

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

VAGNER SARMENTO ARÊAS

**USO DE DOPPLER COLORIDO NA AVALIAÇÃO
FUNCIONAL DO CORPO LÚTEO EM BOVINOS**

ALEGRE – ES

2012

VAGNER SARMENTO ARÊAS

**USO DO DOPPLER COLORIDO PARA AVALIAÇÃO
FUNCIONAL DO CORPO LÚTEO EM BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de **Mestre em Ciências Veterinárias**, linha de pesquisa em Reprodução e Nutrição Animal.

Orientador: Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana.

ALEGRE – ES

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Arêas, Vagner Sarmento, 1986-
A678u Uso de doppler colorido na avaliação funcional do corpo lúteo em
bovinos / Vagner Sarmento Arêas. – 2012.
78 f. : il.

Orientador: João Henrique Moreira Viana.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Bovino. 2. Corpo lúteo. 3. Progesterona. 4. Doppler, ultrassonografia
colorida. I. Viana, João Henrique Moreira. II. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 619

VAGNER SARMENTO ARÊAS

Uso do Doppler colorido na avaliação funcional do corpo lúteo em bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Reprodução e Nutrição Animal.

Aprovada em (09/07/2012).

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof^a. Dr^a. Jeanne Broch Siqueira
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Miller Pereira Palhão
Universidade José Rosário Vellano

Aos meus pais, Reinaldo e Christina, e minha irmã, Manuela, pelo exemplo, apoio incondicional, carinho, zelo e muito amor que me deram por toda a minha vida.
Aos meus avós, Carlinho e Carlota, e João (in memoriam) e Zenith por sempre estarem presentes em minha vida.
À Verônica pelo companheirismo, pelo ouvido sempre disposto, pelas palavras de amor e de incentivo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar por me dar condições de cumprir meus objetivos.

Ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de realizar o Programa de Pós-Graduação e à CAPES pela bolsa de estudos.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (EMBRAPA Gado de Leite), por fornecer toda estrutura necessária para realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana, por ter aceitado me orientar e pelo profissionalismo com que executou o papel de orientador, contribuindo de forma imprescindível para a qualidade final desta dissertação.

Às professoras Dra Jeanne Broch Siqueira e Carla Braga Martins e aos Drs. Miller Pereira Palhão e Luiz Sérgio de Almeida Camargo, por participarem da banca examinadora e contribuírem com a qualidade final deste trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação pela dedicação e ensino. À Madalena e Alessandra pela ajuda com toda a burocracia do mestrado.

Ao pesquisador da EMBRAPA Luiz Gustavo Bruno Siqueira pela execução do experimento. Ao técnico Gilmar (Del), o doutorando Eduardo, o mestrando Alberto e a bolsista de apoio técnico Eliza pela disposição, disponibilidade e pela ajuda para a execução do experimento.

A todos os estagiários da Embrapa Gado de Leite, em especial o “Chantis”, “Paulete”, “Jabá” e “Cirrose” que dividiram comigo momentos de muito trabalho, diversão e alegrias, que com certeza se tornaram grandes amigos.

Ao meu amigo de faculdade Kelvinson, por me ajudar muito na aquisição dos artigos científicos.

Aos animais que participaram deste estudo, que são moldes para desenvolvimento científico para um bem maior.

Aos meus amigos e a todos que, em algum momento e de alguma forma, tenham contribuído com esta empreitada, seja na torcida ou nas orações.

Muito obrigado a todos.

“Trabalhe, estude e ame como se estivesse brincando. Procure, lembre dos pontos divertidos do seu trabalho, estudo e relacionamento. Sobreponha os pontos positivos dos negativos. Mas lembre-se também que seu trabalho, estudo e relacionamento não são brincadeiras, dessas casuais, então trate-os com seriedade e responsabilidade. Exerça o paradoxo: Suave e Firme! ”

Robson Feitosa

RESUMO

Objetivou-se avaliar o padrão vascular luteal entre o 12^o e 20^o dias pós-inseminação em bovinos e determinar a confiabilidade do uso de Doppler colorido para prever animais não-gestantes 20 dias após a Inseminação artificial em tempo fixo (IATF), utilizando como único parâmetro a avaliação visual do fluxo sanguíneo no corpo lúteo (FSCL). Foram utilizadas vacas e novilhas mestiças de Holandês x Gir, submetidas a protocolo de IATF, em duas repetições. No primeiro estudo, os animais (n=115) foram monitorados no período de 12 a 20 dias após a primeira IATF, e o corpo lúteo (CL) avaliado a cada 48h utilizando-se um equipamento portátil de ultrasonografia equipado com a função Doppler colorido (MyLab30, Esaote, Italia) e probe linear retal de 7,5 MHz. Foi calculada a área total do CL (ACL), área da cavidade luteal (CCL), área de tecido luteal (ATL, ACL menos área da CCL, se presentes), área do sinal Doppler (AV) e proporção entre AV e ATL (PV). No D30, os animais foram submetidos ao diagnóstico de gestação. A atividade luteal foi monitorada pela determinação da concentração plasmática de progesterona (CPP) no sangue, coletado em todos os dias em que ocorriam os exames ultrassonográficos. Os valores de ACL, CCL, ATL, AV, PV e CPP entre o D12 e D20 foram comparados entre animais posteriormente classificados como gestantes ou não gestantes. Não houve efeito de dia nas variáveis ACL, CCL, ATL, AV, PV e CPP de animais posteriormente diagnosticados como gestantes ($P > 0,05$). Nos animais não gestantes, houve redução ($P < 0,01$) nos parâmetros luteais até o D20. Apesar das medidas realizadas com Doppler colorido (AV e PV) apresentarem elevados CVs (>50%), elas apresentaram diferenças significativas entre animais gestantes e não gestantes mais cedo em relação à ATL (diferenças a partir de D18), a CPP (D18) e ACL (D20). No experimento 2, foram consideradas as avaliações (n=208) realizadas nos animais nas duas baterias de IATF 20 dias após a inseminação (D20). Os animais tiveram o fluxo sanguíneo luteal avaliado por ultrasonografia Doppler, conforme descrito no primeiro experimento. Com base unicamente na avaliação visual e subjetiva do FSCL, os animais foram classificados como 'gestantes' ou 'não gestantes'. No D30, o mesmo operador realizou o diagnóstico de gestação (DG) final. O DG final foi comparado retrospectivamente com o diagnóstico baseado no FSCL e o resultado de cada animal classificado como 'correto' ou

'incorreto'. O número de verdadeiro-positivos (VP), verdadeiro-negativos (VN), falso-positivos (FP) e falso-negativos (FN) foram inseridos em uma tabela de contingência 2x2. A sensibilidade (SEN), especificidade (ESP), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia/confiabilidade (ACC) do diagnóstico por FSCL foram calculados com as seguintes equações: $SEN=VP/(VP+FN)$; $ESP=VN/(FP+VN)$; $VPP=VP/(VP+FP)$; $VPN=VN/(FN+VN)$; e $ACC=(VP+VN)/n$ total. Variáveis binomiais (taxa de gestação e proporções) foram analisadas pelo teste qui-quadrado. Os parâmetros de desempenho do diagnóstico baseado no FSCL foram: SEN=97,1%; ESP=51,9%; VPP=66,9%; VPN=94,7%; e ACC=74,5%. A proporção de FP foi 24,0% (50/208) e a de FN foi 1,4% (3/208). Conclui-se que o uso do Doppler colorido pode resultar em diagnósticos mais precoces e mais acurados de alterações da função luteal no período de reconhecimento materno da gestação e que a avaliação visual do FSCL 20 dias após a IATF pode ser utilizada na identificação de animais não-gestantes para re-sincronização.

Palavras-chave: Função luteal. progesterona. diagnóstico de gestação precoce. especificidade. valor preditivo negativo. bovinos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the luteal vascular pattern between days 12 and 20 post insemination, and to establish the accuracy of the use of color Doppler in predicting non-pregnancy 20 days after fixed time artificial insemination (FTAI), using as a single parameter the visual evaluation of corpus luteum blood flow (CLBF). Crossbred Holstein x Gyr cows and heifers, undergoing two FTAI protocols, were used. In the first study, animals (n=115) were monitored between days 12 and 20 after the first FTAI, and corpora lutea (CL) evaluated every 48h using a portable ultrasound device equipped with color Doppler function (MyLab30, Esaote, Italy) and a 7.5 MHz linear rectal probe. The total CL area (TCLA), luteal cavity area (LCA), luteal tissue area (LTA, TCLA minus LCA, if present), Doppler signal area (DSA) and proportion DSA:LTA (PDL). Pregnancy diagnosis was performed on Day 30 (D30),

Luteal activity was monitored by plasma progesterone concentration (PPC) in samples collected in the same days of the ultrasound exams. The values of TCLA, LCA, LTA, DSA and PDL from D12 to D20 were compared between animals later diagnosed as pregnant or non-pregnant. There was no day effect on TCLA, LCA, LTA, DSA or PDL in animals later diagnosed as pregnant ($P>0.05$). In non-pregnant animals, there was a reduction ($P<0.01$) in all luteal parameters up to D20. Despite of the high VCs of Doppler measures (DSA and PDL), differences between pregnant and non-pregnant animals were detected earlier than in LTA (from D18), the PPC (D18) and CLA (D20). In the second experiment, evaluations ($n=208$) were performed in the animals in the two sessions of FTAI, on Day 20 (D20) after insemination. Luteal blood flow was evaluated using color Doppler ultrasonography, as previously described. Considering only the visual and subjective evaluation of CLBF the animals were classified as 'pregnant' or 'non pregnant'. Pregnancy diagnose was performed on D30, by the same technician, and retrospectively compared to the presumptive diagnose based in CLBF and result classified as correct or incorrect. The number of true-positive (TP), true-negative (TN), false positive (FP) and false-negative (FN) were compared in a contingency table 2x2. The sensibility (SEN), specificity (SPEC), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy (ACC) in the diagnose by CLBF were calculated as follows: $SEN=TP/(TP+FN)$; $ESP=TN/(FP+TN)$; $PPV=TP/(TP+FP)$; $NPV=TN/(FN+TN)$; and $ACC=(TP+TN)/n$. Pregnancy rate and proportions were analyzed by Chi-square. Overall performance of the presumptive diagnose based on CLBF was: $SEN=97.1\%$; $SPEC=51.9\%$; $PPV=66.9\%$; $PNV=94.7\%$; and $ACC=74.5\%$. The proportion of FP was 24.0% (50/208) and of FN 1.4% (3/208). In conclusion, the use of color Doppler provides earlier and more accurate diagnostics of luteal function in the pregnancy recognition period; and the visual evaluation of CLBF 20 days after FTAI can be used to identify and select non-pregnant animals for resynchronization.

Keywords: Luteal function, progesterone, early pregnancy diagnosis, specificity, negative predictive value. cattle.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1 – *Figura 2 – Protocolo de IATF utilizado.....* 34
- Figura 2 – *Determinação da área da seção transversal (cm²) do CL por meio de dispositivo (linha pontilhada) do próprio aparelho (seta amarela).....* 35
- Figura 3 – *Mensuração para cálculo da AV, realizada por dispositivo (contorno amarelo – seta vermelha) do programa ImageJ.....* 36

Capítulo 2

- Figura 1 – *Figura 2 – Protocolo de IATF utilizado.....* 54
- Figura 2 – *Imagens do CL no modo Doppler, com visualização de grandes áreas de fluxo sanguíneo (áreas coloridas) e classificação de gestante.....* 55
- Figura 3 – *Imagens do CL no modo Doppler, com visualização de pequenas áreas de fluxo sanguíneo (áreas coloridas) e classificação de não gestante.....* 56

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1 – *Área total do corpo lúteo em animais posteriormente diagnosticados como gestantes ou não gestantes.....* 38
- Tabela 2 – *Área da cavidade luteal em animais posteriormente diagnosticados como gestantes ou não gestantes.....* 38
- Tabela 3 – *Área de tecido luteal (área do CL menos área da cavidade) em animais posteriormente diagnosticados como gestantes ou não gestantes.....* 38
- Tabela 4 – *Área do sinal Doppler no corpo lúteo (cm²) em animais posteriormente diagnosticados como gestantes ou não gestantes...* 39
- Tabela 5 – *Proporção entre área do sinal doppler e área de tecido luteal (%) em animais posteriormente diagnosticados como gestantes ou não gestantes.....* 39
- Tabela 6 – *Produção de progesterona em animais posteriormente diagnosticados como gestantes ou não gestantes.....* 39

Capítulo 2

- Tabela 1 – *Tabela de contingência Predição da Gestação (Dia 20) vs. Diagnóstico real da gestação (Dia 30).....* 57
- Tabela 2 – *Parâmetros de desempenho do diagnóstico baseado no FSCL.....* 58

LISTA DE SIGLAS e/ou ABREVIATURAS

IA –	Inseminação artificial
IATF –	Inseminação artificial em tempo fixo
PGF2 α –	Prostaglandina F2 α
CL –	Corpo lúteo
P4 –	Progesterona
GnRH –	Hormônio liberador de gonadotrofina
E2 –	Estrógeno
BE –	Benzoato de estradiol
LH –	Hormônio luteinizante
GH –	Hormônio do crescimento
IM	Intramuscular
ACL –	Área total do CL
CCL –	Área da cavidade luteal
ATL –	Área do tecido luteal
AV –	Área do sinal Doppler
PV –	Proporção entre AV e ATL
CPP –	Concentração plasmática de P4
EPM –	Erro padrão médio
ng/mL –	Nanograma por mililitro
FSCL –	Fluxo sanguíneo no CL
DG –	Diagnóstico de gestação
VP –	Verdadeiro positivo
VN –	Verdadeiro negativo
FP –	Falso positivo
FN –	Falso negativo
SEN –	Sensibilidade
ESP –	Especificidade
VPP –	Valor preditivo positivo
VPN –	Valor preditivo negativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO.....	16
2.2	LUTEOGÊNESE E FUNÇÃO DO CORPO LÚTEO.....	19
2.3	LUTEÓLISE.....	22
2.4	AVALIAÇÃO DO CORPO LÚTEO.....	24
2.5	RECONHECIMENTO MATERNO E MORTE EMBRIONÁRIA.....	26
2.6	DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	27
	CAPÍTULO 1.....	29
3	Cap. 1 – Avaliação da vascularização do corpo lúteo por Doppler colorido no período de reconhecimento materno da gestação.....	30
3.1	RESUMO.....	30
3.2	ABSTRACT.....	31
3.3	INTRODUÇÃO.....	32
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.4.1	LOCAL E ANIMAIS.....	34
3.4.2	PROTOCOLO DE IATF.....	34
3.4.3	AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS E MENSURAÇÕES DAS IMAGENS...	35
3.4.4	AVALIAÇÃO HORMONAL.....	36
3.4.5	ANÁLISES DOS DADOS.....	36
3.5	RESULTADOS.....	37
3.6	DISCUSSÃO.....	40
3.7	CONCLUSÃO.....	43
3.8	REFERÊNCIAS.....	43
	CAPÍTULO 2.....	49
4	Cap. 2 – Predição de não-gestação 20 dias após a IATF pela avaliação do corpo lúteo com Doppler colorido.....	50
4.1	RESUMO.....	50

4.2	ABSTRACT.....	51
4.3	INTRODUÇÃO.....	52
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.4.1	LOCAL E ANIMAIS.....	54
4.4.2	PROTOCOLO DE IATF.....	54
4.4.3	AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA.....	55
4.4.4	ANÁLISE DOS DADOS.....	56
4.5	RESULTADOS	57
4.6	DISCUSSÃO.....	58
4.7	CONCLUSÃO.....	61
4.8	REFERÊNCIAS.....	61
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
6	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é o segundo maior do mundo, aproximadamente 205 milhões de animais, ficando atrás apenas da Índia (IBGE, 2010). No entanto, para que a bovinocultura brasileira atinja elevados níveis de produtividade com qualidade, a eficiência reprodutiva e o melhoramento genético são áreas que merecem destaque (BARUSELLI et al., 2006). Nesse contexto, inserem-se as biotécnicas da reprodução, promovendo essa melhora na eficiência reprodutiva e genética (GOTTSCHALL et al., 2008b). A Inseminação Artificial (IA) e a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), biotécnicas mais utilizadas no Brasil atualmente (GOTTSCHALL et al., 2008a), possibilitam o ganho genético através do uso do sêmen de touros provados em diversas características desejadas para melhoria da qualidade das progênes (BARUSELLI et al., 2006). A IATF vem se destacando em relação a IA principalmente por não haver a necessidade da observação do cio, fator limitante para utilização da IA (BARUSELLI et al., 2006; SILVA et al., 2007).

A função luteal é responsável pela duração e regularidade dos ciclos estrais, pelo controle da ocorrência de ovulações e pela manutenção da gestação. A avaliação do CL fornece informações importantes sobre o estado reprodutivo da fêmea bovina, e possibilita a adequação de procedimentos de manipulação ou sincronização do ciclo estral (VIANA et al., 1999). Identificar corretamente a presença de um CL e estimar seu estado funcional são importantes para o êxito da atividade reprodutiva de vacas leiteiras (BATTOCCHIO et al., 1998).

A palpação retal apresenta limitações como método de avaliação do CL (SPRECHER et al., 1989) pois, a projeção do CL nem sempre está associada ao tamanho do mesmo, ou seja, uma vaca que possui CL com pouca projeção pode apresentar a maior parte do mesmo dentro do estroma ovariano, enquanto outra com CL de maior projeção pode ter massa total pequena, dada a reduzida porção interna (FERNADES; BARROS, 1996).

Análise da concentração de P4 no plasma é o padrão de referência para avaliação da função luteal (TOM et al., 1998), porém possui inconvenientes como o custo e o intervalo de tempo entre a coleta da amostra e o resultado (HERZOG et al., 2010).

Outro procedimento importante e componente chave para os programas de manejo reprodutivo de rebanhos que visam melhorar o desempenho reprodutivo é o diagnóstico de gestação (THOMPSON et al., 1995). Ele contribui para a diminuição do tempo para re-inseminação de vacas vazias e, conseqüentemente, para redução dos dias abertos (OLTENACU et al., 1990).

A técnica da ultrassonografia vem-se destacando como um dos métodos mais esclarecedores e revolucionários para avaliar a dinâmica ovariana e realizar o diagnóstico precoce de gestação (BARROS; VISINTIN, 2001). Ela permite a completa visualização do tecido luteal, possibilitando maior precisão na identificação e na mensuração do CL (RIBADU et al., 1994). A ultrassonografia B-mode permite a avaliação do tamanho do CL (KASTELIC et al., 1990b). Entretanto, não está claro, se o tamanho de CL é o parâmetro mais adequado para avaliar seu estado funcional (VERONESI et al., 2002), visto que, durante a fase de regressão, o tamanho do CL diminui a uma taxa mais baixa do que os níveis de P4 (KASTELIC et al., 1990b).

Os níveis de P4 basicamente dependem do fluxo sanguíneo ao CL, que pode ser quantificado de forma confiável por ultrassonografia Doppler transretal. O ultrassom Doppler colorido oferece uma abordagem não-invasiva para avaliar a função vascular no CL, permitindo a observação visual do sinal Doppler que se refere ao fluxo sanguíneo local dentro do CL (ACOSTA et al., 2002).

Diante destes pressupostos, objetivou-se avaliar o padrão vascular luteal entre o 12º e 20º dia pós-inseminação em bovinos e determinar a confiabilidade do uso de Doppler colorido para prever animais não-gestantes 20 dias após a IATF, utilizando como único parâmetro a avaliação visual do fluxo sanguíneo no CL.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

A pecuária tem apresentado ganhos satisfatórios desejáveis, o que se deve principalmente à seleção e à difusão do uso de reprodutores geneticamente superiores através da IA. A dificuldade de prever o momento do estro de vacas ou novilhas em certo grupo pode inviabilizar o uso da IA, pois haverá um alto custo com

mão de obra qualificada para detecção do estro, principalmente em regiões mais tecnificadas e desenvolvidas, onde a oferta dessa mão de obra é limitada (BARROS, 2000).

A IATF vem se destacando em relação a IA principalmente por não haver a necessidade da observação do cio, pela praticidade de sua implantação na propriedade, por facilitar o manejo, aumentar a taxa de natalidade e ser eficaz no ajuste da estação reprodutiva (BARUSELLI et al., 2006; SILVA et al., 2007). Esta biotécnica se destaca ainda, pois além da manifestação reduzida de cio em vacas leiteiras, muitos fatores influenciam na rotina de observação de cio, fato observado tanto em sistemas leiteiros intensivos com vacas de alta produção quanto em sistemas a pasto com vacas mestiças (SARTORI, 2007).

A IATF visa incrementar os índices de produtividade dos rebanhos de cria. É uma das alternativas para melhorar a eficiência reprodutiva e aumentar a taxa de serviço. Além disso, a IATF tem o potencial de encurtar a estação de monta, produzir bezerros uniformes, simplificar o uso da IA (GOTTSCHALL et al., 2009), antecipação à concepção e a parição dentro das respectivas estações reprodutivas, maior probabilidade de re-concepção na estação subsequente, concentração dos nascimentos e o maior peso ao desmame dos terneiros (GOTTSCHALL et al., 2008a).

Paralelamente, se faz necessário o uso dos protocolos de sincronização do estro e ovulação, os quais incluem a sincronização do estro em fêmeas ciclando e a indução do estro acompanhado de ovulação em novilhas que ainda não atingiram a puberdade ou em vacas que apresentam retorno do estro tardiamente após a parição (LAMB, 2003).

Inúmeros são os protocolos utilizados para o emprego da IATF em bovinos (GOTTSCHALL et al., 2009). Os protocolos para a IATF objetivam induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular, controlar a duração do crescimento folicular até o estágio pré-ovulatório, sincronizar a inserção e a retirada da fonte de P4 exógena (implante) e endógena (por meio da PGF2 α na luteólise) e induzir a ovulação sincronizada simultaneamente nos animais tratados (BÓ et al., 2002b; BARUSELLI et al., 2006). Para que o protocolo de IATF seja eficiente, há a necessidade da sincronização da onda folicular, regressão do CL e indução de ovulação de um folículo maduro ao final do protocolo (SARTORI, 2007).

A associação entre Benzoato de estradiol (BE) e a P4 tem sido amplamente utilizada nos protocolos de sincronização da ovulação para IATF em vacas de leite e corte (BÓ et al., 2002a; BÓ et al., 2002b). Bó et al. (2002b) e Baruselli et al. (2006) afirmam que o tratamento padrão consiste na inserção de um dispositivo impregnado de P4 e administração de estradiol no dia 0 (para sincronizar a emergência de uma onda folicular), PGF2 α no momento da remoção do dispositivo no 7^o, 8^o ou 9^o dia (para assegurar a luteólise) e subsequente aplicação de uma dose menor de BE, 24 horas após a retirada do dispositivo, seguida pela IATF 52-56 horas, após a retirada do dispositivo.

Nesse protocolo, a P4 do dispositivo é capaz de bloquear a liberação endógena do hormônio luteinizante (LH), que segundo Burke et al. (1996), simula a fase luteínica do ciclo estral. A regressão luteínica é induzida pela administração do E2 no dia da colocação do dispositivo ou pela PGF2 α no dia da remoção do implante.

O uso de implantes de P4 ou progestágeno, além de sincronizar o estro com maior precisão nas novilhas, induz ciclicidade e previne a ocorrência de ciclo curto nas novilhas acíclicas (ausência de CL) após a IA (SARTORI, 2007).

Os estrógenos, principalmente os de longa duração na corrente sanguínea, são capazes de induzir a luteólise pela sua capacidade de estimular a secreção endógena de PGF2 α pelo endométrio uterino. Esse efeito luteolítico é superior quando o E2 de meia vida longa é incorporado no início dos protocolos de sincronização da ovulação para IATF, com o objetivo de induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular e de eliminar a administração de PGF2 α (BARUSELLI, 2010).

Após a IA, é importante que as vacas sejam observadas para retorno ao cio e que seja realizado diagnóstico de gestação o mais precoce possível com o propósito de se detectar as vacas não gestantes e as re-sincronizar o quanto antes, para com isso, elevar a taxa de prenhez do rebanho (SARTORI, 2007).

Com o propósito de aumentar ainda mais a eficiência do manejo reprodutivo em um programa de IATF, deve-se procurar utilizar a detecção de cio e IA em vacas que retornam ao estro após IATF, ou seja, não esperar até o diagnóstico negativo de gestação para re-sincronizar e re-inseminar os animais (SARTORI, 2007).

Sartori (2007) também afirma que para o emprego da IATF em vacas leiteiras ser bem sucedido, além de procurar contornar fatores que podem fugir ao controle do homem, deve-se ser rigoroso quanto às recomendações de dose e momento das aplicações e qualidade dos produtos utilizados nos protocolos de sincronização.

2.2 LUTEOGÊNESE E FUNÇÃO DO CORPO LÚTEO

A luteogênese consiste em todas as mudanças morfológicas, endócrinas e enzimáticas que ocorrem no folículo ovulatório até que se transforme em CL funcional (SMITH et al., 1999) capaz de secretar grandes quantidades de P4 (SALLES; ARAÚJO, 2010). No fim do estro, ocorre a ovulação seguida de formação do CL resultando na secreção de P4 (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O folículo pré-ovulatório no ovário é responsável pelas concentrações plasmáticas elevadas de estrógenos, condição determinante para a ocorrência de um pico pré-ovulatório de LH e a ovulação (BERTAN et al., 2006).

A luteinização começa antes da ovulação, com mudanças na população de receptores de gonadotrofinas (MOURA, 2003). A gonadotrofina que mais atua nestes receptores levando à ruptura do folículo e sua posterior transformação em estrutura lútea é o LH (SALLES; ARAÚJO, 2010).

A parede do folículo ovulado é colapsada e a cavidade invadida por linfa e sangue provenientes dos capilares presentes em grande quantidade no folículo ovulatório, fibroblastos, células musculares lisas, células do sistema imune (SANGHA et al., 2002; WEBB et al., 2002; BERTAN et al., 2006), células endoteliais, células da teca interna e células da granulosa, que sofrem hiperplasia e/ou hipertrofia (BERTAN, 2004). Esse conjunto de componentes promove a formação de uma estrutura denominada de corpo hemorrágico (BERTAN et al., 2006). Este se reorganiza para formar o CL sob influência de vários fatores angiogênicos e mitogênicos (BERISCHA; SCHAMS, 2005) como o fator de crescimento dos fibroblastos, fator de crescimento semelhante à insulina tipo I, fator de crescimento semelhante à heparina e fator de crescimento endotelial vascular, Angiopoitina-1 e 2, PGF₂α, Endotelina-1, a angiotensina II e óxido nítrico (NISWENDER, 2002; WEBB

et al., 2002). Tais fatores agem diretamente na regulação da secreção de P4 ou de forma indireta na regulação do fluxo sanguíneo até o CL (MIYAMOTO et al., 2009).

Corpos Lúteos podem apresentar antro ser (cavidade), sendo sua provável origem atribuída à ocupação incompleta da cavidade folicular pelas células durante a luteinização (KASTELIC et al., 1990b). Marques et al. (2002) afirma que as concentrações de P4 não são influenciadas pela presença da cavidade no CL.

O desenvolvimento normal do CL e sua capacidade de produzir P4, fatores de crescimento, fatores angiogênicos e substâncias vasoativas, dependem de sua vascularização, com o fornecimento de fluxo sanguíneo (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004), embora o fator de crescimento endotelial vascular e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) sejam os principais responsáveis pelo desenvolvimento e pela manutenção da densa rede de capilares neoformados, além de contribuírem de maneira parácrina e autócrina para a produção de progesterona (SCHAMS; BERISHA, 2002). Segundo Wiltbank (1994) o fluxo sanguíneo para o CL é maior do que para qualquer outro tecido no corpo. No diestro, de 65 a 95% do fluxo sanguíneo do ovário é destinado ao CL, e existe uma estreita relação anatômica entre as células luteais e endoteliais.

A angiogênese é essencial na formação e manutenção do corpo lúteo, assegurando a sua nutrição e trocas respiratórias, indispensáveis para a sua viabilidade, permitindo o desempenho de suas funções (YAN et al., 1998), sendo a angiogênese dependente do complexo balanço entre fatores estimuladores e inibidores (BERISHA; SCHAMS, 2005). Dentre os fatores polipeptídicos angiogênicos, o fator de crescimento endotelial vascular produzido pelo CL é considerado o principal fator mitogênico das células endoteliais, pois induz à migração, diferenciação e proliferação celular, bem como à maturação e estabilização dos vasos sanguíneos (FAVIER; CORVOL, 2001). Além dos membros da família do fator de crescimento endotelial vascular, o fator de crescimento dos fibroblastos, o fator de crescimento epidermal, o fator de crescimento semelhante à insulina-I e à angiopoietina exercem um importante papel na angiogênese do CL (BERISHA; SCHAMS, 2005).

O fluxo sanguíneo está diretamente relacionado à produção de P4, pois determina a disponibilidade de hormônios, nutrientes e substratos, e a remoção da P4 produzida. Fatores que modulam o fluxo sanguíneo ovariano podem aumentar

(LH, PGI₂) ou reduzir (PGF₂ α , catecolaminas) a esteroidogênese luteal (WILTBANK, 1994). O LH e o hormônio do crescimento (GH) possuem uma ação efetiva na regulação da atuação dos fatores de crescimento e estímulo à produção de P₄; outros agentes, como peptídeos, esteroides e prostaglandinas, são responsáveis pela modulação da função luteínica e regulação fina da glândula (SCHAMS; BERISHA, 2004).

Em relação à porção celular, após a ovulação, as células da teca e as células da granulosa, que até então sintetizavam estrógenos, são reorganizadas para formarem o CL e passam a sintetizar P₄. Para isso, ocorre uma diminuição na expressão da enzima P450aromatase, que converte a androstenediona em E₂. Entretanto, para que a P₄ seja sintetizada em grande quantidade, além de a diferenciação celular ocorrer, há aumento na expressão das enzimas necessárias para a conversão do colesterol em P₄ e das proteínas transportadoras de colesterol para o interior da membrana mitocondrial. O colesterol transportado para membrana mitocondrial interna interage com a enzima P450scc, que o cliva, transformando-o em pregnenolona (BERTAN et al., 2006). Este precursor é transportado para o retículo endoplasmático liso e, por ação da enzima β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD), é convertido em P₄ (SALLES; ARAÚJO, 2010).

Assim, a produção de P₄ no CL é caracterizada por aumento na expressão das enzimas que convertem o colesterol em P₄ (P450scc e 3 β -HSD) e por decréscimo na expressão das enzimas que convertem P₄ em estradiol (P45017 α -hidroxilase e P450 aromatase) (BERTAM et al., 2006).

O CL maduro é composto por pelo menos dois tipos de células esteroidogênicas (células luteais pequenas e grandes), que diferem que morfológicamente e funcionalmente e também na sua origem folicular. As células luteais pequenas originárias das células da teca, respondem ao LH com aumento da secreção de P₄, via ativação da proteína kinase A. As células luteais grandes originam-se das células da granulosa e contém receptores para PGF₂ α e, aparentemente, fazem a mediação das ações luteolíticas deste hormônio, além de serem responsáveis por aproximadamente 80% da P₄ secretada *in vivo*, também via proteína kinase A (NISWENDER et al., 2000). Grande parte do parênquima do CL é constituído por estas células luteais esteroidogênicas, no entanto, células de suporte respondem por aproximadamente 20% do volume e incluem elementos vasculares

(células endoteliais e pericitos), macrófagos, células musculares lisas e fibroblastos (NISWENDER et al.,1994).

As células de suporte demonstram importante papel na função do CL, sendo fibroblastos associados aos componentes estruturais dos tecidos e produzem glicosaminoglicanas, colágeno e algumas citocinas que influenciam a função de células lúteas (CHRISTENSON; DEVOTO, 2003). Os macrófagos têm uma importante função na remodelagem do tecido e participa da resposta imune que leva a lise do CL (TANIGUCHI et al., 2002).

O CL chega à sua maturação cerca de 7 dias após a ovulação (HAFEZ; HAFEZ, 2004) e na vaca não gestante, o CL começa a regredir após o 17º dia, processo conhecido como luteólise, e ocorre pela ação da PGF2 α (BALL; PETERS, 2006).

A função luteal é responsável pela duração e regularidade dos ciclos estrais, pelo controle da ocorrência de ovulações e pela manutenção da gestação (VIANA, et al., 1999). A cada ciclo estral, a P4 liberada na circulação sistêmica pelas células luteínicas esteroidogênicas, promovem a quiescência na contratilidade do miométrio, o desenvolvimento glandular do endométrio e o ambiente uterino adequado para o desenvolvimento do concepto (BERTAN, 2004). O papel regulador da progesterona tem despertado interesse, uma vez que determina o comprimento do ciclo estral e a manutenção da gestação, com ações fisiológicas em vários tecidos alvos (BERTAN, 2004). Além disso, a possibilidade de alterar a extensão de seu período ativo abriu perspectivas de controlar a época da ovulação nas diversas espécies de animais domésticos (SALLES; ARAÚJO, 2010).

2.3 LUTEÓLISE

Luteólise é definida como processo responsável pela lise do CL, resultando em sua destruição funcional e estrutural (NISWENDER, et al., 2000). O CL é um dos poucos tecidos que exhibe períodos regulares de crescimento, função e lise (BERISHA; SCHAMS, 2005).

Durante o ciclo estral normal o CL começa a regredir 17 dias após a ovulação. O processo de regressão luteal é iniciado pela ocitocina produzida pelo próprio CL, que estimula a produção uterina de $\text{PGF2}\alpha$ (BALL; PETERS, 2006), que age localmente no CL, aonde chega por um mecanismo de circulação contracorrente da veia utero-ovárica direto para a artéria ovariana (FERREIRA, 2010). Esse mecanismo permite que a $\text{PGF2}\alpha$ seja transferida para a artéria ovariana, sem entrar na circulação pulmonar, onde ela seria enzimaticamente inativada nos pulmões (NISWENDER et al., 2000).

A luteólise caracteriza-se por mudanças funcionais e estruturais das células esteroidogênicas e não esteroidogênicas do CL, levando a uma gradual involução do mesmo, até que se forme uma pequena cicatriz composta de tecido conectivo e colágeno, o corpus albicans, que persiste no ovário por várias semanas (SKARZYNSKI et al., 2008). A lise ocorre pela liberação pulsátil da $\text{PGF2}\alpha$ de origem uterina (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004) que conduz a degeneração vascular e de células esteroidogênicas (STOUFFER et al., 2001). Entretanto, as células endoteliais da microvasculatura são as primeiras a se submeterem ao processo de apoptose no início da regressão do corpo lúteo (DAVIS et al., 2003). A presença de um CL funcional aumenta consideravelmente a irrigação sanguínea do ovário (BERISHA; SCHAMS, 2005). Durante a regressão, o fluxo sanguíneo para o ovário luteinizado declina bruscamente (JORDAN et al., 2009) devido a ação da $\text{PGF2}\alpha$, que é um potente vasoconstritor, por isso reduz o fluxo sanguíneo para o CL (WEEMS et al., 2006) levando a destruição do CL funcional e posterior formação do corpus albicans (SIQUEIRA, 2007).

Após o início da luteólise, o declínio da P4 sistêmica não ocorre devido a regressão das células luteais e sim pela diminuição do fluxo sanguíneo para o CL que afeta a capacidade esteroidogênica das células luteais (SIQUEIRA et al., 2009). A $\text{PGF2}\alpha$ se liga a receptores específicos na membrana das células luteais esteroidogênicas interrompendo a produção de P4 (MARTIN; FERREIRA, 2009) pela redução na captação e no transporte de colesterol para o citoplasma e para a mitocôndria (NISWENDER et al., 2000).

A cada ciclo estral, com a regressão luteal, ocorre o desenvolvimento final e a maturação de um folículo e a sua ovulação, criando uma nova oportunidade de concepção (PATE, 1994).

2.4 AVALIAÇÃO DO CORPO LÚTEO

A função luteal é responsável pela duração e regularidade dos ciclos estrais, pelo controle da ocorrência de ovulações e pela manutenção da gestação. A avaliação do CL fornece informações importantes sobre o estado reprodutivo da fêmea bovina, e possibilita a adequação de procedimentos de manipulação ou sincronização do ciclo estral (VIANA et al., 1999). Identificar corretamente a presença de um CL e estimar seu estado funcional são importantes para o êxito da atividade reprodutiva de vacas leiteiras (BATTOCCHIO et al., 1998).

A palpação retal é um método utilizado há muitos anos, que permite certa precisão no diagnóstico de condições e estruturas ovarianas a partir de certo tamanho. É a técnica mais utilizada para a avaliação do sistema genital de bovinos, porém possui limitações como método de avaliação ou diagnóstico de CL (FERREIRA, 2010). A regressão do CL é ainda mais difícil de detectar por meio de palpação retal (PIETERSE et al., 1990). A palpação é limitada pois a projeção do CL nem sempre está associada ao tamanho do mesmo. Uma vaca que possui CL com pouca projeção pode apresentar a maior parte do mesmo dentro do estroma ovariano, enquanto outra com CL de maior projeção pode ter massa total pequena, dada a reduzida porção interna (FERNANDES; BARROS, 1996).

A concentração plasmática de P4 está relacionada com sua produção e liberação pelo CL e suas taxas de metabolização e eliminação, que podem ser influenciadas pelo fluxo sanguíneo, disponibilidade de precursores e fatores luteotróficos (VIANA et al., 1999). As concentrações plasmáticas de P4 apresentam variação cíclica durante o ciclo estral e refletem a funcionalidade do CL entre a fase de crescimento, manutenção e regressão (BORGES et al., 2003).

Análise da concentração de P4 no plasma é o padrão de referência para avaliação da função luteal (TOM et al., 1998). No dia do estro a P4 encontra-se abaixo de 1ng/mL, e valores máximos são encontrados ao redor do 10º dia (WISE et al., 1982, BORGES et al., 2003), e são mantidas elevadas até início da regressão do CL, caso não ocorra gestação (BORGES, 2001).

No entanto, a avaliação do CL baseada na P4 sanguínea tem dois inconvenientes: custos relativamente elevados e o segundo é o intervalo de

tempo entre a retirada de sangue e disponibilidade do resultado, o que prejudica medidas diretas imediatamente após a palpação do ovário (HERZOG et al., 2010).

O uso da ultrassonografia nos estudos da reprodução bovina revolucionou o conhecimento da fisiologia reprodutiva. As pesquisas geradas com o uso das imagens de ultrassom esclareceram a complexidade do processo reprodutivo nas fêmeas bovinas, como a dinâmica do desenvolvimento folicular, a formação do CL e o desenvolvimento fetal (VASCONCELOS; SANTOS, 2006).

A ultrassonografia é uma técnica que permite a completa visualização do tecido luteal, possibilitando maior precisão na identificação e na mensuração do CL (PIERSON; GINTHER, 1987; RIBADU et al., 1994). Nessa avaliação, a imagem do CL é uniforme, circunscrita e menos ecogênica que o estroma ovariano (VIANA et al., 1999). Alterações na vascularização ocorrem nos folículos e corpos lúteos crescendo e regredindo (SINGH et al., 1997;). Assim, o Doppler colorido, pode ser utilizado para caracterizar alterações na dinâmica vascular em processos fisiológicos importantes (SINGH et al., 2003).

O processo de luteinização com significativa hiperplasia das células tecais, hipertrofia das células da granulosa (NISWENDER et al., 1994) e ainda proliferação de células fibroblásticas (GONÇALVES et al., 2001), resulta, na aquisição progressiva de tamanho, forma, consistência e padrão ecogênico do CL (TOM et al., 1998). Existe alta relação entre a concentração de P4 plasmática e a massa e o volume do CL (VERONESI et al., 2002). A grande angiogênese característica da luteinização (SMITH et al., 1994) é também responsável pelo padrão hipoecogênico do CL à ultrassonografia (TOM et al., 1998). Os níveis de P4 basicamente dependem do fluxo sanguíneo ao CL, que pode ser quantificado de forma confiável por ultrassonografia Doppler transretal. O ultrassom Doppler colorido oferece uma abordagem não-invasiva para avaliar a função vascular no CL, permitindo a observação visual do sinal Doppler que se refere ao fluxo sanguíneo local dentro do CL (ACOSTA et al., 2002).

Uma relação estreita entre fluxo sanguíneo luteal e P4 foi também encontrada em éguas durante todo o ciclo estral (BOLLWEIN et al., 2002; GINTHER et al., 2007). Nas vacas, o fluxo sanguíneo luteal foi examinado apenas durante curtos períodos do ciclo estral, por exemplo, durante luteólise espontânea (MIYAMOTO et al., 2005) e luteólise induzida (ACOSTA et al., 2002).

A luteólise e o subsequente retorno à atividade ovariana cíclica podem ser monitorados por vários parâmetros, dentre eles o tamanho e aspecto ultrassonográfico do tecido luteal (SIQUEIRA et al., 2009), fluxo sanguíneo luteal, avaliado pelo Doppler colorido (MIYAMOTO et al., 2005) e a concentração plasmática de P4 (BICALHO et al., 2008; MARTIN; FERREIRA, 2009). A regressão funcional do CL é caracterizada pelo decréscimo na produção de P4, e a redução estrutural se manifesta como uma degradação do tecido luteal (PATE, 1994).

2.5 RECONHECIMENTO MATERNO E MORTALIDADE EMBRIONÁRIA

Segundo Vieira (2011), diversos autores têm demonstrado que a inter-relação entre o embrião e o útero para o estabelecimento da gestação é dependente de uma comunicação ativa e passiva entre eles, sendo indispensável para que o embrião se implante e possa estabelecer sua nutrição, e a não regressão do CL, sendo este responsável pela manutenção dos índices de P4. Este processo se dá pela sinalização do embrião à mãe de sua presença no útero, por intermédio da produção de interferon tau (IFN- τ), sendo denominado de reconhecimento materno da gestação. Para a gestação se estabelecer, o conceito tem de sinalizar a sua presença quando atinge o útero (PEREIRA, 2009).

O conceito viável tem a capacidade de libertar algumas proteínas específicas para que o reconhecimento da gestação ocorra. Nos bovinos o IFN- τ é a proteína que está na base do reconhecimento materno e na manutenção da gestação. Sua principal função é inibir a produção de PGF2 α , através da redução do número de receptores para a ocitocina no endométrio (PEREIRA, 2009).

A presença do embrião por volta do dia 16 do ciclo inibe a síntese e liberação de PGF2 α do endométrio (OKUDA et al., 2002), prevenindo assim a luteólise e o conseqüente declínio na produção de P4 (SARTORI; DODE, 2008). O reconhecimento materno da gestação ocorre entre os dias 16 e 19 (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Após a IA, mortalidade embrionária (ME) é reconhecida como a maior causa de falhas reprodutivas em bovinos (SANTOS et al., 2004) e perdas financeiras significativas para a indústria (DUNNE et al., 2000). A ME refere-se especificamente

às perdas decorrentes no período que se estende da fecundação ao completo estágio da diferenciação embrionária que ocorre em torno do 42º dia (DUNNE et al., 2000). Já a ME precoce, quando ocorre anterior ao 24º dia (FERREIRA, 2010).

De acordo com Burns et al. (2010), os seguintes fatores que contribuem para transtornos fisiológicos e causas de ME e ou fetal são: 1) inadequado CL durante os primeiros 200 dias da gestação; 2) assincronia embrionária e materna próxima ao tempo do reconhecimento materno da gestação, como resultado do desequilíbrio entre E2 e P4; 3) deficiência da imunidade uterina local, resultando em contaminação bacteriana, com um processo inflamatória direta ou indiretamente afetando a viabilidade espermática ou do embrião; 4) falha do mecanismo antiluteolítico do IFN- τ secretado pelo embrião, ou inadequada reação do endométrio ao IFN- τ , em torno do período de reconhecimento materno; 5) falha na interação entre o concepto e a mãe, o que requer um número de citocinas, que estão envolvidas no processo de implantação e fatores imunes e de crescimento, que estão envolvidos no desenvolvimento e diferenciação do concepto.

É geralmente aceito que a taxa de fertilização é da ordem de 90% e que a perda de embrião representa uma perda de 29-39% após a fertilização com a maioria destas perdas ocorrendo entre 8 e 16 dias após a inseminação (DUNNE et al., 2000).

2.6 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

O diagnóstico de gestação ou prenhez é, fundamentalmente, uma técnica que permite determinar sua existência e duração. Constitui-se em ferramenta estratégica no manejo geral das propriedades, pois o conhecimento da existência ou não da prenhez possibilita a tomada de decisões que podem afetar diretamente os índices de produtividade (GOLNÇALVES et al., 2008).

Os métodos mais populares para diagnosticar a gestação são a palpação retal e a ultrassonografia (DE VRIES et al., 2005).

A palpação retal tem sido utilizada nos últimos 50 anos para diagnosticar a gestação. Este diagnóstico pode ser feito após 30 a 35 dias em vacas adultas e um pouco mais cedo em novilhas. No entanto, vale ressaltar que a precisão do

diagnóstico precoce por palpação retal varia de acordo com a perícia e experiência do médico veterinário (DESCÔTEAUX et al., 2006).

Existem informações contraditórias sobre os possíveis efeitos deletérios da palpação retal para diagnóstico precoce da gestação sobre o embrião e viabilidade fetal. Entretanto, os autores afirmam com seu experimento que o diagnóstico de gestação precoce por palpação retal não afeta o embrião e a viabilidade fetal (ROMANO et al., 2007). Uma das desvantagens da palpação retal para diagnóstico precoce da gestação é o risco de causar ME (DESCÔTEAUX et al., 2006).

A técnica da ultrassonografia vem se destacando como um dos métodos mais esclarecedores e revolucionários para avaliar a dinâmica ovariana e realizar o diagnóstico precoce de gestação (BARROS; VISINTIN, 2001). A ultrassonografia é menos traumática e mais precisa do que a palpação retal para o diagnóstico de prenhez antes do dia 35 (DESCÔTEAUX et al., 2006).

Sabe-se que a acurácia é comprometida se os exames são realizados muito precocemente (KASTELIC et al., 1989; BADTRAM et al., 1991; NATION et al., 2003) e, embora melhores resultados tenham sido observados após o dia 25 pós-IA (PIETERSE et al., 1990; FRICKE, 2002), Nation et al. (2003) verificaram que diagnósticos realizados antes do dia 30 eram precoces e pouco confiáveis, devido ao risco de perdas embrionárias. Quando o tempo para re-inseminação é reduzido, o desempenho reprodutivo do rebanho é melhorado (OLTENACU et al., 1990).

Mesmo sendo possível identificar uma vesícula embrionária por ultrassom já no 9º dia de gestação, a exatidão para o diagnóstico só chega a 100% após o 25º dia. Assim, para fins práticos e maior eficiência o diagnóstico correto de prenhez por ultrassom só deve ser realizado com 26 ou mais dias de gestação (LAMB, 2003).

O diagnóstico precoce da gestação pode diminuir a precisão do diagnóstico resultando em conclusões erradas. Erros no diagnóstico geram altos custos, pois um diagnóstico falso positivo resulta em atraso na re-inseminação de vacas vazias e um falso negativo pode levar a abortamento se PGF2 α é administrada (DE VRIES et al., 2005).

CAPÍTULO 1

Avaliação da vascularização do corpo lúteo por Doppler colorido no período de reconhecimento materno da gestação

3 Cap. 1 – Avaliação da vascularização do corpo lúteo por Doppler colorido no período de reconhecimento materno da gestação

Evaluation of corpora lutea vascularization by color Doppler during the period of maternal recognition of pregnancy

Vagner Sarmiento Areas¹, Luiz Gustavo Bruno Siqueira², Alberto Mansur Ghetti³, Eliza Diniz de Souza⁴, Eduardo Kenji Nunes Arashiro⁵, Luiz Sérgio de Almeida Camargo², João Henrique Moreira Viana²

¹Mestrando em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo;

²Pesquisador Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG;

³Mestrando em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ ;

⁴Bolsista de apoio técnico da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG;

⁵Doutorando em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG;

* Autor para contato: jhmviaana@cnppl.embrapa.br

3.1 RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar o padrão vascular luteal entre o 12^o e 20^o dias pós-inseminação em bovinos. Vacas e novilhas (n= 115) mestiças Holandês x Gir foram submetidas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). No período de 12 a 20 dias após a inseminação, os corpos lúteos dos animais foram avaliados a cada 48h utilizando um ultrassom portátil equipado com a função Doppler colorido (MyLab30, Esaote, Italia) e probe linear retal de 7,5 MHz. Foi calculada a área total do CL (ACL), área da cavidade luteal (CCL), área de tecido luteal (ATL, ACL menos área da CCL, se presentes), área do sinal Doppler (AV) e proporção entre AV e ATL

(PV). No D30, os animais foram submetidos ao diagnóstico de gestação. A atividade luteal foi monitorada pela determinação da concentração plasmática de progesterona (CPP) no sangue, coletado em todos os dias em que ocorriam os exames ultrassonográficos. Os valores de ACL, CCL, ATL, AV, PV e CPP entre o D12 e D20 foram comparados entre animais posteriormente classificados como gestantes ou não gestantes. Não houve efeito de dia nas variáveis ACL, CCL, ATL, AV, PV e CPP de animais posteriormente diagnosticados como gestantes ($P > 0,05$). Nos animais não gestantes, houve redução ($P < 0,01$) nos parâmetros luteais até o D20. Apesar das medidas realizadas com Doppler colorido (AV e PV) apresentarem elevados CVs ($> 50\%$), elas apresentaram diferenças significativas entre animais gestantes e não gestantes mais cedo em relação à ATL (diferenças a partir de D18), a CPP (D18) e ACL (D20). Conclui-se que o uso do Doppler colorido pode resultar em diagnósticos mais precoces e mais acurados de alterações da função luteal no período de reconhecimento materno da gestação.

Palavras-chave: Função luteal. progesterona. bovinos.

3.2 ABSTRACT

Progesterone production by the corpus luteum is closely related to blood flow. Consequently, evaluation of corpus luteum vascularization can provide important indexes of luteal function. The aim of the present study was to evaluate luteal vascularization between days 12 and 20 post-insemination in cattle. Holstein x Gyr crossbred cows and heifers ($n=115$) were inseminated using a TAI protocol: D -10 insertion of a 1.0 g progesterone device (Sincrogest, Ourofino) and injection of 2 mg estradiol benzoate (BE, Sincrodiol, Ourofino); D -2 device removal and injection of 0.5 mg sodium cloprostenol (Sincrocio, Ourofino); D -1 injection of 1 mg BE; D0 – TAI. The animals were evaluated each 48h from 12 to 20 days after FTAI, using a portable ultrasound device equipped with color Doppler (MyLab30, Esaote, Italia) and a linear rectal probe 7.5 MHz. The evaluation parameters were: total corpora lutea area (CLA), luteal tissue area (LTA, total area minus cavities area, if present), vascularization area (VA, established by Doppler signal) and VA/LTA ratio (VP). Pregnancy diagnosis was performed on day 30. The values of CLA, LTA, VA and VP

between D12 and D20 were compared between animals later detected as pregnant or non-pregnant. Results are shown as mean \pm SEM. Pregnancy rate was 51.1% (48/94). There was no day effect on CLA, LTA, VA and VP in animals later diagnosed as pregnant ($P>0.05$). In non-pregnant ones, there was a reduction ($P<0.01$) in all luteal parameter values up to D20. Despite showing greater VCs ($>50\%$), Doppler parameter (VA and VP) values were different between pregnant and non-pregnant animals earlier (D16: 0.66 ± 0.04 vs. 0.42 ± 0.04 cm² for VA and 18.88 ± 1.12 vs. $11.17\pm 0.82\%$ for VP, respectively, $P<0.001$) than LTA (difference after D18) or CLA (after D20). For the same day (D20), the magnitude of differences was also greater between Doppler and conventional measure values (231.20% [VA] and 171.46% [VP] vs. 25.79 [CLA] and 38.78% [LTA] of difference between non-pregnant and pregnant animals, respectively). These preliminary results suggest that the use of color Doppler can provide more precocious and more accurate diagnosis of luteal function changes during the period of maternal pregnancy recognition.

Keywords: Luteal function. progesterone. cattle.

3.3 INTRODUÇÃO

Identificar corretamente a presença de um corpo lúteo (CL) e estimar seu estado funcional são atividades importantes para o êxito da atividade reprodutiva de vacas leiteiras, incluindo a data da administração de prostaglandinas para a sincronização do estro ou seleção de receptoras de embriões (BATTOCCHIO et al., 1998). Além disso, a função luteal é responsável pela duração e regularidade dos ciclos estrais, pelo controle da ocorrência de ovulações e pela manutenção da gestação (VIANA, et al., 1999).

Análise da concentração de progesterona (P4) no plasma é o padrão de referência para avaliação da função luteal (TOM et al., 1998). No dia do estro a P4 encontra-se abaixo de 1ng/mL, e valores máximos são encontrados ao redor do 10^o dia (WISE et al., 1982, BORGES et al., 2003), e são mantidas elevadas até início da regressão do CL, caso não ocorra gestação (BORGES, 2001). No entanto, o diagnóstico baseado na P4 sanguínea tem dois inconvenientes: custos relativamente elevados e o intervalo de tempo entre a retirada de sangue e disponibilidade do

resultado, o que prejudica a tomada de decisão após a palpação do ovário (HERZOG et al, 2010).

A ultrassonografia modo-B permite a avaliação do tamanho do CL (KASTELIC et al., 1990b). Apesar de existir alta relação entre a concentração de P4 plasmática e a massa e o volume do CL, não está claro, entretanto, se o tamanho de CL é o parâmetro mais adequado para avaliar seu estado funcional (VERONESI et al., 2002). Especificamente, durante a fase de regressão, o tamanho do CL diminui a uma taxa mais baixa do que os níveis de P4 (KASTELIC et al., 1990b).

Um método eficaz seria a avaliação ultrassonográfica com Doppler transretal, pois oferece uma abordagem não-invasiva para avaliar a função vascular no CL, permitindo a observação visual do sinal Doppler que se refere ao fluxo sanguíneo local dentro do CL, já que os níveis de P4 basicamente dependem do fluxo sanguíneo ao CL. Assim, o fluxo sanguíneo pode ser quantificado de forma confiável por ultrassonografia Doppler transretal (ACOSTA et al., 2002).

Objetivou-se com este estudo avaliar o padrão vascular luteal entre o 12º e 20º dias pós-inseminação em bovinos utilizando ultrassonografia transretal com Doppler colorido.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 LOCAL E ANIMAIS

O experimento foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) gado de leite, em Coronel Pacheco – MG.

Foram utilizadas vacas e novilhas (n= 115) mestiças de Holandês x Gir, com grau de sangue variado e escore de condição corporal variando de 2,5 a 4,0 (FERREIRA; TORRES, 1993). Os animais ficavam em regime de pasto.

3.4.2 PROTOCOLO DE IATF

Os animais foram inseminados artificialmente em tempo fixo, utilizando o seguinte protocolo: D-10 implante vaginal de 1,0g progesterona¹ (Sincrogest[®]) e aplicação de 2mg, intramuscular (IM), de benzoato de estradiol¹ (BE, SincrodioI[®]); D-2 retirada do implante e aplicação de 0,5mg, IM, de cloprostenol sódico¹ (Sincrocio[®]); D-1 aplicação de 1mg, IM, BE; D0 Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).

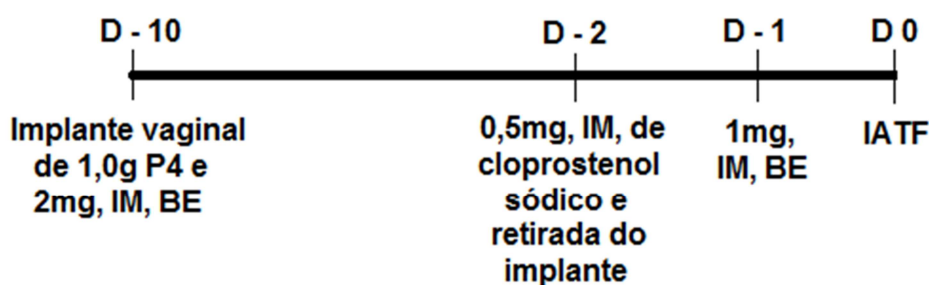


Figura 1 – Protocolo de IATF utilizado.

3.4.3 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS E MENSURAÇÕES DAS IMAGENS

No período de 12 a 20 dias após a IATF, os animais foram avaliados a cada 48h utilizando um ultrassom portátil equipado com a função Doppler colorido (MyLab30 VetGold, Esaote, Italia) e probe linear retal de 7,5 MHz. Foi realizada ultrassonografia convencional modo-B para localização do CL, e modo Doppler colorido (CFM) para determinação do fluxo sanguíneo luteal, utilizando frequência de 7.5 MHz, ganho de cor de 70% e frequência de repetição de pulsos (PRF): 0.7 KHz. As imagens foram salvas no próprio aparelho para posterior avaliação. Os animais que não apresentavam CL no primeiro dia da avaliação foram excluídos do estudo.

Foi determinada a posição e mensurada a área da seção transversal (cm²) do CL e de cavidades luteais eventualmente presentes por meio de dispositivo do próprio aparelho (Figura 2).

¹ Ourofino, SP, Brasil.

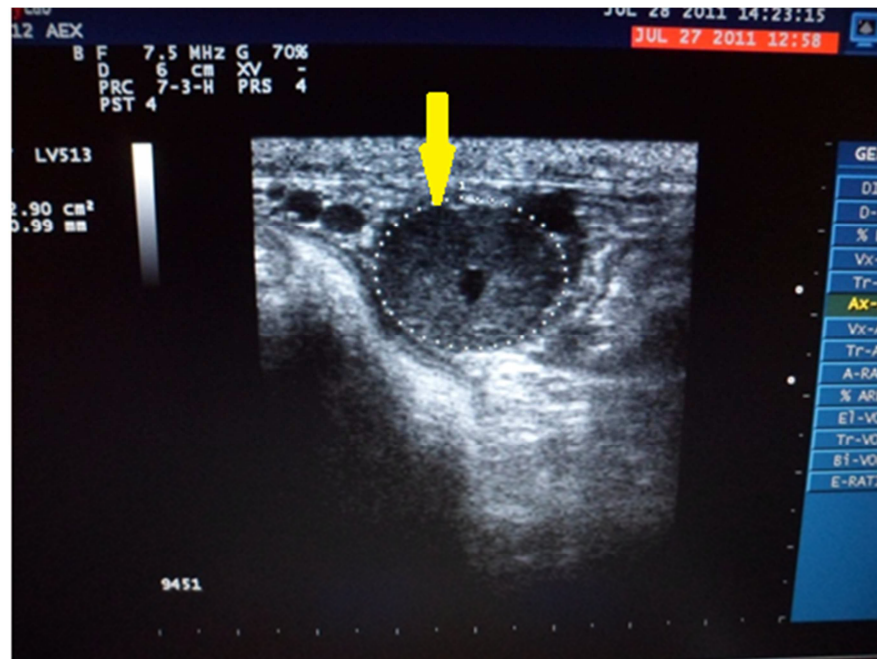


Figura 2 – Determinação da área da seção transversal (cm^2) do CL por meio de dispositivo (linha pontilhada) do próprio aparelho (seta amarela).

A partir de imagens com maior diâmetro dos corpus lúteos, foram calculadas a área total do CL (ACL), área da cavidade luteal (CCL), área de tecido luteal (ATL, ACL menos área da CCL), área do sinal Doppler (AV) e proporção entre AV e ATL (PV). No D30, os animais foram submetidos ao diagnóstico de gestação.

Para o cálculo da área do sinal Doppler, utilizou-se o programa ImageJ (Figura 3). Foram armazenados vídeos com a função Doppler acionada. Após paralizar o vídeo com a imagem onde mostra o CL em seu maior diâmetro, foi utilizado o programa ImageJ para mensurar as áreas vascularizadas (áreas coloridas). Cada área colorida era contornada, obtendo-se a sua área. As áreas de cada região colorida eram então somadas, obtendo-se a AV do CL.

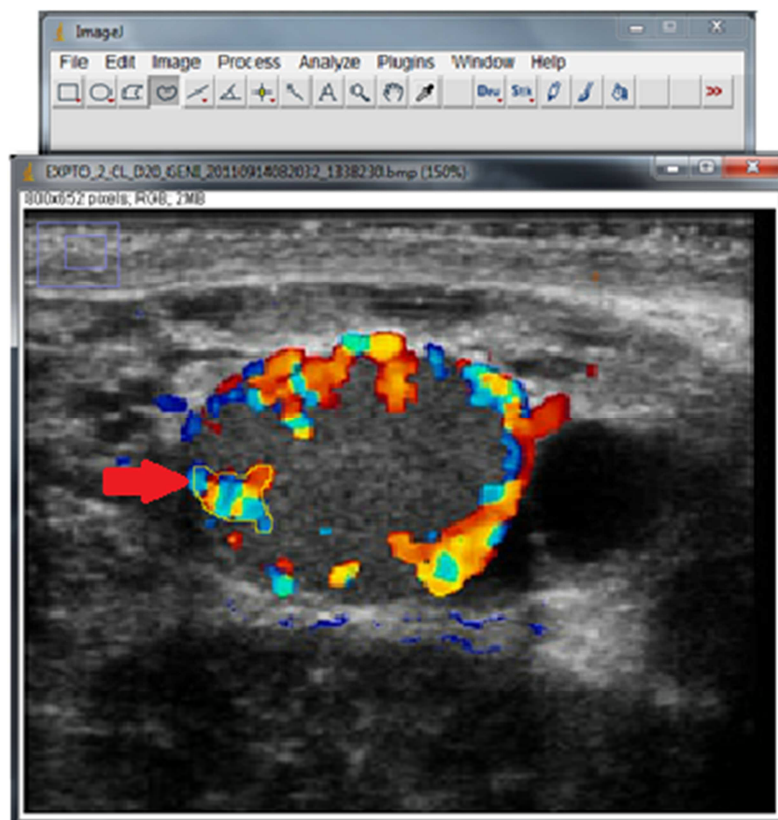


Figura 3 – Mensuração para cálculo da AV, realizada por dispositivo (contorno amarelo – seta vermelha) do programa ImageJ.

3.4.4 AVALIAÇÃO HORMONAL

A atividade luteal foi confirmada pela concentração plasmática de progesterona (CPP). Amostras de sangue foram obtidas por meio de punção da artéria coccígea, utilizando-se tubos vacuolizados com solução anticoagulante (EDTA), em todos os dias em que ocorriam os exames ultrassonográficos. Após a colheita, as amostras foram centrifugadas a 480G por 15 minutos. O plasma obtido foi rotulado e armazenado a -20°C até sua análise e em tubetes plásticos (Figura 5).

As análises foram realizadas pela técnica do radioimunoensaio, utilizando-se o método do duplo anticorpo, descrito originalmente por Niswender et al. (1968) e modificado por Belanger et al. (1980), no Laboratório de Endocrinologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP campus de Botucatu – SP (matrícula CNEN 14542).

3.4.5 ANÁLISES DOS DADOS

Os valores de ACL, CCL, ATL, AV, PV e CPP entre o D12 e D20 foram comparados entre animais posteriormente classificados como gestantes ou não gestantes por análise de variância, e diferenças entre os grupos determinadas pelo teste F. Os resultados são apresentados como média±EPM (Tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do Software SAEG 9.0 (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas), desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa (EUCLIDES, 1982).

3.5 RESULTADOS

Dentre os animais que apresentavam CL no dia da primeira avaliação, 62,7% (59/94) tiveram ovulações de ovário direito e 37,2 % (35/94) de esquerdo. Foram encontrados 42,5% (40/94) de CL cavitários e a taxa de gestação foi 51,1% (48/94).

Não houve efeito de dia nas variáveis ACL, CCL, ATL, AV, PV e CPP de animais posteriormente diagnosticados como gestantes ($P>0,05$). Nos animais não gestantes, houve redução ($P<0,01$) nos parâmetros luteais até o D20.

Houve diferença significativa entre gestantes e não gestantes, em relação à ACL (Tabela 1) no D20 ($3,54\pm 0,13$ vs. $2,66\pm 0,20$ cm², $P<0,05$). Não houve diferença ($P<0,05$) nas medidas de CCL entre gestantes e não gestantes (Tabela 2). A ATL (Tabela 3) de gestantes foi maior significativamente que em não gestantes a partir do D18 ($3,62\pm 0,13$ vs. $3,22\pm 0,16$ cm², $P<0,05$).

A AV (Tabela 4) foi diferente entre gestantes e não gestantes a partir do D16 ($0,66\pm 0,04$ vs. $0,44\pm 0,04$ cm², respectivamente, $P<0,05$). Em relação a PV (Tabela 5), houve diferença entre gestantes e não gestantes a partir do D16 ($18,88\pm 1,12$ vs. $11,67\pm 0,83\%$, respectivamente, $P<0,05$). As medidas realizadas com Doppler colorido (AV e PV) apresentarem CVs >50%.

A CPP (Tabela 6) diferiu entre gestantes e não gestantes a partir do D18 ($6,47\pm 0,26$ vs. $3,94 \pm 0,43$ ng/mL, respectivamente, $P<0,05$).

TABELA 1: Área total do corpo lúteo (ACL, cm²) em animais posteriormente diagnosticados como gestantes ou não gestantes.

	Gestantes	Não gestantes
Dia 12	4,09±0,21 a	4,13±0,27 a
Dia 14	3,90±0,18 a	4,16±0,25 a
Dia 16	3,74±0,17 a	4,05±0,21 a
Dia 18	3,70±0,14 a	3,49±0,21 a
Dia 20	3,54±0,13 a	2,66±0,20 b

^{a,b} Médias seguidas de letras semelhantes, na mesma linha, não diferem (P>0,05).

TABELA 2: Área da cavidade luteal (CCL, cm²) em animais posteriormente diagnosticados como gestantes ou não gestantes.

	Gestantes	Não gestantes
Dia 12	0,78±0,23 a	1,06±0,32 a
Dia 14	0,53±0,15 a	1,03±0,32 a
Dia 16	0,55±0,17 a	1,20±0,28 a
Dia 18	0,65±0,16 a	1,56±0,31 a
Dia 20	0,65±0,15 a	1,72±0,29 a

^{a,b} Médias seguidas de letras semelhantes, na mesma linha, não diferem (P>0,05).

TABELA 3: Área de tecido luteal (ATL, área do CL menos área da cavidade, cm²) em animais posteriormente diagnosticados como gestantes ou não gestantes.

	Gestantes	Não gestantes
Dia 12	3,83±0,16 a	3,65±0,15 a
Dia 14	3,75±0,16 a	3,76±0,14 a
Dia 16	3,65±0,15 a	3,77±0,15 a
Dia 18	3,62±0,13 a	3,22±0,16 b
Dia 20	3,48±0,13 a	2,43±0,16 b

^{a,b} Médias seguidas de letras semelhantes, na mesma linha, não diferem (P>0,05).

TABELA 4: Área do sinal Doppler (AV, cm²) no corpo lúteo em animais posteriormente diagnosticados como gestantes ou não gestantes.

	Gestantes	Não gestantes
Dia 12	0,54±0,07 a	0,47±0,05 a
Dia 14	0,52±0,05 a	0,51±0,04 a
Dia 16	0,66±0,04 a	0,44±0,04 b
Dia 18	0,69±0,04 a	0,36±0,04 b
Dia 20	0,73±0,04 a	0,21±0,03 b

^{a,b} Médias seguidas de letras semelhantes, na mesma linha, não diferem (P>0,05).

TABELA 5: Proporção entre área do sinal doppler e área de tecido luteal (PV,%) em animais posteriormente diagnosticados como gestantes ou não gestantes.

	Gestantes	Não gestantes
Dia 12	14,89±1,82 a	12,70±1,11 a
Dia 14	14,50±1,30 a	13,21±0,97 a
Dia 16	18,88±1,12 a	11,67±0,83 b
Dia 18	19,37±1,18 a	10,43±0,88 b
Dia 20	20,83±1,11 a	7,51±0,90 b

^{a,b} Médias seguidas de letras semelhantes, na mesma linha, não diferem (P>0,05).

TABELA 6: Concentração plasmática de progesterona (CCP, mL) em animais posteriormente diagnosticados como gestantes ou não gestantes.

	Gestantes	Não gestantes
Dia 12	5,44±0,26 a	5,45±0,34 a
Dia 14	6,73±0,24 a	6,49±0,35 a
Dia 16	5,77±0,21 a	5,48±0,33 a
Dia 18	6,47±0,26 a	3,94±0,43 b
Dia 20	5,77±0,28 a	2,48±0,42 b

^{a,b} Médias seguidas de letras semelhantes, na mesma linha, não diferem ($P>0,05$).

3.6 DISCUSSÃO

As ovulações de ovário direito (62,7%) e esquerdo (37,2%) foi semelhante ao relatado por Viana et al. (1998), avaliando novilhas mestiças holandês-zebu, ovários direito, 64,35% e esquerdo 35,64% e Siqueira et al. (2009) em novilhas mestiças *Bos taurus* x *Bos indicus*, 66% em ovários direitos e 34% em esquerdos. Viana et al. (1999), também relataram, avaliando vacas Gir, que o CL estava presente no ovário direito em 57,14% dos casos e no esquerdo em 42,86%. Estes dados corroboram com os relatos de maior frequência de ovulações no ovário direito (PIERSON; GINTHER, 1987). A ocorrência de maiores ovulações no ovário direito em relação ao esquerdo é um fenômeno conhecido em bovinos, porém não completamente elucidado (SIQUEIRA, 2007).

A presença de CL cavitários (42,5%) foi inferior a relatada por Kastelic et al. (1990b) em novilhas da raça Holandes (79%). Viana et al (1999) registraram valores de 37,14% em vacas Gir. Estudos realizados em diferentes raças e estádios reprodutivos concordam quanto à pouca significância funcional da presença de cavidades luteais (PIERSON; GINTHER, 1988; KASTELIC et al., 1990b; TOM et al., 1998).

A taxa de gestação (51,1%) foi semelhante ao descrito por Sá Filho et al. (2009), que obtiveram taxa de gestação média de 49,6% em vacas zebuínas. Semelhante também a descrita por Ereno (2003), em vacas Nelore (51,3%) e Ereno et al. (2007), em vacas mestiças Red AngusXNelore (50,6%). Inferior ao relatado por Day et al. (2000) em um estudo de campo em vacas leiteiras na nova Zelândia (61,7%) e superior ao relatado por Silva Neto et al. (2007) utilizando vacas holandesas (18,9%). A taxa de gestação se encontra na faixa usual relatada no Brasil, mostrando a eficiência da IATF neste estudo.

O fato das variáveis reduzirem ($P<0,01$) nos parâmetros luteais em animais não gestandes foi decorrente da luteólise. Ela caracteriza-se por mudanças funcionais e estruturais das células esteroideogênicas e não esteroideogênicas do CL, levando a uma gradual involução do mesmo (SKARZYNSKI et al., 2008), resultando

em sua destruição funcional e estrutural (NISWENDER et al., 2000). Em contraste com o observado em animais gestantes, onde não houve efeito do dia ($P < 0,05$), pois com o estado de gravidez, em que há presença de fluxo sanguíneo estável para a secreção de P4 e manutenção da gestação (SHIRASUNA et al., 2012). Por não haver a luteólise, as variáveis não regrediram em animais gestantes.

O tamanho do CL de gestantes (D12 - $4,09 \pm 0,21$ a D20 - $3,54 \pm 0,13$ cm²) e não gestantes (D12 - $4,13 \pm 0,27$ a D18 - $3,49 \pm 0,21$ cm²) foi superior ao descrito por Viana et al. (1998) em mestiças Holandês-Zebu ($2,66$ cm²), aos 7 dias pós o estro. Essa diferença provavelmente é decorrente da mensuração mais tardia realizada neste estudo, onde houve mais tempo de crescimento de CL e pelo fato dos autores terem avaliado somente novilhas. Entretanto, o tamanho no D20 de animais não gestante ($2,66 \pm 0,20$ cm²) foi semelhante ao relatado pelos autores, pelo fato de já está ocorrendo a luteólise e com isso diminuição do CL.

Já o tamanho do CL entre D12 de animais gestantes ($4,09 \pm 0,21$ cm²) e não gestantes ($4,13 \pm 0,27$ cm²) ao D20 de gestantes ($3,54 \pm 0,13$ cm²) e D18 de animais não gestantes ($3,49 \pm 0,21$ cm²) foi superior ao tamanho médio relatados por Viana et al. (1999) em vacas Gir ($3,21$ cm²) entre os dias 7 e 16. O fato do tamanho menor do CL em raças zebuínas (FIGUEIREDO et al., 1997; MARQUES, 2002) pode explicar essa diferença. Entretanto, inferior ao relatado pelos autores quando comparado ao D20 de não gestantes ($2,66 \pm 0,20$ cm²). Tal fato pode ser explicado devido ao início da luteólise, desencadeando a regressão do tecido luteal.

O fato de não haver diferença ($P < 0,05$) nas medidas de CCL (Tabela 2) entre gestantes e não gestantes confirma o relatado na literatura, sobre a pouca significância funcional da presença de cavidades luteais (PIERSON; GINTHER, 1988; KASTELIC et al., 1990b; TOM et al., 1998).

A ATL (Tabela 3) em gestantes foi maior significativamente do que em não gestante aos 18 dias pós IATF. Kastelic et al. (1989) registraram esta diferença em novilhas gestantes e não gestantes, da raça Holandes, a partir do D10-D12. Viana et al. (1998) afirmaram que área de tecido luteal, 7 dias pós estro em novilhas mestiças Holandes-zebu, foi maior em animais posteriormente constatados como gestantes, quando comparados aos que permaneceram não gestantes. O fato de este estudo ter utilizado novilhas e vacas, diferente desses autores que utilizaram somente novilhas, pode ser um dos fatores para explicar essa diferença.

Não foi observado o aumento agudo na perfusão sanguínea luteal por volta do dia 17-18 (Tabela 4 e 5), decorrente da liberação de PGF₂ α endócrina, como descrito por Acosta et al. (2002) e Miyamoto et al. (2005). Esse aumento agudo não foi observado neste estudo, provavelmente pelo intervalo de 48 horas entre os exames ultrassonográficos.

A PV (Tabela 5) seria uma medida mais confiável para avaliar a vascularização, visto que é a quantidade (%) de vascularização que existe no tecido luteal. A variável em questão mostrou-se significativamente diferente no mesmo dia (D16) em que a AV, mostrando-se também como um método eficiente para avaliar o fluxo sanguíneo luteal. Essa variável não foi analisada em outros estudos.

A regressão ATL ocorreu no mesmo dia da CPP (D18), diferente do relatado por Kastelic et al. (1990a), que estudando vacas e novilhas em diferentes estados reprodutivos, constatou que a regressão da área luteal acontece mais lentamente do que a concentração plasmática de P4. Siqueira et al. (2009) também constaram que a área de tecido luteal regredia a uma taxa mais lenta em comparação com a CPP. De fato a regressão funcional ocorre mais rápido que a estrutural (KASTELIC et al., 1990a; SIQUEIRA et al., 2009) e após o início da luteólise, o declínio da P4 sistêmica não ocorrer devido a regressão das células luteais e sim pela diminuição do fluxo sanguíneo para o CL que afeta a capacidade esteroidogênica das células luteais (SIQUEIRA et al., 2009). A regressão (estrutural) física, no entanto, é caracterizado por evidência histológica de degradação de tecidos (PATE, 1994) através de um processo complexo de morte celular e remodelação do tecido (JUENGEL et al., 1994), que provavelmente necessita de mais tempo para ocorrer do que a diminuição no fluxo de sangue, resultando em diferença temporal entre a luteólise funcional e estrutural (SIQUEIRA et al., 2009). O fato dos exames serem realizado a cada 48 horas nesse estudo pode ter causado essa diferença com a literatura, visto que a CPP poderia ter reduzido significativamente no D17.

Apesar das medidas realizadas com Doppler colorido, AV e PV (Tabela 4 e 5), apresentarem elevados CVs (>50%), elas apresentaram diferenças significativas entre animais gestantes e não gestantes mais cedo em relação a ATL (diferenças a partir de D18), a CPP (D18) e ACL (D20). A estreita relação entre fluxo sanguíneo luteal e a P4 enfatiza que um suprimento sanguíneo elevado para o CL, representa uma condição importante para a secreção de P4 (HERZOG et al., 2010). Sabe-se

que o fluxo sanguíneo está diretamente relacionado com a produção de P4 (WILTBANK, 1994) e que a regressão funcional precede a regressão morfológica (KASTELIC et al., 1990a), ou seja, durante o processo de luteólise a CPP resulta em valores basais em apenas 24 horas, enquanto a regressão do tecido luteal ocorre mais lentamente. Essa queda inicial de P4 no sangue não ocorre devido à perda de células esteroidogênicas, mas sim pelo decréscimo no fluxo sanguíneo diminuindo a capacidade esteroidogênica de cada célula luteal individualmente (NISWENDER et al., 2000).

A diferença significativa da AV e PV a partir do D16 é um demonstrativo do início da luteólise, visualizada antes da regressão morfológica do CL. Assim, a regressão do CL, que se acreditava começar após o dia 17 (BALL; PETERS, 2006), de acordo com o presente estudo, sugere-se que se inicie no D16.

3.7 CONCLUSÃO

O uso do Doppler colorido pode resultar em diagnósticos mais precoces e mais acurados de alterações da função luteal no período de reconhecimento materno da gestação.

3.8 REFERÊNCIAS

ACOSTA, T.J.; YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v.66, p.651–658, 2002.

BALL, P.J.H.; PETERS, A.R. **Reprodução em bovinos**. 3ª edição. Roca: São Paulo, 2006. 232p.

BARBOSA, C.F.; JACOMINI, J.O.; DINIZ E.G.; SANTOS, R.M.; TAVARES, M. Inseminação artificial em tempo fixo e diagnóstico precoce de gestação em vacas leiteiras mestiças. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.1, p.79-84, 2011.

BATTOCCHIO, M.; GABAI, L.G.; MOLLO, A.; VERONESI, M.C.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. **Theriogenology**, v.51,p.1059-1069, 1998.

BELANGER, A.; CARON, S.; PICARD, V. Simultaneous radioimmunoassay of progestins, androgens and estrogens in rat tests. **Journal of Steroid Biochemistry**, v.13, p.185-190, 1980.

BORGES, Á.M. **Influência de diferentes manejos e tratamentos hormonais na dinâmica ovariana durante o ciclo estral e no anestro pós-parto de vacas gir e nelore**. Viçosa, MG, 2001. 136f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa.

BORGES, Á.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; ROCHA JÚNIOR, V.R.; CARVALHO, G.R. Desenvolvimento Luteal e Concentrações Plasmáticas de Progesterona em Vacas das Raças Gir e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.2, p.276-283, 2003.

DAY, M.L.; BURKE, C.R.; TAUFA, V.K.; DAY, A.M.; MACMILLAN, K.L. The strategic use of estradiol to enhance fertility and submission rates of progestin-based estrus synchronization programs in dairy herds. **Journal of Animal Science**, v.78, p.523-529, 2000.

ERENO, R.L. **Avaliação da taxa de prenhez em novilhas tratadas com protocolo gnrh-pgf2 α -benzoato de estradiol (gpe) e em vacas submetidas à tratamentos hormonais com progesterona associados ou não a remoção temporária de bezerros**. Botucatu, São Paulo, 2003. 73f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ERENO, R.L.; BARREIROS, T.R.R.; SENEDA, M.M.; BARUSELLI, P.S.; PEGORER, M.F.; BARROS, C.M. Taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes tratadas com progesterona associada à remoção temporária de bezerros ou aplicação de

gonadotrofina coriônica eqüina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.5, p.1288-1294, 2007.

EUCLIDES, R.F. **SAEG — Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Viçosa: UFV, Central de Processamento de Dados, 1982. 68 p.

FERREIRA, A.M., TORRES, C.A.A. Perda de peso corporal e cessação da atividade ovariana luteínica cíclica em vacas mestiças leiteiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.28, p.411-418, 1993.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, I.O.L; SOLE, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.

HERZOG, K.; BROCKHAN-LUDEMANN, M.; KASKE, M.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v 73, p. 691–697, 2010.

IMAGE J: Image Processing and Analysis in Java. Disponível em: <<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>>.

JUENGEL, J.L.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; YOUNGQUIST, R.S.; GARVERICK, H.A. Pattern of protein production by bovine corpora lutea during luteolysis and characterization of expression of two major secretory products of regressing corpora lutea. **Journal of reproduction and fertility**, v. 100, (2), p. 515–520, 1994.

KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; GINTER, O.J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1269-1278, 1990a.

KASTELIC, J.P.; CURRAN, S.; GINTHER, O.J. Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on Days 10 to 22 in heifers. **Theriogenology**, v. 31, p. 813-820 1989.

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**, v.34, p.487-498, 1990b.

LIMA, M.E.; PFEIFER, L.F.M.; SCHMITT, E.; CORRÊA, M.N.; RIBEIRO, P.R. Efeito de um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) na dinâmica morfofuncional ovariana de vacas leiteiras. XIX Congresso de Iniciação Científica/ II Mostra Científica/ XII Encontro de Pós Graduação. **Anais... Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas, 2010.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B.; WATANABE S.; HAYASHI, M.; YAMAMOTO, D.; MATSUI, M.; ACOSTA, T.J. Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p.329–339, 2005.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYSON, M.K.; MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, 80p, p. 1-29, 2000.

NISWENDER, G.; MIDGLEY, A.R.; MONROE, S.E.; REICHERT, L.E. Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with antiovine LH serum and ovine LH - I131. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v.128, p.807-811, 1968.

PATE, J.L. Cellular components involved in luteolysis. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1884-1890, 1994.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J.; Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**; 28: 929-936, 1987.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v.29, p.21-37, 1988.

SÁ FILHO, O.J.; MENEGHETTI, M.; PERES, R.; LAMB, G. VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v.72, p. 210-218, 2009.

SHIRASUNA, K.; NITTA, A.; SINEENARD, J.; SHIMIZU, T.; BOLLWEIN, H.; MIYAMOTO, A. Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, Apr 19, 2012.

SIQUEIRA, L.G.B. **Uso da análise computacional de imagens ultra-sonográficas na avaliação da função luteal em bovinos**. Viçosa, MG, 2007. 119f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

SIQUEIRA, L.G.B; TORRES, C.A.A.; AMORIMA, L.S.; SOUZA, E.D.; CAMARGO, L.S.A.; FERNANDES, C.A.C.; VIANA, J.H.M. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.115, p.18–28, 2009.

SILVA NETO, J.W.; PFEIFER, L.F.; SCHNEIDER, A.; MENEGHELLO, L.C.; DUARTE, P.; CORRÊA, M.N. Comparação da Taxa de Prenhez em Vacas Leiteiras com Diferentes Níveis de Produção Inseminadas em Tempo-Fixo ou com Observação de Cio. In: XVI Congresso de Iniciação Científica. **Anais...**, 2007, Pelotas. XVI Congresso de Iniciação Científica, 2007.

SKARZYNSKI, D. J.; FERREIRA-DIAS, G.; OKUDA, K. Regulation of Luteal Function and Corpus Luteum Regression in Cows: Hormonal Control, Immune Mechanisms and Intercellular Communication. **Reproduction in Domestic Animal**, v.43, suppl. 2, p. 57–65, 2008.

TOM, J.W.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. **Theriogenology**, v.49, p.1345- 1352, 1998.

VERONESI, M.C.; GABAI, G.; BATTOCCHIO, M.; MOLLO, A.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Ultrasonographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows. **Theriogenology**, v.58, p.61-68, 2002.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A.; Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.3, p.251-256, 1999.

VIANA, J.H.M., TORRES, C.A.A., FERNANDES, C.A.C.; FERREIRA, A.M. Avaliação ultra-sonográfica do corpo lúteo em novilhas mestiças utilizadas como receptoras de embrião. **Archive Reproduction Animal**, v.5, p.42-47, 1998.

WILTBANK, M.C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid cycle corpus luteum function. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1873-1883, 1994.

WISE, T.H.; CATON, D.; THATCHER, W.W.; BARRON, D.H.; FIELDS, M. Ovarian function during the estrous cycle of the cow: ovarian blood flow and progesterone release rate. **Journal of Animal Science**, v.2, p.627-637, 1982.

CAPÍTULO 2

**Predição de não-gestação 20 dias após a IATF pela avaliação do corpo lúteo
com Doppler colorido**

4 Cap. 2 – Predição de não-gestação 20 dias após a IATF pela avaliação do corpo lúteo com Doppler colorido

Prediction of non-pregnancy 20 days after FTAI by corpus luteum evaluation using color flow Doppler

Luiz Gustavo Bruno Siqueira¹, Alberto Mansur Ghetti^b, Vagner Sarmiento Areas³, Eliza Diniz Souza⁴, Eduardo Kenji Nunes Arashiro⁵, Luiz Sérgio de Almeida Camargo¹, Jeferson Ferreira da Fonseca¹, João Henrique Moreira Viana¹

¹Pesquisador Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG;

²Mestrando em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ;

³Mestrando em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo;

⁴Bolsista de apoio técnico da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG;

⁵Doutorando em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG;

* Autor para contato: lgbsiqueira@cnpjl.embrapa.br

4.1 RESUMO

Objetivou-se com este estudo, determinar a confiabilidade do uso de Doppler colorido para predizer animais não-gestantes 20 dias após a IATF, utilizando como único parâmetro a avaliação visual do fluxo sanguíneo no corpo lúteo (FSCL). Vacas e novilhas (n= 208) mestiças Holandês x Gir forma submetidas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Vinte dias após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (D20), os animais foram submetidos à ultrassonografia Doppler colorido para

avaliação do fluxo sanguíneo luteal, utilizando ultrassom portátil equipado com transdutor retal de 7,5 MHz (MyLab30 VetGold, Esaote, Italia). Com base unicamente na avaliação visual e subjetiva do FSCL, os animais foram classificados como 'gestantes' ou 'não gestantes'. No D30, o mesmo operador realizou o diagnóstico final de gestação (DG). O DG final foi comparado retrospectivamente com o diagnóstico baseado no FSCL e o resultado de cada animal classificado como 'correto' ou 'incorreto'. Os números de verdadeiro-positivos (VP), verdadeiro-negativos (VN), falso-positivos (FP) e falso-negativos (FN) foram inseridos em uma tabela de contingência 2x2. A sensibilidade (SEN), especificidade (ESP), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia/confiabilidade (ACC) do diagnóstico por FSCL foram calculados com as seguintes equações: $SEN=VP/(VP+FN)$; $ESP=VN/(FP+VN)$; $VPP=VP/(VP+FP)$; $VPN=VN/(FN+VN)$; e $ACC=(VP+VN)/n$ total. Variáveis binomiais (taxa de gestação e proporções) foram analisadas pelo teste qui-quadrado. Os parâmetros de desempenho do diagnóstico baseado no FSCL foram: SEN=97,1%; ESP=51,9%; VPP=66,9%; VPN=94,7%; e ACC=74,5%. A proporção de FP foi 24,0% (50/208) e a de FN foi 1,4% (3/208). Conclui-se que a avaliação visual do FSCL 20 dias após a IATF pode ser utilizada na identificação de animais não-gestantes para re-sincronização.

Palavras-chave: Diagnóstico de gestação precoce. especificidade. valor preditivo negativo. bovinos.

4.2 ABSTRACT

The aim of this study was to determine the accuracy of color flow Doppler on the prediction of non-pregnant animals 20 days after timed artificial insemination (TAI), using corpus luteum blood flow (CLBF) visual evaluation as the only parameter. Crossbred Holstein X Gyr lactating dairy cows and heifers (n=208) were synchronized for TAI using the following protocol: D -10 intravaginal implant (1.0 g progesterone, Sincrogest, Ourofino, Brasil) and 2 mg im estradiol benzoate treatment (Sincrodiol, Ourofino); D -2 implant removal and treatment with 0.5 mg im sodium cloprostenol (Sincrocio, Ourofino); D -1 treatment with 1

mg im estradiol benzoate; D0 – FTAI. Twenty days after FTAI (D20), animals were submitted to B-mode ultrasonography to locate the CL and color flow Doppler to evaluate luteal blood flow, using a portable ultrasound machine equipped with a 7.5 MHz rectal transducer (MyLab30 VetGold, Esaote, Italia). After Doppler mode activation, the operator visually evaluated the blood flow on the entire CL surface, from one side to the other. Based only on visual, subjective CLBF evaluation, animals were classified as ‘pregnant’ or ‘not pregnant’. Thirty days after AI (D30), blinded from any information of the previous diagnosis (based on CLBF), the same operator performed a final pregnancy diagnosis (PD) using B-mode ultrasonography to visualize the fetal heart beat. The final pregnancy outcome (D30) was retrospectively compared to the diagnosis based on CLBF (D20) and the result of each animal was classified either as ‘correct’ or ‘incorrect’. Numbers of true positive (TP), true negative (TN), false positive (FP), and false negative (FN) were inserted into a 2x2 contingency table. Sensitivity (SEN), specificity (SPEC), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and accuracy (Acc) of the diagnosis based on CLBF were calculated using the following equations: $SEN=TP/(TP+FN)$; $SPEC=TN/(FP+TN)$; $PPV=TP/(TP+FP)$; $NPV=TN/(FN+TN)$; and $Acc=(TP+TN)/total\ n$. Binomial variables (pregnancy rate and proportions) were analyzed using the chi-square test. The performance parameters of the diagnosis based on CLBF were: $SEN=97.1\%$; $SPEC=51.9\%$; $PPV=66.9\%$; $NPV=94.7\%$; and $Acc=74.5\%$. The proportion of false positive was 24.0% (50/208) and false negatives represented 1.4% (3/208). Considering that the primary objective of early PD is to identify non-pregnant animals to be re-synchronized, the conclusion is that visual evaluation of CLBF 20 days after FTAI is reliable for that purpose, due to its low proportion of false negative and high NPV.

Keywords: Early diagnosis pregnancy. specificity. negative predictive value. cattle.

4.3 INTRODUÇÃO

O diagnóstico precoce da gestação torna-se aconselhável quando protocolos para sincronização do estro com inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e transferência de embriões são utilizados. Nestes casos, os animais não prenhes podem ser alocados em novo protocolo de sincronização mais rapidamente, o que pode desempenhar uma função chave numa estratégia de manejo reprodutivo para operações comerciais com o rebanho bovino (GRADELA et al., 2009).

Os benefícios econômicos do diagnóstico de gestação (DG) dependem de vários fatores como: o período em que o diagnóstico é realizado após inseminação, a acurácia do diagnóstico, seu efeito na mortalidade embrionária, a eficiência da detecção do estro e as medidas adotadas quando as vacas são encontradas vazias (DE VRIES et al., 2005).

A técnica da ultrassonografia vem se destacando como um dos métodos mais esclarecedores e revolucionários para avaliar a dinâmica ovariana e realizar o diagnóstico precoce de gestação (BARROS; VISINTIN, 2001). Diversos autores avaliaram a acurácia e a precocidade do DG em vacas e em novilhas avaliando imagens untrassonográficas do útero (KASTELIC et al., 1989; PIETERSE et al., 1990; SZENCI et al., 1998; NATION et al., 2003). Entretanto, relatos de DG baseados na avaliação da imagem CL não foram feitos.

A dia para realização da ultrassonografia tem sido objeto de estudo (KASTELIC et al., 1989; BADTRAM et al., 1991; SZENCI et al., 1995; NATION et al., 2003), entretanto sem um consenso. Sabe-se que a acurácia do exame é comprometida se os exames são realizados muito precocemente (KASTELIC et al., 1989; BADTRAM et al., 1991; NATION et al., 2003) e, embora melhores resultados tenham sido observados após o dia 25 pós-IA (PIETERSE et al., 1990; FRICKE, 2002), foi descrito que diagnósticos realizados antes do dia 30 eram precoces e pouco confiáveis, devido ao risco de perdas embrionárias (NATION et al. 2003).

Quando o tempo para re-inseminação é reduzido, o desempenho reprodutivo do rebanho é melhorado (OLTENACU et al., 1990). Porém o diagnóstico precoce da gestação pode diminuir a precisão do diagnóstico resultando em conclusões erradas (DE VRIES et al., 2005), fazendo com que fêmeas incorretamente classificadas como não gestantes possam receber PGF2 α , levando ao aborto (ROMANO et al., 2006).

Objetivou-se com este estudo, determinar a confiabilidade do uso de Doppler colorido para prever animais não-gestantes 20 dias após a IATF, utilizando como único parâmetro a avaliação visual do fluxo sanguíneo no corpo lúteo (FSCL).

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 LOCAL E ANIMAIS

O experimento foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) gado de leite, em Coronel Pacheco – MG.

Foram utilizados 208 animais (vacas e novilhas) mestiços de Holandês X Gir. Estas foram inseminadas em tempo fixo, em duas repetições (R1, n=98; R2, n=110). Os animais ficavam em regime de pasto.

4.4.2 PROTOCOLO DE IATF

Os animais foram inseminados artificialmente em tempo fixo com o seguinte protocolo (Figura 1): D-10 implante vaginal de 1,0g progesterona² (P4) (Sincrogest[®]) e aplicação de 2mg, intramuscular (IM), de benzoato de estradiol (BE, Sincrodiol[®]); D-2 retirada do implante e aplicação de 0,5mg, IM, de cloprostenol sódico (Sincrocio[®]); D-1 aplicação de 1mg, IM, BE; D0 Inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

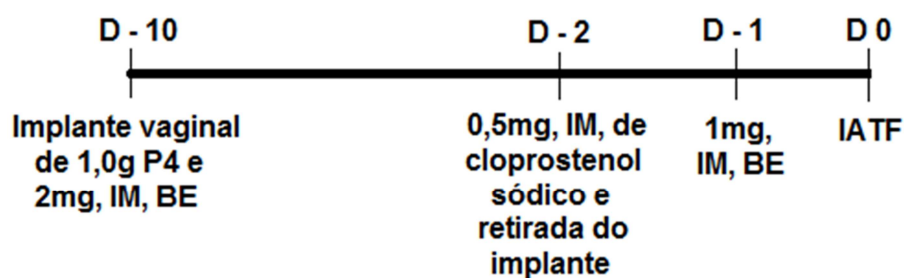


Figura 1 – Protocolo de IATF utilizado.

² Ourofino, SP, Brasil.

4.4.3 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

Vinte dias após a IATF (D20), os animais foram submetidos à ultrassonografia modo-B para localização do corpo lúteo (CL) e Doppler colorido para avaliação do fluxo sanguíneo luteal, utilizando ultrassom portátil equipado com transdutor retal de 7,5 MHz (MyLab30 VetGold, Esaote, Italia). Os animais que não apresentavam CL foram excluídos do estudo.

Ativado o modo Doppler, o fluxo sanguíneo foi visualmente avaliado por toda a superfície do CL pelo operador. Com base unicamente na avaliação visual e subjetiva do FSCL, os animais foram classificados como 'gestantes' ou 'não gestantes' (Figura 2 e 3).

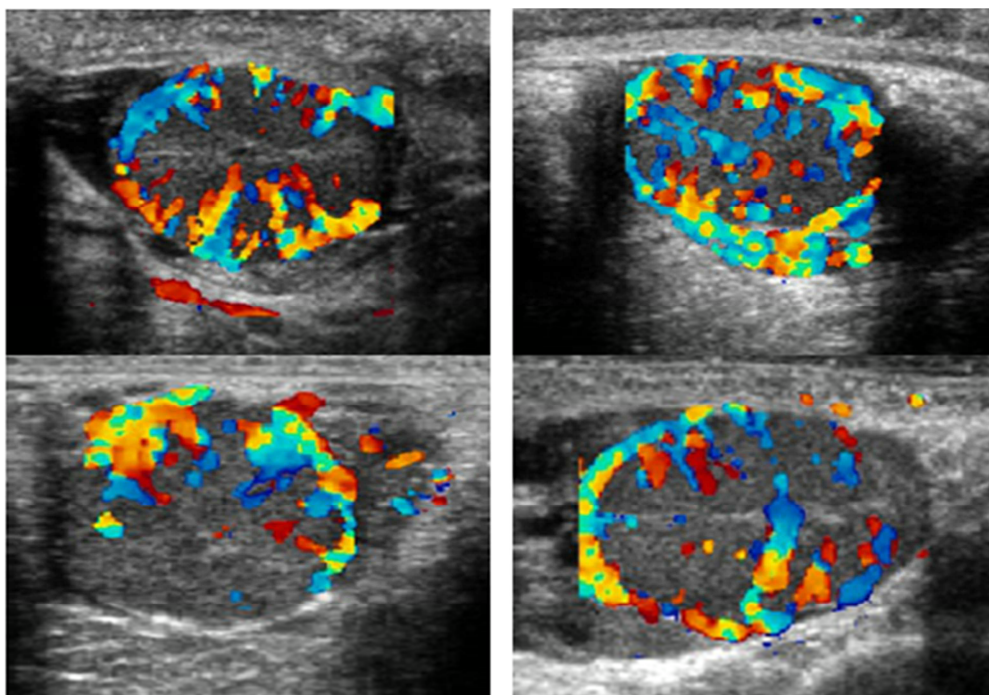


Figura 2 – Imagens do CL no modo Doppler, com visualização de grandes áreas de fluxo sanguíneo (áreas coloridas) e classificação de gestante.

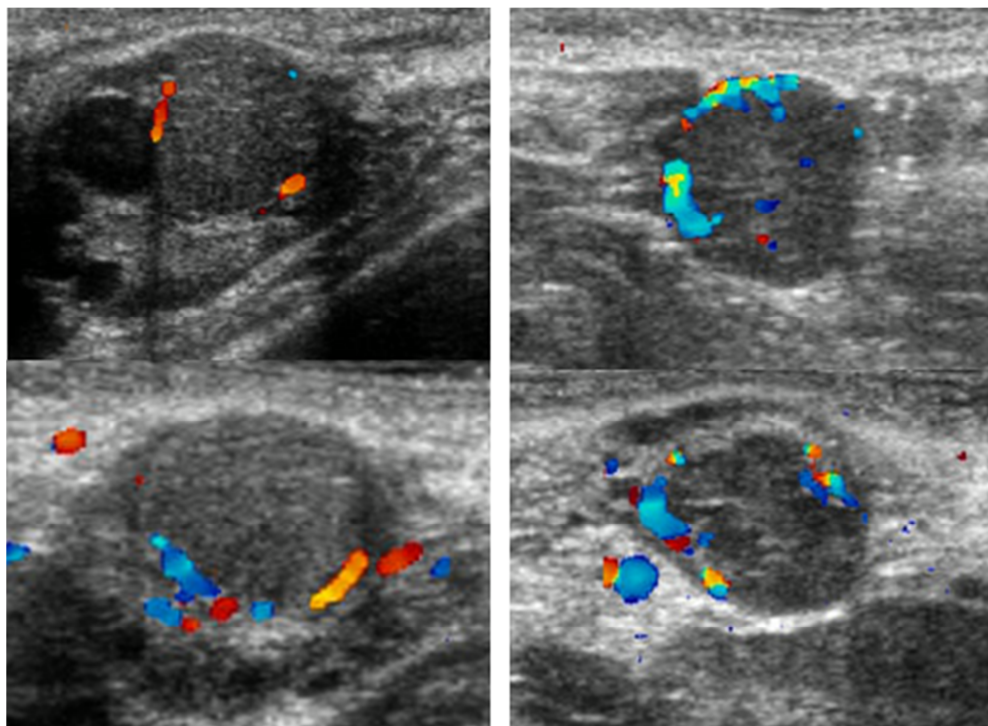


Figura 3 – Imagens do CL no modo Doppler, com visualização de pequenas áreas de fluxo sanguíneo (áreas coloridas) e classificação de não gestante

No D30, sem acesso a informações do diagnóstico anterior (baseado no FSCL), o mesmo operador realizou o DG final, utilizando ultrassonografia modo-B para visualização do batimento cardíaco fetal. O DG final (D30) foi comparado retrospectivamente com o diagnóstico baseado no FSCL (D20) e o resultado de cada animal classificado como ‘correto’ ou ‘incorreto’.

4.4.4 ANÁLISE DOS DADOS

Precisão ou Acc é o grau em que uma medição (diagnóstico de gestação) representa o valor do atributo a ser medido (vaca estar verdadeiramente não gestante ou gestante). Ela pode ser expressa através da SES e ESP, e através de VPP e VPN. A ESP é a probabilidade de que uma vaca é diagnosticada a ser não gestante, uma vez que a vaca é verdadeiramente não gestante. Esta é também conhecida como a taxa de VN. A SEN é a probabilidade de que o diagnóstico é gestante, dado que a vaca é verdadeiramente gestante. Esta também é conhecida como taxa de VP. O VPN é a probabilidade que a vaca tem de ser verdadeiramente

não gestante, se o diagnóstico é de não gestante. VPP é a probabilidade de que a vaca seja realmente gestante, se o diagnóstico é gestante (DE VRIES et al., 2005).

Os números de verdadeiro-positivos (VP), verdadeiro-negativos (VN), falso-positivos (FP) e falso-negativos (FN) foram inseridos em uma tabela de contingência 2x2 (Tabela 1). A sensibilidade (SEN), especificidade (ESP), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia/confiabilidade (ACC) do diagnóstico por FSCL foram calculados com as seguintes equações: $SEN=VP/(VP+FN)$; $ESP=VN/(FP+VN)$; $VPP=VP/(VP+FP)$; $VPN=VN/(FN+VN)$; e $ACC=(VP+VN)/n$ total. Variáveis binomiais (taxa de gestação e proporções) foram analisadas pelo teste qui-quadrado.

TABELA 1 – Tabela de contingência Predição da Gestação (Dia 20) vs. Diagnóstico real da gestação (Dia 30).

Predição da gestação (Dia 20)	Diagnóstico real (Dia 30)		Total
	Gestante	Não gestante	
Gestante	VP	FP	VP + FP
Não gestante	FN	VN	FN + VN
Total	VP + FN	FP + VN	N total

VP – verdadeiro positivo; FP – falso positivo; FN – falso negativo; VN – verdadeiro negativo; N – número.

4.5 RESULTADOS

A taxa de gestação total aos D30 foi 50,0% (104/208) e não foi afetada por repetição (49,0 vs. 50,9%, para R1 e R2; $P>0,05$).

Os parâmetros de desempenho do diagnóstico baseado no FSCL (Tabela 2) foram: $SEN=97,1\%$; $ESP=51,9\%$; $VPP=66,9\%$; $VPN=94,7\%$; e $ACC=74,5\%$. A proporção de FP foi 24,0% (50/208) e a de FN foi 1,4% (3/208).

TABELA 2 – Parâmetros de desempenho do diagnóstico baseado no FSCL.

Variáveis	Resultados
VP, % (n)	48.5 (101/208)
VN, % (n)	25.9 (54/208)
FP, % (n)	24,0 (50/208)
FN, % (n)	1,4 (3/208)
ACC, % (n)	74.5 (155/208)
SEN (%)	97,1
ESP (%)	51,9
VPP (%)	66,9
VPN (%)	94,7

4.6 DISCUSSÃO

A taxa de gestação (50%) foi semelhante às relatadas por Sá Filho et al., (2009) em vacas zebuínas (49,6%), Ereno (2003), em vacas Nelore (51,3%) e Ereno et al. (2007), em vacas mestiças Red AngusXNelore (50,6%). Inferior ao relatado por Day et al. (2000) em um estudo de campo em vacas leiteiras na nova Zelândia (61,7%). Já Silva Neto et al. (2007) relataram taxa inferior (18,9%) utilizando vacas holandesas. A taxa de gestação se encontra na faixa usual relatada no Brasil, mostrando a eficiência da IATF neste estudo.

Avaliou-se o CL pois sabe-se que a PGF2 α , liberada com a luteólise, é um potente vasoconstritor, por isso, reduz o fluxo sanguíneo para o CL (WEEMS et al., 2006) levando a destruição funcional do CL (SIQUEIRA, 2007). Os níveis de P4 dependem do fluxo sanguíneo ao CL, que pode ser quantificado de forma confiável por ultrassonografia Doppler transretal (ACOSTA et al., 2002).

O diagnóstico de gestação antes do D30 é considerado precoce e pouco confiável, devido ao risco de perdas embrionárias (NATION et al., 2003). Barros; Visintin (2001) afirmam que diagnósticos antes do 21º dia de gestação apresentam baixa acurácia e dificuldade na identificação da vesícula gestacional, havendo necessidade de intensa manipulação dos genitais para modificar a posição dos cornos uterinos e alcançar a eficiência nos exames. Preconiza-se neste estudo, que a análise ultrassonográfica do CL apresenta menores riscos de perda embrionária por não haver o manuseio dos cornos uterinos e sim dos ovários.

Além disso, de acordo com Perry et al. (1990), existem dificuldades na diferenciação do fluido fisiológico intraluminal uterino do estro e do proestro com o córion alantóide entre 18 e 21 dias e com isso, afirmaram que o tempo mínimo para alcançar eficiência no diagnóstico são 25 dias. Barros; Visintin (2001) também relataram haver dúvidas na interpretação das imagens em estágios muito precoces de gestação (antes de 21 dias). Eles afirmam que a interpretação foi dificultada, pois a vesícula anecóica pode ser confundida com fluidos fisiológicos ou patológicos e com estruturas como folículos, vasos sanguíneos e bexiga repleta, que juntos formam um aglomerado em espaço restrito dentro da cavidade pélvica. Essas dificuldades não são pertinentes a este estudo, pois a avaliação ultrassonográfica ocorre no CL e não no útero.

A acurácia do teste (74,5%) do presente estudo foi superior a relatada por Pieterse et al., (1990) em vacas leiteiras do dia 21 ao 25 pós IA (65%), sugerindo que a avaliação do CL é mais eficiente que a uterina. A acurácia tende a aumentar com a evolução tecnológica e melhora dos equipamentos utilizados para avaliação com o Doppler colorido. Ela foi inferior a também relatada pelos autores em vacas leiteiras com 26 a 33 dias pós IA (93%). Tal fato pode ser decorrente do diagnóstico mais tardio realizado pelos autores.

A SEN aos 20 dias (97,1%) foi semelhante à relatada por Pieterse et al. (1990) entre os dias 26 e 33 (97,7%), Nation et al. (2003) entre os dias 28 e 35 de gestação (96%). Foi superior ao relatado por Romano et al. (2006) aos 24 dias (74,5%) em vacas e em novilhas (50%) com 21 dias pós IA. Gradela et al. (2009) relatou que o ultrassom foi capaz de detectar 100% das fêmeas prenhes aos 28 dias após a inseminação. Fato também relatado por Filteau; Descôteaux (1998) após o dia 32 e Romano et al. (2003) aos 29 dias pós-estro em vacas e aos 26 dias em

novilhas. Somente Kastelic et al. (1989) usando novilhas em condições experimentais ideais e usando o tempo da ovulação como o dia 0, atingiu 100% de sensibilidade entre os dias 20 e 22.

A ESP aos 20 dias (51,9%) foi inferior à relatada por Gradela et al. (2009) aos 28 dias pós IA (100%). Foi inferior também à relatada por Pieterse et al. (1990), entre os dias 21 e 25 (82,3%) e entre 26 e 33 dias (87,8%) depois da IA e a relatada por Romano (2004) aos 24 dias pós IA (95,6%). Tal fato pode ser decorrente da diferença de dias entre os diagnósticos. Segundo Pieterse et al. (1990), a morte embrionário precoce faz uma especificidade de 100% impossível, especialmente quando o diagnóstico de gestação é realizada numa fase precoce da gestação.

O VPP (66,9%) foi semelhante ao descrito por Pieterse et al. (1990) em vacas com 21 a 25 dias pós IA (68,4%), porém inferior ao relatado pelos mesmos autores com vacas com 26 a 33 dias pós IA (89,6%). Também foi inferior ao relatado por Romano (2004) em vacas leiteiras (89,1%) aos 24 dias pós IA. Tal fato pode ser decorrente da diferença de dias entre os diagnósticos. Entretanto, Romano (2004) relatou um VPP superior com apenas 21 dias pós IA em novilhas leiteiras (86,7%). O autor afirma que diferenças nas características uterinas, bem como na posição uterina são, provavelmente, os fatores que permitem um diagnóstico anterior em novilhas.

O VPN (94,7%) foi superior ao descrito por Pieterse et al. (1990) em vacas com 21 a 25 dias pós IA (63,6%), mostrando que a avaliação do CL é mais eficiente que a tradicional avaliação uterina para a detecção dos animais não gestantes. Porém o VPN foi inferior ao relatado pelos mesmos autores com vacas com 26 a 33 dias pós IA (97,2%). Romano (2004) afirma que o VPN melhora quando se aumenta o tempo para realizar o diagnóstico.

Os resultados FP (24%) foram superiores aos relatados por ROMANO (2004) para vacas e novilhas (0,06%). De acordo com Romano et al. (2006), FP são devido a erros de diagnóstico ou mortalidade embrionária. A persistência de FP durante os estágios iniciais da prenhez pode explicar porque a ESP e o VPP nunca atingem 100%. Portanto, no momento do exame deste estudo, o animal poderia estar gestante e após essa data pode ter ocorrido morte embrionária.

A taxa de FN (1,4%) foi inferior às descritas por Hanzen; Delsaux (1987) antes de 30 dias após a IA (22%) e por Szenci et al (1998) em vacas leiteiras (25%), usando como critério de diagnóstico o batimento cardíaco fetal aos 26 dias pós IA. Superior ao relatado por Romano (2004) em vacas com 28 dias pós IA (0,3%) e em novilhas com 25 dias pós IA (1,16%). É importante que as vacas que forem diagnosticadas não gestantes sejam verdadeiramente não gestantes (FRICKE, 2002). Caso contrário, as vacas que são verdadeiramente gestantes, mas falsamente diagnosticadas como não gestantes, iriam ser abortadas se a PGF 2α fosse aplicada, uma prática que é comum (DE VRIES et al., 2005).

Portanto, o VPN e a SEN devem ser próximos de 100% (DE VRIES et al., 2005). Quanto mais longe a SEN e o VPN estiverem de 100%, maior a possibilidade de diagnosticar incorretamente animais gestantes como não gestantes (Falso Negativo) (ROMANO, 2004). Assim, para aumentar a precisão do diagnóstico precoce de não gestação, um procedimento com alto VPN que minimiza os FN é necessário (ROMANO et al., 2006).

4.7 CONCLUSÃO

A avaliação visual do FSCL 20 dias após a IATF pode ser utilizada para o DG precoce e identificação de animais não-gestantes para re-sincronização.

4.8 REFERÊNCIAS

ACOSTA, T.J.; YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 651–658, 2002.

BADTRAM, G.A.; GAINES, J.D.; THOMAS, C.B.; BOSU, W.T.K. Factors influencing the accuracy of early pregnancy detection in cattle by real-time ultrasound scanning of the uterus. **Theriogenology**, v. 35, p. 1153-1167, 1991.

BARROS, B.J.P.; VISINTIN, J.A. Controle ultra-sonográfico de gestações, de mortalidades embrionárias e fetais e do sexo de fetos bovinos zebuínos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 38, n. 2, p. 74-79, 2001.

DAY, M.L.; BURKE, C.R.; TAUFA, V.K.; DAY, A.M.; MACMILLAN, K.L. The strategic use of estradiol to enhance fertility and submission rates of progestin-based estrus synchronization programs in dairy herds. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 523-529, 2000.

DE VRIES, A.; BARTOLOME, J.; BROADDUS, B. What is Early Pregnancy Diagnosis Worth? **Proceedings 2nd Florida Dairy Road Show**, p. 31-40, 2005.

ERENO, R.L. **Avaliação da taxa de prenhez em novilhas tratadas com protocolo gnrh-pgf2 α -benzoato de estradiol (gpe) e em vacas submetidas à tratamentos hormonais com progesterona associados ou não a remoção temporária de bezerros**. Botucatu, São Paulo, 2003. 73f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ERENO, R.L.; BARREIROS, T.R.R.; SENEDA, M.M.; BARUSELLI., P.S.; PEGORER, M.F.; BARROS, C.M. Taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes tratadas com progesterona associada à remoção temporária de bezerros ou aplicação de gonadotrofina coriônica eqüina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n.5, p. 1288-1294, 2007.

FILTEAU, V.; DESCÔTEAUX, L. Predictive values of early pregnancy diagnosis by ultrasonography in dairy cattle. **Bovine Proctologist**, v. 31, p. 170–171, 1998.

FRICKE, P.M. Scanning the future – ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1918-1926, 2002.

GRADELA, A.; DANIELI, T.; CARNEIRO, T.; TORRES D.V.; GRADELA, C.R.; FRANZO, V.S. Exatidão da ultra-sonografia para diagnóstico de gestação aos 28 dias após inseminação e sua contribuição na eficiência reprodutiva em fêmeas

Nelore e cruzadas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 104, n. 569-572, p. 31-35, 2009.

HANZEN, C.; DELSAUX, B. Use of transrectal B-mode ultrasound imaging in bovine pregnancy diagnosis. **Veterinary Record** 1987;121:200-2.

KASTELIC, J.P.; CURRAN, S.; GINTHER, O.J. Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on Days 10 to 22 in heifers. **Theriogenology**, v. 31, p. 813-820 1989.

NATION, D.P.; MALMO, J.; DAVIS, G.M.; MACMILLAN, K.L. Accuracy of bovine pregnancy detection using transrectal ultrasonography at 28 to 35 days after insemination. **Australian Veterinary Journal**. v. 81, nos 1 & 2, january,february, 2003.

OLTENACU, P.A.; FERGUSON, J.D.; LEDNOR, A.J. Economic evaluation of pregnancy diagnosis in dairy cattle: a decision analysis approach. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2826-2831, 1990.

PERRY, R.C.; BEAL, W.E.; CORAH, L.R. Monitoring uterine characteristics and pregnancy. **Agri-Practice**, v. 11, n. 6, p. 31-35, 1990.

PIERSON, R.A. Applications of diagnostic ultrasonography in embryo transfer programs. **Embryo Transfer**, v. 4, n. 2, p. 1-4, 1989.

PIETERSE, M.C.; TAVERNE, M.A.; KRUIP, T.A.; WILLEMSE, A.H. Detection of corpora lutea and follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. **Veterinary Record**, v.126, p. 552–554, 1990.

ROMANO, J.E. **Early pregnancy diagnosis and embryo/fetus mortality in cattle**. 2004. 120f. Dissertação (Doutorado). Texas A&M University.

ROMANO, J.E.; THOMPSON, J.A.; FORREST, D.W.; WESTHUSIN, M.E.; TOMASZWESKI, M.A.; KRAEMER D.C. Early pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography in dairy cattle. **Theriogenology**, v.66, p.1034-1041, 2006.

SÁ FILHO, O,J.; MENEGHETTI, M.; PERES, R.; LAMB, G. VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v.72, p. 210-218, 2009.

SILVA NETO, J.W.; PFEIFER, L.F.M.; SCHNEIDER, A.; MENEGHELLO, L.C.; DUARTE, P.; CORRÊA, M.N. Comparação da Taxa de Prenhez em Vacas Leiteiras com Diferentes Níveis de Produção Inseminadas em Tempo-Fixo ou com Observação de Cio. In: XVI Congresso de Iniciação Científica. **Anais...**, 2007, Pelotas. XVI Congresso de Iniciação Científica, 2007.

SIQUEIRA, L.G.B. **Uso da análise computacional de imagens ultra-sonográficas na avaliação da função luteal em bovinos**. 2007. 119f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

SZENCI, O.; BECKERS, J.F.; HUMBLLOT, P.; SULON, J.; SASSER, G.; TAVERNE, M.A.M.; VARGA, J.; BALTUSEN, R.; SCHEKK, G. Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. **Theriogenology**, v.50, p.77–88, 1998.

SZENCI, O.; GYULAI, G.; NAGY, P.; KOVACS, L.; VARGA, J.; TAVERNE, M.A.M. Effect of uterus position relative to the pelvic inlet on the accuracy of early bovine pregnancy diagnosis by means of ultrasonography. **Veterinary Quarterly**. v. 17, p.37–39, 1995.

WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandin and reproduction in female farm animals. **The Veterinary Journal**, v.171, p.206-228, 2006.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ultrassonografia colorida Doppler na reprodução bovina possibilita reavaliar conceitos antes considerados definitivos quanto à fisiologia da reprodução.

A avaliação da função luteal por ultrassonografia com Doppler colorido mostrou-se eficiente nas avaliações e ainda extremamente importante e vantajosa pelo fato da avaliação poder ser em tempo real.

A predição de não gestantes, mesmo não sendo 100% eficiente é importante, pois acelera o processo de re-sincronização de animais não gestantes. Mesmo que alguns animais não gestantes sejam classificados como gestantes, a posterior confirmação por palpação retal ou ultrassonografia convencional, colocaria novamente esses animais para a re-sincronização, sem gerar as grandes perdas econômicas que existiria se um animal gestante fosse classificado como não gestante e tivesse o aborto induzido.

6 REFERÊNCIAS GERAIS

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v. 82/83, p.127-140, 2004.

ACOSTA, T.J.; YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v.66, p.651–658, 2002.

BADTRAM, G.A.; GAINES, J.D.; THOMAS, C.B.; BOSU, W.T.K. Factors influencing the accuracy of early pregnancy detection in cattle by real-time ultrasound scanning of the uterus. **Theriogenology**, v. 35, p. 1153-1167, 1991.

BALL, P.J.H.; PETERS, A.R. **Reprodução em bovinos**. 3ª edição. Roca: São Paulo, 2006. 232p.

BARROS, B.J.P.; VISINTIN, J.A. Controle ultra-sonográfico de gestações, de mortalidades embrionárias e fetais e do sexo de fetos bovinos zebuínos. **Brazilian**

Journal of Veterinary Research and Animal Science. São Paulo, v. 38, n. 2, p. 74-79, 2001.

BARROS, C.M. Controle farmacológico do ciclo estral e superovulação em zebuínos de corte. In: Simpósio sobre o controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes, São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP, p. 158-189, 2000.

BARUSELLI, P.S.; AYRES, H.; SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M.; GIMENES, L.U.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: 2º Simpósio internacional de reprodução animal aplicada, 2006, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, PR, p.113-132. 2006.

BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.S.; SÁ FILHO, M.F. Atualização dos protocolos de IATF e TETF. In: 4º Simpósio internacional de reprodução animal aplicada, 2010, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, PR, p. 166-185. 2010.

BATTOCCHIO, M.; GABAI, L.G.; MOLLO, A.; VERONESI, M.C.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. **Theriogenology**. v.51,p.1059-1069, 1998.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 305-317, 2005.

BERTAN, C.M. **Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina F2 α no endométrio de fêmeas bovinas**. São Paulo, SP, 2004. 185f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

BERTAN, C.M.; BINELI, M.; MADUREIRA, E.H.; TRALDI, A.S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise-revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 824-840, 2006.

BICALHO, R.C.; GALVÃO, K.N.; GUARD, C.L.; SANTOS, J.E.P. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, p. 199-207, 2008.

BINELLI, M.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M.A.C.M.; SILVA, J.C.B.; IBIAPINA, B.T.; BISINOTTO, R.S. Conceitos e aplicações de estratégias antiluteolíticas visando o incremento da taxa de concepção em bovinos. 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina, PR. **Anais....** Londrina, PR, p.93-100. 2006.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.53-72, 2002a.

BÓ, G.A.; CUTAIA, L.; TRÍBULO, R. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Primera Parte. **Taurus**, v.14, p.10-21, 2002b.

BORGES, Á.M. **Influência de diferentes manejos e tratamentos hormonais na dinâmica ovariana durante o ciclo estral e no anestro pós-parto de vacas gir e nelore**. Viçosa, MG, 2001. 136f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa.

BORGES, Á.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; ROCHA JÚNIOR, V.R.; CARVALHO, G.R. Desenvolvimento Luteal e Concentrações Plasmáticas de Progesterona em Vacas das Raças Gir e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.2, p.276-283, 2003.

BURKE, C.R.; MACMILLAN, K.L.; BOLAND, M.P. Oestradiol potentiates a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomised cows. **Animal Reproduction Science**, v.45, n.1-2, p.13-28, 1996.

BURNS, B.M.; FORDYCE, G.R.G.; HOLROYD, R.G. A review of factors that impact on the capacity of beef cattle females to conceive, maintain a pregnancy and wean a

calf: implications for reproductive efficiency in northern Australia. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.1-22, 2010.

CHRISTENSON, L.K.; DEVOTO, L. Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.1 – 9, 2003.

DAVIS JS, RUEDA BR, BOROWISKI KS. Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. Review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.89, 2003.

DAY, M.L.; BURKE, C.R.; TAUFA, V.K.; DAY, A.M.; MACMILLAN, K.L. The strategic use of estradiol to enhance fertility and submission rates of progestin-based estrus synchronization programs in dairy herds. **Journal of Animal Science**, v.78, p.523-529, 2000.

DESCÔTEAUX, L.U.C.; CARRIÈRE, P.D.; DUROCHER, J. Ultrasonography of the reproductive system of the cow: basic Principles, practical uses and economic aspects of this diagnostic Tool in dairy production. World Buiatrics Congress. Nice, France, **Anais...** Nice, France 2006.

DE VRIES, A.; BARTOLOME, J.; BROADDUS, B. What is Early Pregnancy Diagnosis Worth? **Proceedings 2nd Florida Dairy Road Show**, p.31-40, 2005.

DUNNE, L.D.; DISKIN, M.G.; SREENAN, J. M. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.58, p.39-44, 2000.

ERENO, R.L. **Avaliação da taxa de prenhez em novilhas tratadas com protocolo gnrh-pgf2 α -benzoato de estradiol (gpe) e em vacas submetidas à tratamentos hormonais com progesterona associados ou não a remoção temporária de bezerros**. Botucatu, São Paulo, 2003. 73f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ERENO, R.L.; BARREIROS, T.R.R.; SENEDA, M.M.; BARUSELLI., P.S; PEGORER, M.F.; BARROS, C.M. Taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes tratadas com

progesterona associada à remoção temporária de bezerras ou aplicação de gonadotrofina coriônica eqüina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n.5, p. 1288-1294, 2007.

EUCLIDES, R.F. **SAEG — Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Viçosa: UFV, Central de Processamento de Dados, 1982. 68 p.

FAVIER J, CORVOL P. Physiological angiogenesis. **Therapie**, v.5, p.455-463, 2001.

FERNANDES, C.A.C.; BARROS, J.N.P. Característica do corpo lúteo e a taxa de gestação de receptoras de embrião. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**. Porto Alegre, v. 24. P. 205, 1996.

FERREIRA, A.M. **Reprodução da fêmea bovina. Fisiologia aplicada a problemas mais comuns (Causas e tratamentos)**. 1. ed., Edição do Autor: Juíz de Fora, MG. 2010. 422p.

FERREIRA, A.M., TORRES, C.A.A. Perda de peso corporal e cessação da atividade ovariana luteínica cíclica em vacas mestiças leiteiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.28, p.411-418, 1993.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, I.O.L; SOLE, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.

FILTEAU, V.; DESCÔTEAUX, L. Predictive values of early pregnancy diagnosis by ultrasonography in dairy cattle. **Bovine Proctologist**, v. 31, p. 170–171, 1998.

FONSECA, J.F.; MAFFILI, V.V. Biotecnologias da reprodução de ruminantes. In: Jornada de medicina veterinária da UNIPAR, 7, 2002, Umuarama. **Anais...** Umuarama: UNIPAR, 2002. p. 85-90.

FRICKE, P.M. Scanning the future – ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1918-1926, 2002.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; UTT, M.D.; BEG M.A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Anim Reprod Sci* 2007;99:213–20.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 1ª edição. Editora Varela, São Paulo, 2001.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª edição. Editora Roca, São Paulo, 2008.

GOTTSCHALL, C.S.; BITTENCOURT, H.R.; MATTOS, R.C.; GREGORY, R.M. Antecipação da aplicação de prostaglandina, em programa de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.4, p.970-979 out/dez, 2009.

GOTTSCHALL, C.S. CANELLAS, L.C.; MARQUES, P.R.; CRUZ, J.K.; MARTINS, P.; ALMEIDA, M.R.; BITTENCOURT, H.R. Desempenho bio-econômico de vacas de corte submetidas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em diferentes períodos pós parto. In: 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2008, Gramado, RS. **Anais...**, Gramado, RS, 2008a.

GOTTSCHALL, C.S.; MARQUES, P.R.; CANELLAS, L.C.; ALMEIDA, M.R. Aspectos relacionados à sincronização do estro e ovulação em bovinos de corte. **A Hora Veterinária**, n.164, 2008b.

GRADELA, A.; DANIELI, T.; CARNEIRO, T.; TORRES D.V.; GRADELA, C.R.; FRANZO, V.S. Exatidão da ultra-sonografia para diagnóstico de gestação aos 28 dias após inseminação e sua contribuição na eficiência reprodutiva em fêmeas Nelore e cruzadas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 104, n. 569-572, p. 31-35, 2009.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Manole: Barueri, 2004. 513p.

HERZOG, K.; BROCKHAN-LUDEMANN, M.; KASKE, M.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v 73, p. 691–697, 2010.

IMAGE J: Image Processing and Analysis in Java. Disponível em: <<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 38, p.1-65, 2010.

JORDAN, A.; HERZOG, K.; ULBRICH, S., E.; BEINDORFF, N.; HONNENS, Ä.; KRÜGER, L.; MIYAMOTO, A.; BOLLWEIN, H. Genital blood flow and endometrial gene expression during the preovulatory period after PGF2 α - induced luteolysis in different luteal phases in cows. **Journal of Reproduction and Development**, v.1, p.1 – 29, 2009.

JUENGEL, J.L.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; YOUNGQUIST, R.S.; GARVERICK, H.A. Pattern of protein production by bovine corpora lutea during luteolysis and characterization of expression of two major secretory products of regressing corpora lutea. **Journal of reproduction and fertility**, v. 100, (2), p. 515–520, 1994.

KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; GINTER, O.J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1269-1278, 1990a.

KASTELIC, J.P.; CURRAN, S.; GINTHER, O.J. Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on Days 10 to 22 in heifers. **Theriogenology**, v. 31, p. 813-820 1989.

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**, v.34, p.487-498, 1990b.

LAMB, G.C. Avaliação de protocolos de sincronização que utilizam implantes de progesterona. In: Curso novos enfoques na produção e reprodução de bovinos, 7, 2003, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: CONAPEC Jr., p.199-211, 2003.

LIMA, M.E.; PFEIFER, L.F.M.; SCHMITT, E.; CORRÊA, M.N.; RIBEIRO, P.R. Efeito de um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) na dinâmica morfofuncional ovariana de vacas leiteiras. XIX Congresso de Iniciação Científica/ II Mostra Científica/ XII Encontro de Pós Graduação. **Anais...** Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

MARQUES, M.O. **Ultra-sonografia ovariana, concentração plasmática de progesterona e taxa de concepção em novilhas receptoras de embriões submetidas a diferentes tratamentos no dia 7 do ciclo estral.** São Paulo, SP, 2002. 78f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

MARTIN, I.; FERREIRA, J. C. P. Fisiologia da ovulação e da formação do corpo lúteo bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p. 270-279, 2009.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; SASAHANA, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 159 – 169, 2009.

MOURA, C.E.B. **Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos.** São Paulo, SP, 2003. 123f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

NATION, D.P.; MALMO, J.; DAVIS, G.M.; MACMILLAN, K.L. Accuracy of bovine pregnancy detection using transrectal ultrasonography at 28 to 35 days after insemination. **Australian Veterinary Journal**. v. 81, nos 1 & 2, january,february, 2003.

NISWENDER, G.D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v. 123, p.333–339, 2002.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; MCGUIRE, W.J.; MCGUIRE, J.; BELFIORE, C.J.; WILTBANK, M.C. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.50, p.239-247, 1994.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYSON, M.K.;MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span os the corpus luteum. **Physiological Reviews**, 80p, p. 1-29, 2000.

OKUDA, K.; MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D.J. Regulation of endometrial prostaglandin F(2alpha) synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 255-264, 2002.

OLTENACU, P.A.; FERGUSON, J.D.; LEDNOR, A.J. Economic evaluation of pregnancy diagnosis in dairy cattle: a decision analysis approach. **Journal of Dairy Science**, 73, 2826-2831, 1990.

PATE, J.L. Cellular components involved in luteolysis. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1884-1890, 1994.

PEREIRA, G. J. B.; **Morte embrionária em bovinos de leite: Um estudo de caso.** Vila Real, 2009. 71f. Dissertação (Mestrado). Universidade De Trás-Os-Montes e Alto Douro.

PERRY, R.C.; BEAL, W.E.; CORAH, L.R. Monitoring uterine characteristics and pregnancy. **Agri-Practice**, v. 11, n. 6, p. 31-35, 1990.

PIERSON, R.A. Applications of diagnostic ultrasonography in embryo transfer programs. **Embryo Transfer**, v. 4, n. 2, p. 1-4, 1989.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**; 28: 929-936, 1987.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v.29, p.21-37, 1988.

PIETERSE, M.C.; TAVERNE, M.A.; KRUIP, T.A.; WILLEMSE, A.H. Detection of corpora lutea and follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. **Veterinary Record**, v. 126, p. 552–554, 1990.

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

ROMANO, J.E. **Early pregnancy diagnosis and embryo/fetus mortality in cattle**. 2004. 120f. Dissertação (Doutorado). Texas A&M University.

ROMANO, J.E.; THOMPSON, J.A.; FORREST, D.W.; WESTHUSIN, M.E.; TOMASZWESKI, M.A.; KRAEMER D.C. Early pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography in dairy cattle. **Theriogenology**, v.66, p.1034-1041, 2006.

ROMANO, J.E.; THOMPSON, J.A.; KRAEMER D.C.; WESTHUSIN, M.E.; FORREST, D.W.; TOMASZWESKI, M. A. Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: Influence on embryo/fetal viability in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 67, p. 486-493, 2007.

SÁ FILHO, O.J.; MENEGHETTI, M.; PERES, R.; LAMB, G. VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v.72, p. 210-218, 2009.

SALLES, M.G.F.; ARAÚJO, A.A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.185-194, jul./set. 2010.

SANGHA, G.K.; SHARMA, R.K.; GURAYA, S.S. Biology of corpus luteum in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.43, p.53-64, 2002.

SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C.; CERRI, R.L.A.; GALVÃO, K.N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrous synchronization programs. **Animal Reproduction Science** 82- 83: 513-535, 2004.

SARTORI, R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira. **Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.153-159, abr./jun. 2007.

SARTORI, R.; DODE, M.A.N. Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem. In: Biotecnologia da Reprodução em Bovinos: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 3, 2008, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, UEL, p.175-193, 2008.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum functions in cattle: an overview. **Reproduction in Domestic Animal**, v.39, p.241-251, 2004.

SCHAMS D, BERISHA B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.53-65, 2002.

SHIRASUNA, K.; NITTA, A.; SINEENARD, J.; SHIMIZU, T.; BOLLWEIN H.; MIYAMOTO, A. Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, Apr 19, 2012.

SILVA, A.S.; COSTA e SILVA, E.V.; NOGUEIRA, E.; ZUCCARI, C.E.S.N. Avaliação do custo/benefício da inseminação artificial convencional e em tempo fixo de fêmeas bovinas pluríparas de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.4, p. 443-455, 2007.

SILVA NETO, J.W.; PFEIFER, L.F.M.; SCHNEIDER, A.; MENEGHELLO, L.C.; DUARTE, P.; CORRÊA, M.N. Comparação da Taxa de Prenhez em Vacas Leiteiras com Diferentes Níveis de Produção Inseminadas em Tempo-Fixo ou com Observação de Cio. In: XVI Congresso de Iniciação Científica. **Anais...**, 2007, Pelotas. XVI Congresso de Iniciação Científica, 2007.

SINGH, J.; ADAM, G.P.; PIERSON, R.A. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 371–399, 2003.

SINGH, J., PIERSON, R.A., ADAMS, G.P. Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. **Journal of reproduction and fertility**, v. 109, p. 35–44, 1997.

SIQUEIRA, L.G.B. **Uso da análise computacional de imagens ultra-sonográficas na avaliação da função luteal em bovinos**. Viçosa, MG, 2007. 119f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

SIQUEIRA, L.G.B; TORRES, C.A.A.; AMORIMA, L.S.; SOUZA, E.D.; CAMARGO, L.S.A.; FERNANDES, C.A.C.; VIANA, J.H.M. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.115, p.18–28, 2009.

SKARZYNSKI, D. J.; FERREIRA-DIAS, G.; OKUDA, K. Regulation of Luteal Function and Corpus Luteum Regression in Cows: Hormonal Control, Immune Mechanisms and Intercellular Communication. **Reproduction in Domestic Animal**, v.43, suppl. 2, p. 57–65, 2008.

SMITH, M.F., MCINTUSH, E.W., SMITH, G.W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1857-1872, 1994.

SPRECHER, D.J.; NEBEL, R.L.; WHITMAN, S.S. The predictive value, sensitivity and specificity of palpation per rectum and transrectal ultrasonography for the determination of bovine luteal status. **Theriogenology**, v.31, p.1165-1172, 1989.

STOUFFER, R.L.; MARTINEZ-CHEQUER, J.C.; MOLSKNESS, T.A. Regulation and action of angiogenic factors in the ovary. **Archives of Medical Research**, v.32, p.567-575, 2001.

SZENCI, O.; GYULAI, G.; NAGY, P.; KOVACS, L.; VARGA, J.; TAVERNE, M.A.M. Effect of uterus position relative to the pelvic inlet on the accuracy of early bovine pregnancy diagnosis by means of ultrasonography. **Veterinary Quarterly**. v. 17, p.37–39, 1995.

TANIGUCHI, H.; YOKOMIZO, Y.; OKUDA, K. Fas-Fas ligand system mediates luteal cell death in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 754 – 759, 2002.

THOMPSON JA, MARSH WE, ETHERINGTON WG, MOMONT HW, KINSEL ML. Evaluation of the benefits of the timing of pregnancy testing by transrectal palpation in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 207, 1462-1465, 1995.

TOM, J.W., PIERSON, R.A., ADAMS, G.P. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. **Theriogenology**, v.49, p.1345- 1352, 1998.

VASCONCELOS, J.L.M.; SANTOS, R.M. Aplicações práticas da ultra-sonografia no manejo reprodutivo de rebanho leiteiro. **Milkpoint**, São Paulo, 17 de jan. 2006. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/reproducao/aplicacoes-praticas-da-ultrasonografia-no-manejo-reprodutivo-do-rebanho-leiteiro-27247n.aspx>>. Acesso em: 14 Jan. 2012.

VERONESI, M.C.; GABAI, G.; BATTOCCHIO, M.; MOLLO, A.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Ultrasonographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows. **Theriogenology**, v.58, p.61-68, 2002.

VIANA, J.H.M., TORRES, C.A.A., FERNANDES, C.A.C.; FERREIRA, A.M. Avaliação ultra-sonográfica do corpo lúteo em novilhas mestiças utilizadas como receptoras de embrião. **Archive Reproduction Animal**, v.5, p.42-47, 1998.

VIANA, J. H. M., FERREIRA, A.M., SÁ, W. F., CAMARGO, L. S. A. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 251-256, 1999.

VIEIRA, R. C.; FRANCO, R. V. R.; DINIZ, E. G.; JACOMINI, J. O. Relação entre a morfologia do corpo lúteo e índices de prenhez em receptoras de embriões bovinos. **Bioscience Journal**, v.18, n.2, p. 99-102, dec. 2002.

VIEIRA, R.J. Transtornos endócrinos e metabólicos na reprodução de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 286-292, abr./jun. 2011.

WATHES, D.C. Embryonic mortality and the uterine environment. **Journal Endocrinology**, v. 134, p. 321-325, 1992.

WEBB, R.; WOAD, K.J.; ARMSTRONG, D.J. Corpus luteum function: local control mechanisms. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 277-285, 2002.

WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandin and reproduction in female farm animals. **The Veterinary Journal**, v.171, p.206-228, 2006.

WILTBANK, M.C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid cycle corpus luteum function. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1873-1883, 1994.

WISE, T.H.; CATON, D.; THATCHER, W.W.; BARRON, D.H.; FIELDS, M. Ovarian function during the estrous cycle of the cow: ovarian blood flow and progesterone release rate. **Journal of Animal Science**, v.2, p.627-637, 1982.

YAN Z, NEULEN J, RACZEK S, WEICH HA, KECK C, GRUNWALD K, BRECKWOLDT M. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/ vascular permeability factor (VPF) production by luteinized human granulosa cells in vitro; a paracrine signal in corpus luteum formation. **Gynecol Endocrinol**, v.3, p.149-153, 1998.