de bPAG reduzem de maneira constante, porém são indetectáveis somente a partir do dia 100 pós-parto. Portanto, os resultados falsos positivos podem ocorrer em 6,90% dos casos, quando comparada a detecção de bPAG à palpação retal.

Figura 5 - Concentração sérica de glicoproteínas associadas à prenhez (bPAG) entre 20 e 50 dias após a IA.



Fonte: Friedrich e Holtz (2010). *Pregnant* = prenhe; *non-pregnant* = não prenhe; *serum PAG* = glicoproteína sérica; *days after AI* = dias após IA.

5.4 Ultrassonografia modo Doppler

Este modo de ultrassonografia é utilizado para a avaliação da perfusão sanguínea. Na análise da funcionalidade do CL, utiliza-se a ultrassonografia no modo Color-Doppler, uma técnica pouco invasiva, utilizada para diagnóstico precoce de gestação com 20-22 dias. Além disso, tem uma acurácia de 90-95% em vacas não gestantes (PUGLIESI *et al.*, 2017). Pode ser utilizado para avaliação uterina em vacas. Honnens *et al* (2008) compararam o fluxo sanguíneo entre vacas, 14 cíclicas e 39 após a inseminação. O fluxo sanguíneo foi avaliado pelo índice de pulsatilidade da artéria uterina ipsilateral ao CL. Encontraram diferenças no fluxo sanguíneo de vacas cíclicas e prenhes somente no dia 18 (dia 0 = estro). Os resultados mostraram que as alterações no fluxo sanguíneo em vacas gestantes podem ser detectadas na segunda semana após inseminação, já que essas mudanças não ocorrem na segunda semana do ciclo estral em vacas não gestantes. Este tópico será abordado melhor no item 6.

6 USO DA ULTRASSONOGRAFIA MODO DOPPLER

O uso intensivo da ultrassonografia Doppler em vários estudos nos últimos dez anos possibilitou a caracterização do fluxo sanguíneo e, estimativa da funcionalidade de alguns órgãos reprodutivos em bovinos. Durante esse período de estudos, a ultrassonografia alcançou grandes dimensões, tanto nos centros de pesquisas como também no campo em atividades pecuárias. Isso possibilitou melhoras de diagnóstico clínico e também na eficiência reprodutiva dos rebanhos de corte e leite (PUGLIESI *et al.*, 2017).

Os equipamentos de ultrassonografia Doppler usam como base a diferença entre a frequência das ondas refletidas em estruturas que estão se movimentando com a frequência emitida pelo transdutor, resultando assim no deslocamento de frequência Doppler. Na circulação sanguínea essas diferenças ocorrem devido à movimentação das células vermelhas, que fazem uma diferença positiva, ou seja, de maior frequência ou então negativa, de menor frequência. Isso varia de acordo com a movimentação em sentido favorável ou não ao transdutor (SZATIMÁRI; SÓTONYI; VÖRÖSS, 2000).

A ultrassonografia modo Doppler pode ser usada em 3 modos de avaliação da perfusão sanguínea: Color-Doppler, Espectral e Power-Doppler (PUGLIESI *et al.*, 2017). No modo Color-Doppler, são exibidas as informações bidimensionais do fluxo em cores sobrepostas a uma imagem do modo B de um vaso ou tecido. Dentro da caixa de cores (volume de amostra dentro de uma região), cada ponto móvel é vermelho ou azul ao invés de um tom de cinza observado no modo B. O fluxo em direção ao transdutor é vermelho e o fluxo ao contrário do sentido do transdutor é azul. Essa técnica fornece informações de movimento sobre uma parte maior da imagem, como se fosse um mapa. A imagem em cores permite avaliar a presença, direção e qualidade do fluxo sanguíneo, sendo uma técnica mais rápida que qualquer outra técnica não invasiva (SZATIMÁRI; SÓTONYI; VÖRÖSS, 2000).

O modo Espectral permite com que a frequência detectada pelo ultrassom seja projetada em um gráfico, e a onda do Doppler é formada durante o ciclo cardíaco na avaliação da perfusão sanguínea das artérias. Neste modo, os índices de resistência e pulsatilidade são calculados automaticamente pelo *software* do próprio equipamento (PUGLIESI *et al.*, 2017).

Por fim, o Power-Doppler é semelhante ao Color-Doppler; no entanto, utiliza-se apenas a cor laranja e os seus tons podem ser vistos dentro de uma caixa de cores. Os tons mais claros indicam um fluxo maior, ou seja, mais células sanguíneas fluíram nessa região. Porém, essa técnica não fornece nenhuma informação sobre a direção e velocidade do fluxo.

Esta técnica é utilizada para detectar vasos sanguíneos pequenos ou que tenham um fluxo muito lento (SZATIMÁRI; SÓTONYI; VÖRÖSS, 2000).

6.1 Uso da ultrassonografia Doppler na reprodução

Os primeiros estudos com a ultrassonografia em modo Doppler na reprodução baseavam-se nas informações obtidas nas grandes artérias (ovariana, uterina e vaginal), as quais são responsáveis pela irrigação sanguínea do trato reprodutivo (BOLLWEIN *et al.*, 1998). No entanto, estudos mais recentes tendem a realizar exames diretamente no tecido desejado, como os ovários (folículo e CL) e endométrio (SILVA; GINTHER, 2006). Entretanto, pode ser utilizada na avaliação da perfusão sanguínea uterina, para observação da gestação e também para diagnóstico de infecções uterinas; avaliação da funcionalidade do folículo dominante e do CL; detecção da luteólise para diagnóstico de gestação; utilização em programas de ressincronização precoce da ovulação após programas de IATF; diagnóstico precoce de gestação e seleção de receptoras em programas de TETF (PUGLIESI *et al.*, 2017).

6.2 Uso da ultrassonografia Doppler na avaliação ovariana

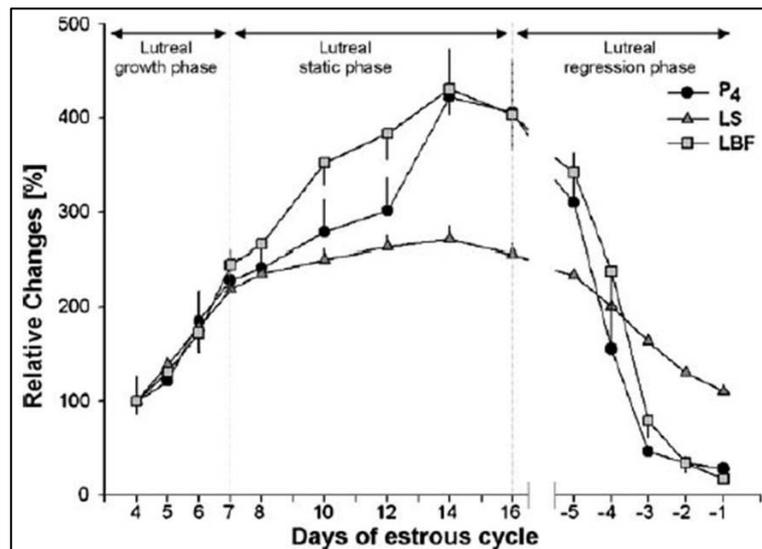
No manejo reprodutivo de equinos, a detecção precoce do início da atividade cíclica é um ponto muito importante para a avaliação reprodutiva. Com essa avaliação é possível realizar uma maior produção de embriões na estação de reprodução, e reduz o custo desnecessário com tratamentos para a indução da ovulação. Com o uso do Doppler, é possível determinar o potencial ovulatório do folículo dominante (ACOSTA *et al.*, 2004).

A avaliação da função do CL em bovinos é um aspecto importante para o manejo reprodutivo, sendo desenvolvida como ferramenta de diagnóstico junto à palpação retal em vacas. Além disso, a avaliação do tamanho de tecido luteal é positivamente correlacionada com as concentrações circulantes de P4 e serve como um indicativo da atividade luteal durante o período de regressão do CL. Porém, esta correlação é menor devido às taxas de decréscimo de P4 serem mais rápidas que do tamanho do CL (ASSEY *et al.*, 1993).

No estudo de Herzog *et al.* (2010) foi avaliada a confiabilidade do fluxo sanguíneo luteal, com a ultrassonografia modo Color-Doppler, comparado aos resultados estabelecidos pelo tamanho do CL, determinado pela ultrassonografia modo B e com a concentração plasmática de P4. No total foram realizados 14 exames ultrassonográficos em 10 vacas Holandesas (*Bos taurus*) lactantes. A ovulação foi considerada o dia 1 e os exames foram realizados nos dias 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, -5, -4, -3, -2, -1 do ciclo estral. O tamanho

luteal dobrou durante a fase de crescimento do CL (até o dia 7) e permaneceu desse tamanho durante os dias 8 a 16 (fase de estática luteal), depois reduziu de tamanho durante a fase de regressão luteal (dias -5 a -1). Na avaliação do fluxo sanguíneo luteal, o grau de fluxo dobrou durante a fase de crescimento do CL, aumentou ainda mais durante os dias 8 a 16 e reduziu rapidamente durante a regressão luteal, o que mostra uma alta correlação com a concentração plasmática de P4, que aumentou durante a fase de crescimento luteal de 1,7 ng/mL (dia 4) para 4 ng/mL (dia 7). Além disso, durante a fase de estática luteal (dia 14) a P4 chegou na sua máxima concentração, apresentando 7,3 ng/mL, e durante a regressão luteal diminuiu rapidamente, atingindo concentração de 0,8 ng/mL (dia -3). Portanto, o fluxo sanguíneo é altamente confiável para definir a atividade luteal, refletindo melhor a função lútea do que o tamanho do CL, especificamente durante a fase de regressão luteal (Figura 6).

Figura 6 - Relação entre a concentração plasmática de progesterona (P4), fluxo sanguíneo luteal (LBF) e área de CL (LS), durante o ciclo estral.



Fonte: Herzog *et al* (2010). *Relative changes* = mudanças relativas; *days of estrous cycle* = dias do ciclo estral; *luteal growth phase* = fase de crescimento luteal; *luteal static phase* = fase de estática luteal; *luteal regression phase* = fase de regressão luteal.

A ultrassonografia é amplamente utilizada em várias espécies. Em um estudo conduzido em humanos, foi avaliada a capacidade da ultrassonografia Doppler por via transvaginal para avaliação da vascularização folicular em mulheres submetidas à fertilização *in vitro* (FIV). Um total de 188 folículos foram estudados provenientes de 38 mulheres e verificou-se que houve uma tendência de que folículos com maior vascularização apresentavam maiores taxas de fertilização. Portanto, este estudo preliminar sugeriu que a

vascularização folicular pode estar associada à maior taxa de gravidez e que há uma possível ligação entre a vascularização folicular e o potencial da implantação do embrião (CHUI *et al.*, 1997). Em vacas, também é estudada a função ovariana através do Doppler, segundo Pugliesi *et al* (2016) um folículo pré-ovulatório menor e menos vascularizado resulta em um CL menor e menos funcional, e isso reduz as taxas de prenhez em relação à IA em vacas de corte cíclicas.

6.3 Uso da ultrassonografia Doppler em programas de ressincronização

Com a ultrassonografia Doppler, existe a possibilidade de diagnosticar com acurácia 90-95% das vacas não gestantes entre 20 e 22 dias pós-IA. Isso permitiu que as implementações de algumas estratégias reduzissem o intervalo entre IAs numa estação de reprodução em bovinos de corte. Uma dessas estratégias foi a antecipação de 8 dias para a realização da segunda IATF, o que possibilitou ressincronizar as vacas no dia 22 e realizar o diagnóstico de gestação convencional aos 30 dias. Portanto, isso só é possível com o diagnóstico precoce da gestação pela ultrassonografia Doppler aos 22 dias (PUGLIESI *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado por Penteadó *et al.* (2016) foi comparado o uso da ressincronização precoce (22 dias) e super-precoce (14 dias) em 244 vacas Nelore lactantes. As vacas receberam a primeira IATF e foram distribuídas nos dois grupos: 22 e 14 dias. As vacas do grupo de ressincronização super-precoce receberam a aplicação de 100 mg de P4 injetável associado ao dispositivo intravaginal de P4 (após 14 dias da IATF). No dia 22 pós-IA, foi realizada a ultrassonografia no modo Color-Doppler para realização do diagnóstico de gestação pela funcionalidade do CL. As vacas com baixa ou ausência de perfusão sanguínea foram consideradas não prenhes e seguiram o protocolo estabelecido de IATF. Já as vacas consideradas gestantes, passaram por remoção do dispositivo intravaginal de P4, sem nenhum tratamento adicional. A taxa de concepção não diferiu entre os grupos: 51% (super-precoces) vs 56% (precoces). Entretanto, a ressincronização super-precoce aumentou a taxa de serviço (realizada a cada 21 dias) de 66% para 87,5% em relação à ressincronização precoce de 22 dias. Este estudo sugere que a ressincronização com o uso do Doppler pode ser utilizada de forma ampla e eficaz no diagnóstico precoce de gestação, já que é uma ferramenta interessante para aumentar a eficiência reprodutiva em uma estação de reprodução.

7 CONCLUSÃO

A fase inicial da gestação de bovinos é um momento muito importante para a manutenção da gestação. O sucesso neste período depende de muitos fatores, dentre eles a concentração de P4. Entretanto, esse hormônio atua em diversas fases da vida reprodutiva de um animal, ou seja, no ciclo estral, na indução da puberdade, no endométrio e na manutenção da gestação. A partir disso, a glândula produtora desse hormônio (CL) pode ser avaliada de várias formas, seja no leite, soro, ultrassonografia. Com base nisso, a ultrassonografia Doppler é uma ferramenta que pode avaliar a funcionalidade dessa estrutura, auxiliando na estação reprodutiva e reduzindo o intervalo entre partos, e, além disso, pode ser utilizada para a avaliação do CL em momentos diferentes do ciclo estral. Portanto, é uma ferramenta utilizada para aumentar ainda mais a eficiência reprodutiva dos rebanhos.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J. *et al.* A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F2a injection in the cow. **Biology of reproduction**, Oxford, v. 66, n. 3, p.651-658, 2002.
- ACOSTA, T.J. *et al.* Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. **Biology of Reproduction**, Oxford, v.71, p.637-642, 2004.
- ANDERSON, L.H.; MCDOWELL, C.M.; DAY, .L. Progestin induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. **Biology of reproduction**, Oxford, v. 54, p. 1025-1031, 1996.
- ANTONIAZI, A.Q. *et al.* Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, p.176-185, 2011.
- ASSEY, R.J. *et al.* Corpus luteum size and plasma progesterone levels in cattle after cloprostenol-induced luteolysis. **Theriogenology**, Stoneham, v. 39, n. 6, p. 1321-1330, 1993.
- Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes, ABIEC (2017). Disponível em: <http://www.abiec.com.br/Exportacoes.aspx>. Acesso outubro de 2019.
- ATKINS, J.A.; POHLER, K.G.; SMITH, M.F. Physiology and endocrinology of puberty in heifers. *In* **Veterinary clinics of North America: food animal practice**. Philadelphia, Elsevier; 2013. p. 479–92.
- BALL, P.J.H.; PETERS, A.R. **Reproduction in Cattle**. 3 ed. Oxford. Blackwell publishing, 2004.
- BARUSELLI, P.S. *et al.* Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2019)**; Gramado, RS, 15 a 17 de maio de 2019.
- BARUSSELI, P.S. *et al.* Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. **Animal**, Córdoba, v. 12, n. s1, p. 45-52, 2018.
- BAZER, F.W. *et al.* Comparative aspects of implantation. **Society for Reproduction and Fertility**, Clayton South, v. 138, n. 2, p. 195-209, 2009.
- BEARDEN, H; HANSEL, W; BRATTON, R. Fertilization and embryonic mortality rates for bulls and histories of either low or high fertility in artificial breeding. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 39, n. 3, p.312, 1956.
- BICALHO, R.C. *et al.* Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v.70, n. 2, p. 199-207, 2008.
- BÓ, G.A. *et al.* Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of Bos indicus cattle. **Society Reproduction Fertility**, Clayton South, v.64, p. 223-236, 2007.

BOLLWEIN, H. *et al.* Transrectal color Doppler sonography of the a uterine. **Theriogenology**, Stoneham, v.49, p.1483-1488, 1998.

CHUI, D.K.C. *et al.* Follicular vascularity the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in-vitro fertilization programme: a preliminary study. **Human reproduction**, v. 12, p.191-196, 1997.

CLEMENTE, M. *et al.* Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Society for Reproduction and Fertility**, Teddington, v.138, n. 3, p.507–517, 2009.

DAY, M.L.; ANDERSON, L.H. Current Concepts on the Control of Puberty in Cattle. **Journal of animal science**, USA, v.76, p. 1-15, 1998.

DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Society for Reproduction and Fertility**, Teddington, v. 59, n.2, p. 463-468, 1980.

FERGUSON, C.E. *et al.* Evidence for a direct effect of P4 on IVF-derived bovine 8-cell embryos. **Reproduction, fertility and development**, Clayton South, v. 17, p. 219, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). (2017). Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>. Acesso out. de 2019.

FORDE, N. *et al.* Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. **Biology of reproduction**, Oxford, v. 81, n. 4, p. 784- 794, 2009.

FORDE, N. *et al.* Temporal changes in endometrial gene expression in cattle in response to the presence of a conceptus: how soon does the cow know she is pregnant? **Biology of reproduction**, Oxford, v. 85, p. 144-156, 2011.

FREDERICH, M.; HOLTZ, W. Establishment of an ELISA for measuring bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum or milk and its application for early pregnancy detection. **Reproduction in Domestic Animals**, Hoboken, v. 45, p. 142-146, 2010.

GARRET, J.E. *et al.* Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **Journals of Reproduction & Fertility**, Tehran, v. 84, n .2, p. 437-446, 1988.

GARVERNICK, H.A.; SMITH, M.F. Mechanisms associated with subnormal luteal function. **Journal of Animal Science.**, v. 62, n.2, p.92-105, 1986.

GOFF, AK.; SMITH, L.C. Effect of steroid treatment of endometrial cells on blastocyst development during co-culture. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, n. 5, p. 1021-1030, 1998.

GOMES, W.R.; ERB, R.E. Progesterone in Bovine Reproduction: A Review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 48, n. 3, p. 314-330, 1965.

GORDON, I. **Controlled reproduction in cattle & buffaloes**. Dublin, 1996

HAQ, U.I. *et al.* Expression of interferon-stimulated gene ISG15 and ubiquitination enzymes is upregulated in peripheral blood monocyte during early pregnancy in dairy cattle. **Reproductive biology**, China. v. 16, n. 4, p.255-260, 2016.

HERZOG, K. *et al.* Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, Stoneham, v.73, n. 5, p. 691-697, 2010.

HONNENS, A. *et al.* Uterine blood flow during the first 3 weeks of pregnancy in dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, n.7, p.1048–1056, 2008.

HOPKINS, S.M.; Reproductive patterns of cattle. *In* DOOLEY, M.P; PINEDA, M.H. **Mc donald's, veterinary, endocrinology and reproduction**. 5 ed. USA. Iowa state press, cap. 12, p. 395, 2003.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia veterinária**. Rio de Janeiro, Elsevier, 2012, p. 115.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. **Falha Reprodutiva em Fêmeas**. *In*: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004, p. 261- 278.

KASTELIC, J. P.; PIERSON, R.A; GINTHER, O.J. Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v.34, n. 3, p. 487-498. 1990.

KIDDER, H. E *et al.* Fertilization rates and embryonic death rates in cows bred to bulls of different levels of fertility. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 37, n. 6, p. 691, 1954.

KIEBORZ-LOOS, K. R. *et al.* Oxytocin-induced secretion of prostaglandin F₂ α in postpartum beef cows: Effects of progesterone and estradiol-17 β treatment. **Journal of animal science**, v. 81, n. 7, p. 1830-1836, 2003.

KINDER, J.E. *et al.* Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v. 49, p. 393 – 407, 1995.

KUMAR, P. **Applied veterinary gynaecology and obstetrics**. India. International Book Distributing, 2009, p. 20.

LONERGAN, P.; Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, Stoneham, v.76, n. 9, p. 1594-1601, 2011.

MANN, G.E.; FRAY, M.D.; LAMMING, G.E. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferons production in the cow. **The veterinary journal**, v. 171, n. 3, p. 500-503, 2006.

MENEGHETTI, M. *et al.* Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, Stoneham, v. 72, n. 2, p. 179 -189, 2009.

MERLO, B.; IACONO, E.; MARI, G. Effect of progesterone and epidermal growth factor on *in vitro*-produced eight-cell bovine embryos in a serum-free culture medium. **Reproduction, fertility and development**, Clayton South, v. 19, p. 211, 2007.

PENTEADO, L. *et al.* Pregnancy rate of Nelore cows submitted to resynchronization starting 14 or 22 days after prior FTAI. **Animal reproduction**, Amsterdam, v.13, p. 235, 2016.

PINEDA, M.H.; Female reproductive system. *In* DOOLEY, M.P; PINEDA, M.H. **Mc donald's, veterinary, endocrinology and reproduction**. 5 ed. USA. Iowa state press, 2003, cap. 9, p. 314.

PUGLIESI, G. *et al.* Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. **Theriogenology**, Stoneham, v. 85, n. 7, p. 1239-1248, 2016.

PUGLIESI, G. *et al.* Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 41, p. 140-150, 2017.

RASBY, R.J. *et al.* Luteal function and estrus in peripubertal beef heifers treated with an intravaginal progesterone releasing device with or without a subsequent injection of estradiol. **Theriogenology**, Stoneham, v.50, p 55-63, 1998.

REGGIO, B.C.; LYNN, J.W.; GODKE, R.A. The effect of progesterone on the development of IVF-derived bovine embryos cultured in a semi-defined culture medium. **Theriogenology**, Stoneham, v.1, n. 47, p. 284, 1997.

RIBADU, A.Y.; WARD, W.R.; DOBSON, H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. **Vet record**, London, v.135, n. 19, p. 452-457, 1994.

RIZZONI, L.B. Perda embrionária precoce em bovinos. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, Garça, 2012.

SENGER, P. L. ; **Pathways to pregnancy and parturition**. 2 ed. Whashington: Current Conceptions, 2003, p. 285.

SILVA L.A.; GINTHER O.J. An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. **Biology of Reproduction**, Oxford, v.74, p. 337-343, 2006.

SILVA, F.M. *et al.* Estratégias para antecipação da puberdade em novilhas *Bos taurus indicus* pré-púberes. **Pubvet medicina veterinária e zootecnia**, v. 12, n.12, p. 1-13, 2018.

SPENCER, T.E. *et al.* Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. **Biology of reproduction**, Oxford, v.71, p.2-10, 2004.

SZATMÁRI, V.; SÓTONYI, P.; VÖRÖS, K. Normal duplex doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a review. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, Clemson, v. 42, n. 2, p. 93-107, 2001.

THATCHER, W.W. *et al.* Embryo health and mortality in sheep and cattle. **Journal of Animal Science**, v. 72, p.16-30, 1994.

VASCONCELOS, J.L.M.; GARCIA, P.H.M. Detecção de falha de ovulação permite re-sincronização rápida e aumento de vacas gestantes em 28 dias. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 20, p.292, 2006.

ZOLI, A.P. *et al.* Radioimmunoassay of a Bovine Pregnancy-Associated Glycoprotein in Serum: Its Application for Pregnancy Diagnosis. **Biology of Reproduction**, Oxford, v. 46, p. 83-92, 1992.

8 ARTIGO

Neste item será apresentado o artigo intitulado “Relação do fluxo sanguíneo luteal, concentração plasmática de progesterona, diâmetro de CL e taxa de prenhez em novilhas taurinas de corte”.

Relação do fluxo sanguíneo luteal, concentração plasmática de progesterona, diâmetro de corpo lúteo e taxa de prenhez em novilhas taurinas de corte

Gabriella dos Santos Velho¹, Monique Tomazele Rovani¹, André Gustavo Cabrera Dalto¹

Setor de Grandes Ruminantes – SGR

Resumo

O aumento das concentrações de progesterona (P4) no período pós-ovulatório estão associadas ao sucesso nas taxas de prenhez em bovinos de corte. O objetivo desse estudo foi determinar a correlação entre três métodos de avaliação de P4: fluxo sanguíneo luteal, diâmetro do corpo lúteo (CL) e concentração sanguínea no dia 5 após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Novilhas *Bos taurus* foram sincronizadas por meio de um protocolo de IATF, e inseminadas no dia 0 (D0). No dia 5 (D5) foi realizada a ultrassonografia Color-Doppler no ovário com CL, sendo utilizada uma escala de 0 – 3 de fluxo sanguíneo (0 = sem fluxo e 3 = muito fluxo). Além disso, foi medido o diâmetro do CL (mm) por ultrassonografia modo B e coletado sangue para mensuração de P4 sérica pelo método de eletroquimioluminescência. As variáveis contínuas e resíduos das análises paramétricas foram testados para normalidade através do teste Shapiro-Wilk. Foram utilizados testes de regressão, regressão logística binomial, curva *Receiver Operating Characteristic*, qui-quadrado e teste de comparação de médias seguido do teste T de Student para detectar as diferenças entre os grupos e foi considerada significância de 5% para as comparações estabelecidas. O diâmetro do CL (mm) demonstrou um efeito significativo ($p < 0,001$) sobre o fluxo sanguíneo e determinou um efeito linear positivo sobre a concentração plasmática de P4 ($p < 0,001$). Além disso, quando comparados fluxo sanguíneo e P4, verificou-se que vacas com fluxo de graus 1, 2 e 3 têm maior concentração de P4 sérica ($p < 0,001$) e o diâmetro do CL tem efeito sobre a taxa de prenhez ($p < 0,001$). Portanto, o tamanho do CL influenciou o fluxo sanguíneo luteal e a concentração de P4. Além disso, a escala de fluxo sanguíneo afetou P4 sérica, e o diâmetro do CL teve efeito sobre a taxa de prenhez.

Palavras-chave: Diâmetro do CL; fluxo sanguíneo; prenhez; progesterona; ultrassonografia Doppler.

Abstract

The increase in progesterone (P4) concentration in the postovulatory period is related to the success in pregnancy rate in beef cattle. The aim of this study was to determine the correlation between P4 assessment methods: luteal blood flow, corpus luteum diameter (CL), and blood concentration on day 5 following a fixed-artificial insemination (FTAI). *Bos taurus* heifers were synchronized and inseminated on day 0 (D0). On day 5 (D5) a Color-Doppler ultrasonography was performed on the ovarian with the CL, using a 0 to 3 blood flow scale (0= no flow and 3= high blood flow). In addition, the CL diameter was measured by mode B ultrasound and blood was collected for measurement of serum P4 by electrochemiluminescence method. The continuous variables and residuals of the parametric analyzes were tested for normality using Shapiro-Wilk test. Regression tests, binomial logistic regression, Receiver Operating Characteristic curve, chi-square and means comparison test followed by T student were used to detect differences between groups, and 5% significance was considered for the established comparisons. Diameter of CL showed a significant effect ($p < 0,001$) on blood flow and determined a positive linear effect on P4 serum concentration ($p < 0,001$). In addition, when blood flow and P4 were compared, it was observed that cows with blood flow grades 1, 2 and 3 had higher serum P4 concentration ($p < 0,001$), and CL diameter had an effect on pregnancy rate ($p < 0,001$). Therefore, CL size influenced luteal blood flow and P4 concentration. In addition, blood flow grade affected P4 concentration, and CL diameter had an effect on pregnancy rate.

Keywords: CL diameter, blood flow, pregnancy, progesterone, Doppler ultrasound.

Introdução

Um dos fatores limitantes para aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho, em bovinos de corte, é a prenhez por inseminação artificial (IA). A taxa de prenhez obtida em programas de IA geralmente varia de 40 a 55% em vacas *Bos indicus*, o que indica que uma grande proporção de vacas inseminadas não concebe (MENEGETTI *et al.*, 2009). Entretanto, as taxas de fertilização são elevadas (85-90%) (BEARDEN, HANSEL E BRATTON, 1956; KIDDER *et al.*, 1954), o que mostra que as perdas embrionárias são responsáveis pela maioria das falhas na concepção e ocorrem principalmente entre os dias 8 e 16 após a IA (DISKIN; SREENAN, 1980; RIZZONI, 2012; JAINUDEN, HAFEZ, 2004). Essas perdas embrionárias podem estar relacionadas à baixa concentração de progesterona (P4) no período pós-ovulatório, pois esse hormônio tem grande influência no desenvolvimento embrionário e na produção de interferon-tau (IFNT) (MANN; FRAY; LAMMING, 2006). Assim, a suplementação de P4 pode ser realizada logo após a IA para obtenção de conceitos maiores no dia 14, visto que esse hormônio indica um papel importante desse na regulação materna com o conceito e o desenvolvimento inicial da prenhez em bovinos (GARRET *et al.*, 1998).

Existem vários métodos para avaliação da P4 em vacas cíclicas. A análise da concentração de P4 no plasma sanguíneo é padrão ouro para avaliação da função luteal, e sua concentração excede 1,0 ng/mL na presença de corpo lúteo (CL) funcional (BICALHO *et al.*, 2008). No entanto, o diagnóstico baseado nesse tipo de exame tem como desvantagem o intervalo entre a coleta do sangue e a disponibilidade do resultado ser longo e, além disso, o custo ser relativamente elevado (HERZOG *et al.*, 2010). Em condições de campo, o CL é determinado por palpação retal, a qual tem uma baixa sensibilidade e alta especificidade (BICALHO *et al.*, 2008). Portanto, mesmo com veterinários experientes, a sensibilidade para a palpação do CL não é superior a 85% (RIBADU; WARD; DOBSON, 1994).

Com o avanço da tecnologia, o uso da ultrassonografia na reprodução facilitou alguns diagnósticos. A ultrassonografia no modo B permite avaliar o tamanho do CL, embora não seja possível avaliar sua funcionalidade. Apesar de haver uma alta correlação entre o diâmetro do CL e a concentração de P4, o CL reduz seu tamanho mais lentamente que a P4 circulante durante a regressão luteal (RIBADU; WARD; DOBSON, 1994). Os níveis de P4 dependem da vascularização do CL, que pode ser quantificado através da ultrassonografia no modo Doppler, a qual mostra de forma mais confiável o nível do fluxo sanguíneo no CL (ACOSTA *et al.*, 2002). O objetivo deste estudo foi correlacionar as diferentes formas de avaliação do

CL (P4 sérica, diâmetro do CL e vascularização em tempo real) em novilhas taurinas de corte no dia 5 após a IA com a taxa de prenhez aos 34 dias.

Material e Métodos

Animais

O estudo foi realizado em uma propriedade de bovinos de corte localizada no município de Charqueadas, Rio Grande do Sul. A fazenda contém 2800 hectares, sendo que 1750 são destinados à produção de bovinos de corte. Os animais são criados à pasto, de forma extensiva, em campo nativo e a fazenda é composta principalmente de animais da raça Aberdeen Angus. Foram utilizadas 89 novilhas taurinas, as quais foram selecionadas previamente ao início do protocolo de IATF pelo ECC (Escore de Condição Corporal) e peso (Kg). As novilhas selecionadas tiveram peso médio de $357,85 \text{ kg} \pm 25,4$, ECC médio $2,95 \pm 0,3$ (escala 1 a 5).

Delineamento experimental

Após a seleção dos animais, foi aplicado 2 mg (i.m.) de benzoato de estradiol (Sincroben[®], Bimeda) e inserido um dispositivo intravaginal de P4 de 1,25 g (Biprogest[®], Bimeda) no Dia -10 em relação à IATF (D-10). Retirou-se o dispositivo no D-2, e foi aplicado 0,526 mg (i.m.) de cloprostenol sódio (Clocio[®], Bimeda). No D-10 aplicou-se 1 mg (i.m.) de benzoato de estradiol (Sincroben[®], Bimeda) e no Dia 0 (D0) foi realizada a IATF. Cinco dias após a IATF (D5), avaliou-se o fluxo sanguíneo com o auxílio de Color Doppler e foi coletado sangue da veia coccígea caudal para análise sérica de P4. No D34, realizou-se o diagnóstico de gestação (DG) através de ultrassonografia (Figura 1). Além disso, as novilhas foram marcadas na linha média da região dorsal do sacro com bastão marcador (WALMUR[®]) para auxiliar na verificação da manifestação de estro.

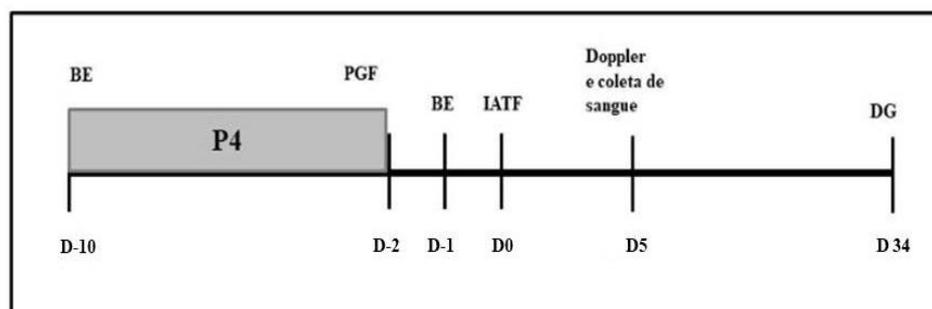


Figura 1 – Protocolo de IATF e delineamento do experimento.

Amostras de sangue

Cinco dias após a realização da IATF (D5), foi realizada a coleta de sangue da veia coccígea caudal em tubo vacutainer com ativador de coágulo e agulha 25 x 0,70 mm (Vacuplast[®]). As amostras de sangue foram processadas em laboratório para separação do soro, centrifugadas à 1600 x g por 10 minutos. O soro foi colocado em microtubos de 1,5 mL e congeladas a -18 °C para mensurar a concentração de P4 pelo método de eletroquimioluminescência em laboratório comercial (Elecsys Progesterone II kit; Roche, Brazil).

Ultrassonografia

No dia 5 (D5) após a IATF, foi realizada a ultrassonografia via transretal modo Color-Doppler no ovário contendo CL para mensurar o fluxo sanguíneo, e o diâmetro do CL foi avaliado através de ultrassonografia pelo modo B. Considerou-se uma escala de 0 – 3 de fluxo sanguíneo, adaptada de Pugliesi *et al.* (2017), em que 0 = sem fluxo; 1 = pouco fluxo; 2 = moderado fluxo; 3 = muito fluxo (Figura 2). O diagnóstico de gestação foi realizado 34 dias após a IATF por ultrassonografia modo B. Os exames ultrassonográficos foram realizados através do aparelho de ultrassom KAIXIN DCU 12VET[®], com frequência de 6,5 MHz.

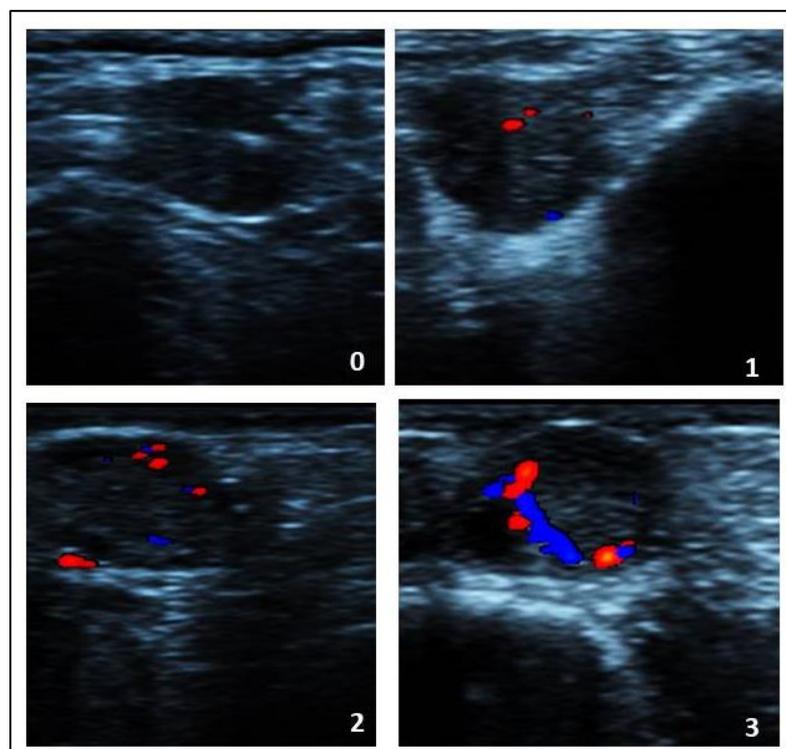


Figura 2 – Variação do fluxo sanguíneo no corpo lúteo dia 5 após a IATF. Baseado em Pugliesi *et al.* (2017).

Análise estatística

Todos os dados foram anotados em planilha de campo e posteriormente tabulados em planilhas eletrônicas no programa *Microsoft Excel*[®]. Posteriormente, as variáveis contínuas e resíduos das análises paramétricas foram testados para normalidade através do teste Shapiro-Wilk.

O efeito do fluxo sanguíneo, concentração de progesterona e diâmetro do CL sobre a prenhez foi realizada por regressão logística binomial. Após identificado efeito, a variável foi testada isoladamente pelo mesmo teste. Para as variáveis independentes que foi observado efeito sobre a prenhez, utilizou-se a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para determinar o ponto de corte (quando sensibilidade igual à especificidade) em que a variável determina uma maior taxa de prenhez. A área sob a curva (AUC) foi obtida objetivando avaliar a acurácia do teste, sendo classificada em baixa (0,51-0,61), média (0,62-0,81) e alta (0,82-0,99). Com base no resultado da análise ROC, as variáveis independentes foram transformadas em classes (abaixo ou acima do ponto de corte) e foi confirmado o efeito na taxa de prenhez por qui-quadrado.

O efeito do diâmetro do CL sobre a concentração de P4 foi analisado por análise de regressão, sendo testados os efeitos linear, quadrático e cúbico. Utilizou-se regressão ordinal logística para avaliar o efeito do tamanho do CL e concentração de P4 no fluxo sanguíneo e o efeito do fluxo sobre a P4. Utilizou-se a curva ROC para determinar o tamanho de CL e concentração de P4 que causa um aumento na escala de fluxo sanguíneo do CL. As médias de tamanho de CL e concentração de P4 em cada classe de fluxo sanguíneo foram comparadas pelo Teste F-Snedecor seguido do teste T de *Student* para detectar as diferenças entre os grupos. As análises foram realizadas com o software estatístico *JMP* v. 8.0.2[®] (*SAS Institute Inc., Cary, USA*) e considerado um nível mínimo de significância de 5% para as comparações estabelecidas.

Resultados

Observou-se um efeito altamente significativo do tamanho do CL sobre o fluxo sanguíneo ($p < 0,001$). Além disso, com base na análise ROC, animais com fluxo de grau 2 ou 3 apresentam tamanho de CL superior ($p < 0,001$). As médias de tamanho do CL nos graus 2 e 3 de fluxo sanguíneo é maior quando comparadas aos graus de fluxo 0 e 1 ($p < 0,001$; Figura 3).

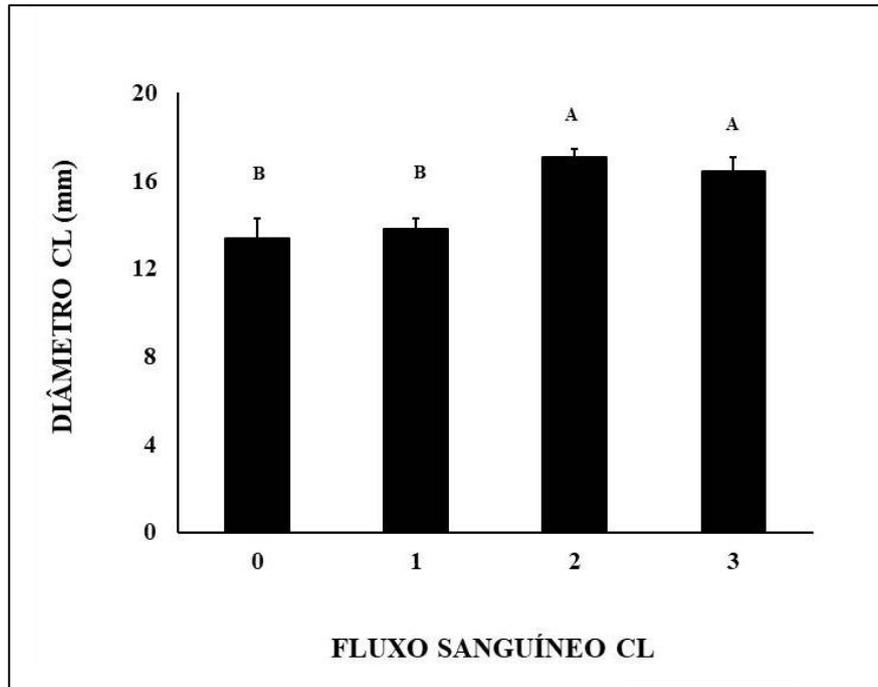


Figura 3 - Diâmetro do corpo lúteo do corpo lúteo (CL) distribuído nos diferentes graus de fluxo sanguíneo avaliado por Color-Doppler. Letras distintas indicam $p < 0,001$.

O diâmetro do CL (mm) determina um efeito linear positivo sobre a concentração plasmática de P4 ($p < 0,001$; Figura 4).

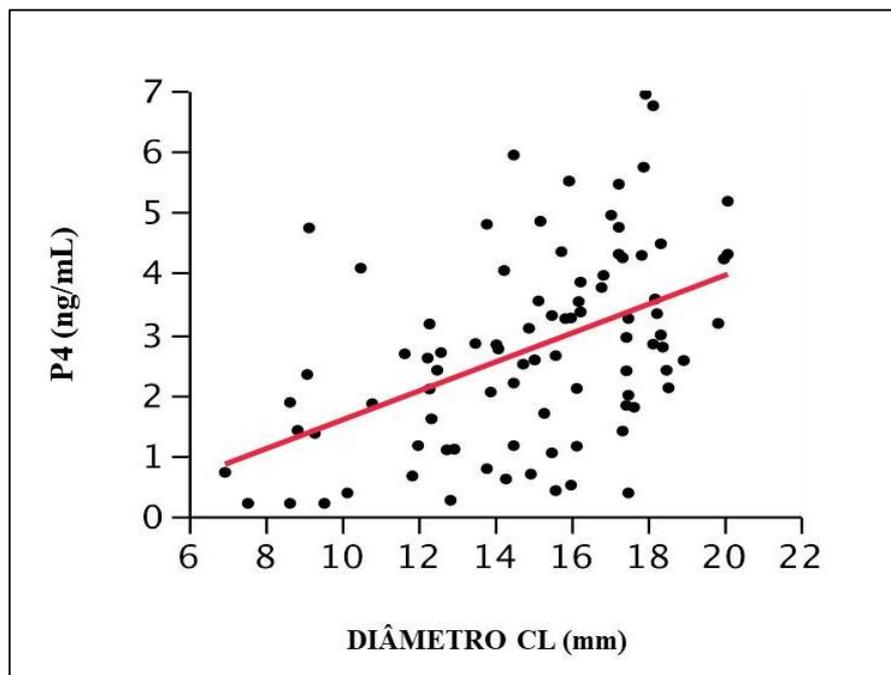


Figura 4 - Efeito do diâmetro do corpo lúteo (CL em mm) do corpo lúteo (CL em mm) sobre a concentração plasmática de P4 ($p < 0,001$).

Quando comparados fluxo sanguíneo e P4, observou-se que vacas com fluxo de graus 1, 2 e 3 têm maior concentração de P4 sérica ($p=0,001$; Figura 5).

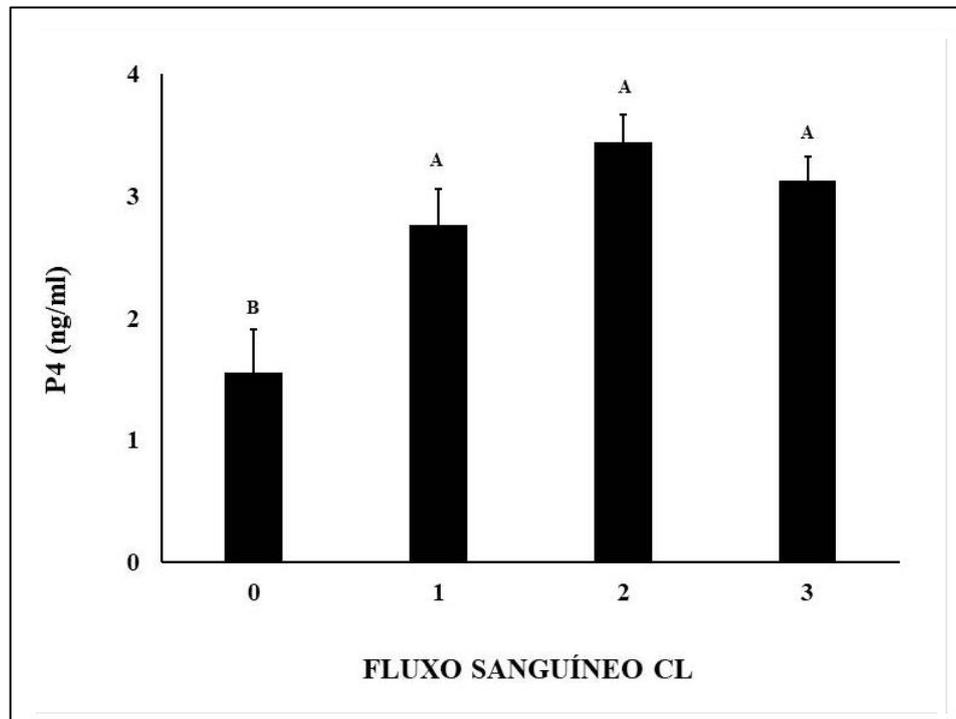


Figura 5 - Concentração de progesterona sérica (P4) de acordo com os diferentes graus de fluxo sanguíneo no corpo lúteo (CL). Letras distintas indicam $p<0,001$.

A escala de fluxo sanguíneo e P4 não teve efeito sobre a taxa de prenhez. No entanto, o diâmetro do CL tem efeito sobre a taxa de prenhez ($p<0,001$). A análise de ROC determinou um ponto de corte de 14,95 mm (AUC de 0,62) no diâmetro do CL para uma maior taxa de prenhez. Além disso, quando os animais foram estratificados de acordo com o diâmetro do CL (menor ou igual a 14,95 mm ou superior), observou-se que vacas com CL maior que 14,95 mm tiveram uma maior taxa de prenhez ($p<0,05$; Figura 6).

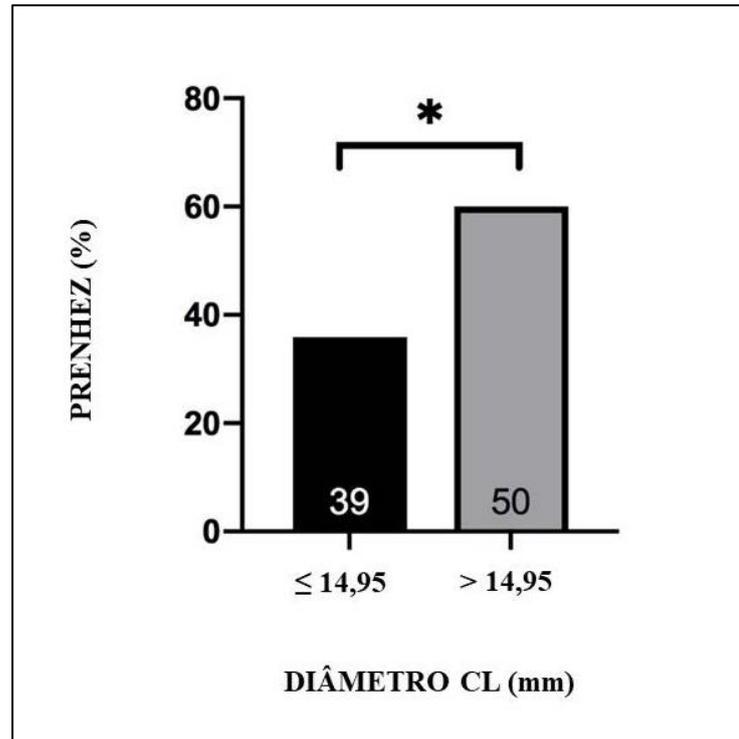


Figura 6 - Efeito do tamanho do corpo lúteo (CL) na taxa de prenhez (n = 89). Número nas barras indicam o “n” em cada categoria (< ou > que 14,95 mm). * indica $p < 0,05$.

Discussão

Neste estudo, observou-se que diâmetro do CL teve um efeito linear positivo sobre a concentração plasmática de P4 ($p < 0,001$; Figura 4). Esse resultado também foi encontrado em vacas durante o ciclo estral, tendo alta correlação entre o diâmetro do CL e a concentração plasmática de P4 (RIBADU; WARD; DOBSON, 1994). Em outro estudo, resultados similares também foram encontrados em vacas e novilhas *Bos taurus* receptoras de embrião. Observou-se uma correlação positiva entre o diâmetro do CL, volume de tecido luteal e concentração de P4 (SPELL *et al.*, 2001). No entanto, quando estudaram a dinâmica folicular e o crescimento do CL em vacas leiteiras 90 dias pós-parto não encontraram diferenças no diâmetro do CL entre vacas prenhes e não prenhes. Além disso, não houve diferença na concentração plasmática de P4 dessas vacas (TAYLOR; RAJAMAHENDRAN, 1991). Esse resultado difere do encontrado em nosso estudo, em que as novilhas com diâmetro maior também tiveram maior concentração de P4 e maior taxa de prenhez. Essas diferenças podem estar relacionadas ao dia da avaliação do CL. Em nosso estudo o CL foi avaliado no dia 5 após a

IATF e no estudo de Taylor e Rajamahendran (1991) foi avaliado 90 dias após o parto. Além disso, há uma diferença nas categorias avaliadas (novilhas de corte e vacas de leite).

Foi observado que o tamanho do CL em relação aos fluxos sanguíneos de graus 2 e 3 foram maiores que CLs com fluxo 0 ou 1 ($p < 0,001$; Figura 3). Esse resultado também foi encontrado em vacas cíclicas quando analisaram o tamanho e o fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório e do CL. Folículos pré-ovulatórios menores e menos vascularizados resultaram em um CL menor e menos funcional. No entanto, a injeção de uma P4 de longa ação no dia 4 após a IA atenuou os efeitos negativos causados por um folículo pré-ovulatório pequeno, que consequentemente tem um CL menor. Além disso, a prenhez por IA foi menor nessas vacas com folículos pequenos, porém, se suplementados com P4, poderiam melhorar a fertilidade (PUGLIESI *et al.*, 2016). Em nosso estudo, novilhas com diâmetro de CL maior no dia 5 após a IATF também tiveram maior taxa de prenhez, o que pode sugerir que novilhas com CL de menor diâmetro se fossem suplementadas com P4, poderiam ter uma maior chance de conceber. No entanto, são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese.

Em búfalas *Bubalus bubalis*, foi determinada a taxa de prenhez e os fatores que afetam o sucesso da transferência de embriões (TE). O CL era palpado via transretal antes da TE e classificado em pequeno (≤ 5 mm), médio (6 a 10 mm) e grande (>10 mm). Observou-se uma tendência do aumento da taxa de prenhez com o incremento do tamanho do CL das receptoras. Receptoras com CL pequeno, médio e grande apresentaram 15,8% (3/19), 25% (7/28) e (14/44) 31,8% de taxa de prenhez, respectivamente (MISRA *et al.*, 1999). Apesar dos resultados similares ao nosso estudo, em que novilhas com diâmetro de CL maior ($>14,95$ mm) também tem maior taxa de prenhez, as búfalas foram avaliadas sem o auxílio de ultrassom.

Nos programas de TE, a presença e a qualidade do CL em receptoras é um dos fatores importantes para o sucesso nas taxas de prenhez. O CL da receptora geralmente é avaliado por palpação retal ou ultrassonografia modo B, para determinação do seu tamanho. Entretanto, com a ultrassonografia modo B não é possível avaliar a funcionalidade do CL, a qual é importante nestes programas, visto que está relacionada com a secreção de P4 (PUGLIESI *et al.*, 2017). A partir disso, programas de TE podem avaliar receptoras com ultrassonografia Doppler e estimar a funcionalidade do CL. Nesse sentido, um estudo foi realizado em novilhas e vacas *Bos indicus* após 11 dias da IA, sendo identificados área e vascularização do CL através de ultrassonografia (PINAFFI *et al.*, 2015). Os animais foram alocados em dois grupos no momento da TE de acordo com a porcentagem de vascularização do CL: baixa vascularização ($\leq 40\%$) e alta vascularização ($>40\%$). No grupo de baixa vascularização

(n=12) nenhuma receptora foi diagnosticada como gestante, mas o diâmetro do CL não diferiu entre os grupos (alta e baixa vascularização). Esse resultado difere dos achados em nosso estudo, em que as novilhas (n=50/89) que apresentaram CL maior que 14,95 mm de diâmetro tiveram uma alta acurácia em prever a taxa de prenhez ($p<0,05$). Essas discrepâncias nos resultados podem estar relacionadas tanto pelo número de animais incluídos nos experimentos quanto pela eficiência das técnicas utilizadas (TE vs IA). Além disso, a avaliação do nosso estudo foi no dia 5 após a IATF e foram analisadas somente novilhas *Bos taurus*, ao contrário do estudo de Pinaffi *et al.* (2015), que avaliou novilhas e vacas 11 dias após a IA.

Recentemente, foi estudado o impacto da perfusão sanguínea do CL avaliado por ultrassonografia Color-Doppler no momento da TE em bovinos. Utilizaram receptoras (n=329) com ciclo estral sincronizado, as quais foram distribuídas em grupos conforme o tamanho do CL: pequeno ($<3\text{cm}^2$) ou grande ($>3\text{cm}^2$). Foram também categorizadas de acordo com a perfusão luteal: baixa ($<40\%$), média (45-50%) e alta ($>50\%$). Nesse estudo somente a perfusão sanguínea do CL refletiu no aumento da taxa de prenhez, em que vacas com baixa, média e alta perfusão tiveram 45%, 55,9% e 62,3% de prenhez, respectivamente (PUGLIESI *et al.*, 2016b). No nosso estudo, o diâmetro do CL, mas não a perfusão sanguínea, teve correlação positiva com a taxa de prenhez, permitindo prever prenhez com base no diâmetro do CL.

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o tamanho do CL influencia o fluxo sanguíneo luteal e a concentração de P4. Além disso, a escala de fluxo sanguíneo afeta P4 sérica, e o diâmetro do CL tem efeito sobre a taxa de prenhez. Este estudo pode servir de base para o uso da suplementação de P4 após a IA em bovinos, visto que quanto maior concentração plasmática de P4, maior o crescimento do conceito no início do desenvolvimento embrionário. A avaliação do CL no momento transferência de embriões, assim como usado em equinos, poderá ser um instrumento na seleção de receptoras. Da mesma forma, a ultrassonografia modo Doppler pode ser utilizada nesse momento para avaliar a funcionalidade do CL e, dessa forma, selecionar a receptora com perfil sérico de progesterona adequado e com ambiente uterino propício para a sobrevivência do embrião.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J. *et al.* A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F2a injection in the cow. **Biology of reproduction**, Oxford, v. 66, n. 3, p.651-658, 2002.
- BEARDEN, H; HANSEL, W; BRATTON, R. Fertilization and embryonic mortality rates for bulls and histories of either low or high fertility in artificial breeding. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 39, n. 3, p.312, 1956.
- BICALHO, R.C. *et al.* Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v.70, n. 2, p. 199-207, 2008.
- DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Society for Reproduction and Fertility**, Teddington, v. 59, n. 2, p. 463-468, 1980.
- FERREIRA, J.C; MEIRA, C. Aplicação da ultrassonografia colorida doppler em programas de transferência de embriões equinos. **Ciência rural**, Santa Maria. V.41, n.6, p.1063-1069, 2011.
- GARRET, J.E. *et al.* Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **Journals of Reproduction & Fertility**, Tehran, v. 84, n .2, p. 437-446, 1988.
- HERZOG, K. *et al.* Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, Stoneham, v.73, n. 5,p. 691-697, 2010.
- JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. **Falha Reprodutiva em Fêmeas. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal.** 7. ed. Barueri: Manole, 2004, p. 261- 278.
- JANSON, P. O.; DAMBER, J.-E.; AXEN, C. Luteal blood flow and progesterone secretion in pseudopregnant rabbits. **Society for Reproduction and Fertility**, Teddington, v. 63, n. 2, p. 491-497, 1981.
- KASTELIC, J. P.; PIERSON, R.A; GINTHER, O.J. Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v.34, n. 3, p. 487-498. 1990.
- KIDDER, H. E *et al.* Fertilization rates and embryonic death rates in cows bred to bulls of different levels of fertility. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 37, n. 6, p. 691, 1954.
- MANN, G.E.; FRAY, M.D.; LAMMING, G.E. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferons production in the cow. **The veterinary journal**, v. 171, n. 3, p. 500-503, 2006.
- MENEGHETTI, M. *et al.* Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, Stoneham, v. 72, p. 179 -189, 2009.

MISRA, A. K. *et al.* Factors affecting pregnancy rate following nonsurgical embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*): A retrospective study. **Theriogenology**, Stoneham, v.52, p.1–10, 1999.

PINAFFI, F.L.V *et al.* Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 470-476, 2015.

PUGLIESI, G. *et al.* Use of Color-Doppler ultrasonography to improve selection of higher fertility beef recipient cows for embryo transfer. **Animal Reproduction**, v.13, p.454, 2016b.

PUGLIESI, G. *et al.* Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 41, p. 140-150, 2017.

RIBADU, A.Y.; WARD, W.R.; DOBSON, H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. **Vet record**, London, v. 135, n.19, p. 452-457, 1994.

RIBADU, A.Y.; WARD, W.R.; DOBSON, H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. **Vet record**, London, v.135, n. 19, p. 452-457, 1994.

RIZZONI, L.B. Perda embrionária precoce em bovinos. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, Garça, 2012.

SPELL, A.R. *et al.* Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v.56, 287–297, 2001.

TAYLOR, C.; RAJAMAHENDRAN, R. Follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus nonpregnant dairy cows. **Journal of dairy science**, Champaign, v. 74, n. 1, p. 115-123, 1991.