



Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos

Use of Doppler ultrasonography in timed-AI and ET programs in cattle

Guilherme Pugliesi^{1,4}, Rômulo Germano Rezende¹, Júlio César Barboza da Silva², Everton Lopes¹, Thiago Kan Nishimura³, Pietro Sampaio Baruselli¹, Ed Hoffmann Madureira¹, Mario Binelli¹

¹Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

²Embryo SYS, Ouro Fino, Minas Gerais, Brasil.

³Departamento de Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

⁴Correspondência: gpugliesi@usp.br

Resumo

O uso intensivo da ultrassonografia Doppler em diversos estudos na última década possibilitou a caracterização da perfusão sanguínea, e estimativa da funcionalidade nos órgãos e tecidos reprodutivos ao longo do ciclo estral e da gestação em bovinos. Objetiva-se aqui discutir as possibilidades de uso da ultrassonografia Doppler, assim como explorar seu potencial de inclusão em programas reprodutivos em bovinos. Os estudos recentes em vacas de leite e corte apontam uma alta acurácia e sensibilidade quando a ultrassonografia Doppler é empregada para avaliar a funcionalidade do corpo lúteo e diagnosticar a gestação aos 20-22 dias. Diante disso, programas de ressincronização super-precoce iniciados aos 14 dias pós-inseminação foram desenvolvidos em novilhas e vacas de corte e estão sendo implementados em programas comerciais de IATF. Estas estratégias permitem uma redução para 24 dias no intervalo entre duas IATFs e podem promover ganhos na eficiência reprodutiva comparado aos sistemas convencionais com diagnóstico da gestação aos 30 dias. Além disso, a avaliação da função luteal pela ultrassonografia Doppler possibilita a seleção de receptoras de embriões com maior receptividade, e conseqüentemente pode melhorar a fertilidade em programas de TETF.

Palavras-chaves: corpo lúteo, útero, perfusão sanguínea, gestação.

Abstract

The intensive use of Doppler ultrasonography in several studies in the last decade allowed the characterization of vascular perfusion, and the estimation of the function of the reproductive organs and tissues along the estrous cycle and pregnancy in cattle. We aimed to discuss the possibility of use Doppler imaging, as to explore the potential of its inclusion in reproductive programs in cattle's industry. Recent studies in dairy and beef cows indicated a high accuracy and sensibility when Doppler ultrasonography is used to evaluate the function of corpus luteum and to diagnosis the pregnancy between days 20 and 22. Moreover, resynchronization programs starting 14 days post-TAI were developed in beef heifers and cows, and are been implemented in commercial TAI programs. These strategies allow a reduction to 24 days in the interval between two TAIs and may improve the gains in reproductive efficacy when compared to the traditional programs with pregnancy diagnosis at 30 days. In addition, the evaluation of luteal function by Doppler ultrasonography allows the selection of embryo recipients with greater receptivity, and consequently may increase the fertility in timed embryo transfer programs.

Key-words: corpus luteum, uterus, blood flow, pregnancy.

Introdução

Já na década de 80, o renomado pesquisador Dr. O.J. Ginther afirmou que desde a introdução da palpação transretal e do ensaio imunoenzimático para hormônios circulantes, o diagnóstico ultrassonográfico é o avanço tecnológico mais profundo no campo da pesquisa e da clínica reprodutiva de grandes animais (Ginther, 1986). Após 30 anos dessa afirmação, é difícil imaginar os diversos avanços e descobertas relacionadas a dinâmica ovariana, função uterina e viabilidade fetal nesse período sem o desenvolvimento da ultrassonografia. Ao longo das últimas décadas o uso da ultrassonografia alcançou grandes dimensões não somente nos centros de pesquisa mas também comercialmente em atividades pecuárias, e tem possibilitado grandes melhorias no diagnóstico clínico e na eficiência reprodutiva de rebanhos de leite e corte.

Dentre as diversas opções, a ultrassonografia convencional no modo brilho (B; escala de cinza) é a forma mais usada e que proporciona uma imagem bidimensional dos órgãos e tecidos avaliados. Assim, o uso rotineiro da ultrassonografia no modo B nas últimas décadas tem possibilitado melhor avaliação de matrizes para iniciarem programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e da qualidade de receptoras para receberem embriões em programas de transferência de embriões em tempo fixo (TETF). Mais recentemente, a ultrassonografia Doppler começou a ser usada em pesquisas para avaliação do sistema reprodutivo da fêmea



bovina e equina ao longo do ciclo estral e durante a gestação. Seu potencial de uso em pesquisas e na prática reprodutiva bovina se baseia na capacidade de avaliar a funcionalidade de órgãos e tecidos devido à menor ou maior perfusão sanguínea. Nos últimos 10 anos a média anual do número de pesquisas na área de reprodução bovina utilizando esta tecnologia dobrou em relação aos 10 anos anteriores (15,8 vs. 7,6; ScienceDirect). Apesar do grande conhecimento adquirido em relação as mudanças fisiológicas de perfusão sanguínea em órgãos, tecidos e componentes reprodutivos, só recentemente foram desenvolvidos estudos que possibilitaram novas estratégias de uso do Doppler com potencial para incorporação em programas reprodutivos comerciais e que visam melhorar a eficiência reprodutiva. Dentre as diversas possibilidades de avaliação, a ultrassonografia Color-Doppler vem sendo mais usada como uma técnica não-invasiva e em tempo real para estimar a funcionalidade do corpo lúteo (CL) para seleção de receptoras e para o diagnóstico precoce da gestação em programas de IATF e TETF.

Desta forma, busca-se neste manuscrito discutir os potenciais usos da ultrassonografia Doppler, assim como explorar seu potencial de inclusão em programas reprodutivos de IATF e TETF em bovinos.

Uso da ultrassonografia na reprodução bovina

Durante o início dos anos 80 o uso da ultrassonografia para monitorar o sistema reprodutivo de animais de grande porte se tornou uma importante tecnologia disponível para pesquisadores e veterinários (Ginther, 2014a). Na prática bovina, a ultrassonografia transretal tem se tornado uma importante ferramenta para avaliação do sistema reprodutivo feminino. O ultrassom permitiu a avaliação dos órgãos reprodutivos para diversos fins, como: monitoramento da dinâmica folicular; exame do processo de ovulação; morfologia do CL; diagnóstico de gestação, avaliação da viabilidade embrionária e fetal; e diversos diagnósticos de alterações patológicas nos órgãos e tecidos reprodutivos da fêmea (Ginther, 1995). Atualmente, seu uso na prática reprodutiva bovina se concentra para o diagnóstico de gestação a partir de 28 dias, avaliação de ciclicidade, e diagnóstico de afecções reprodutivas como cistos ovarianos e infecções uterinas no período pós-parto.

O uso desse equipamento é uma prática constante e que se consolida mais a cada dia, tanto em centros de pesquisa em reprodução como para veterinários de campo. Entretanto, a avaliação correta e a qualidade da imagem ultrassonográfica são dependentes da experiência e conhecimento do operador em relação as interações entre a onda sonora e os tecidos e órgãos, além da configuração correta do equipamento (DesCôteaux et al., 2005). A maior acessibilidade para aquisição de equipamentos de boa qualidade e treinamento tem proporcionado maior facilidade na incorporação do exame ultrassonográfico no dia a dia de programas reprodutivos em vacas de leite e corte. Diante destas valiosas características e usos, a ultrassonografia se tornou o “padrão ouro” para avaliações da condição reprodutiva e resposta de vacas em programas reprodutivos de inseminação artificial e transferência de embriões.

Possíveis avaliações reprodutivas com a ultrassonografia Color Doppler

Princípios e formas de avaliação

O uso da ultrassonografia Doppler é relativamente recente na medicina veterinária. Os primeiros relatos de uso da técnica em animais domésticos datam dos anos 70 (Helper, 1970). A ultrassonografia Doppler é uma técnica que pode ser usada para avaliar a hemodinâmica do sistema reprodutivo em animais de grande porte. Os equipamentos de ultrassonografia Doppler usam como base a diferença entre a frequência das ondas refletidas em estruturas que estão se movimentando com a frequência emitida pelo transdutor, resultando assim no deslocamento de frequência Doppler ou “Doppler shift” (Szatmari et al., 2001). Na circulação sanguínea, essa diferença ocorre devido a movimentação das células vermelhas que promovem uma diferença positiva (maior frequência) ou negativa (menor frequência) de acordo com a movimentação, respectivamente, em sentido favorável ou contrário ao transdutor.

A maioria dos equipamentos de ultrassonografia Doppler atuais permitem 3 modos de avaliação da perfusão sanguínea: modo Espectral, modo Power-Doppler e modo Color-Doppler. O modo Espectral permite que a diferença da frequência detectada pelo equipamento seja projetada em um gráfico bidimensional em função do tempo, e a onda Doppler é formada durante o ciclo cardíaco na avaliação do fluxo sanguíneo de artérias. Neste modo, alguns índices são calculados automaticamente pelo software dos equipamentos (índices de resistência e pulsatilidade) e são úteis para se estimar a perfusão sanguínea no tecido irrigado pelo vaso avaliado. Em equipamentos com a função Color-Doppler, as diferenças de frequência são codificadas na forma de sinais coloridos na tela do equipamento sobre uma imagem em modo B (escala de cinza) convencional (Figura 1, Painéis A e B). Diferenças positivas (fluxo sanguíneo em sentido ao transdutor) e negativas (fluxo sanguíneo em sentido contrário ao transdutor) são indicadas por cores diferentes, que são geralmente em tons de vermelho a amarelo e azul a verde. Já o modo Power-Doppler é um método que permite a mensuração da intensidade do fluxo sanguíneo, i.e., o número de células sanguíneas se movendo no vaso por unidade de tempo), e a imagem apresenta coloração de diferente intensidade de acordo com a intensidade do fluxo em cada ponto da área

avaliada (Figura 1, Painel C). Este modo pode ser indicado quando a estrutura a ser avaliada apresenta fluxo sanguíneo muito baixo, como pode ser observado no fluxo sanguíneo da parede folicular (Bollwein et al., 2016). Os modos Color- e Power-Doppler promovem detalhes anatômicos e informações da perfusão sanguínea em tempo real dos tecidos e órgãos reprodutivos através de mensurações subjetivas ou objetivas. As representações coloridas da perfusão sanguínea na tela podem ser estimadas pela proporção do tecido com sinais coloridos ou calculados por programas computacionais através da quantidade de pixels coloridos. Outra alternativa para avaliação é a determinação subjetiva através de uma escala de 0 a 4 para a área avaliada (Silva & Ginther, 2010).

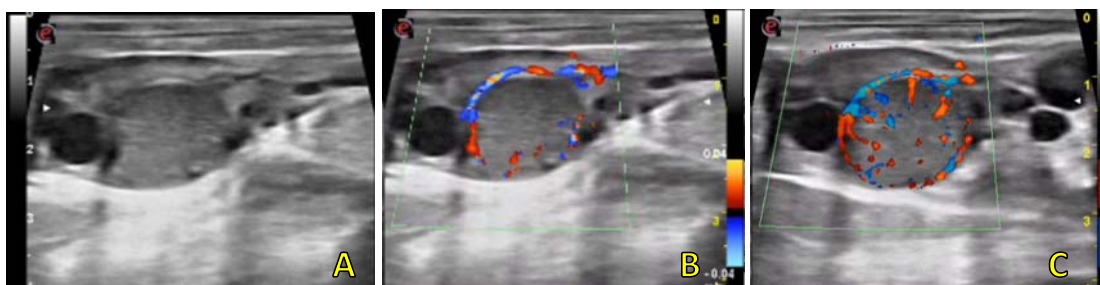


Figura 1. Imagens ultrassonográficas de ovário bovino apresentando corpo lúteo e foliculos. Painel A: imagem em modo B (brilho; escala de cinza); Painel B: imagem em modo Color-Doppler (limite de detecção: 0,04m/seg); e Painel C: imagem em modo Power-Doppler. Note a maior área apresentando sinais coloridos no modo Power-Doppler.

O uso da ultrassonografia Color-Doppler transretal para estudos reprodutivos em animais de grande porte foi inicialmente descrito por pesquisadores alemães e suíços em diversas publicações a partir de 1998 (Bollwein et al., 1998; 2000). Sequencialmente, diversos estudos (Acosta et al., 2005; Siddiqui et al., 2009; Herzog et al., 2010; Silva & Ginther, 2010; Honnens et al., 2011; Ginther et al., 2014b; Bollwein et al., 2016) descreveram as mudanças no fluxo sanguíneo ovariano e uterino ao longo do ciclo estral e da gestação inicial na égua e na vaca.

Avaliação da perfusão sanguínea no útero

Entre todas as possíveis aplicações da ultrassonografia, o escaneamento do útero para detecção da gestação e de infecções é a principal finalidade praticada comercialmente na indústria bovina. O primeiro relato da detecção da gestação através de equipamento ultrassônico Doppler (não colorido) foi na década de 70 em cadelas (Helper, 1970). Posteriormente, a técnica também foi adaptada e realizada em diversas espécies de animais domésticos para identificação do status gestacional (Lindahl, 1971; Too et al., 1974; Isakov, 1974; Weiner et al., 1986). Em bovinos, o Doppler foi inicialmente usado para detecção da circulação fetal (Mitchell, 1973). Entretanto, usando os equipamentos atuais em modos Color e Espectral é possível avaliar a perfusão sanguínea no útero através da quantificação de sinais coloridos no endométrio e mesométrio ou através da avaliação dos índices de resistência e pulsatilidade na artéria uterina média (Bollwein et al., 2016). A perfusão sanguínea no útero bovino apresenta um padrão bem definido durante o ciclo estral. Durante o pro-estro e estro são observados os maiores valores de fluxo sanguíneo; enquanto no diestro, o fluxo permanece em uma velocidade baixa, mas constante (Bollwein et al., 2016). Estas mudanças durante o ciclo estão diretamente associadas as concentrações circulantes de progesterona (P4) e estradiol. Nas vacas gestantes, alterações no suporte sanguíneo para o útero já são perceptíveis dentro de 3 semanas após a inseminação (Bollwein et al., 2016). No início da terceira semana, já se observa um aumento na perfusão sanguínea no corno gestante em comparação ao corno não gestante (Silva & Ginther, 2010). Entretanto, devido a grande variabilidade no fluxo sanguíneo entre os animais, não é possível diagnosticar a gestação precocemente com uma simples mensuração do fluxo sanguíneo uterino com ultrassonografia Doppler.

A avaliação da perfusão sanguínea no endométrio e mesométrio também já foi realizada para avaliar indiretamente a resposta inflamatória após a IATF ou procedimentos como biópsia uterina (Pugliesi et al., 2014a; Oliveira et al., 2014), e para caracterizar os processos de involução uterina no puerpério (Krüger et al., 2009; Heppelmann et al., 2013). Entretanto, o uso desta avaliação dentro das práticas clínicas ou programas reprodutivos ainda não foi estabelecido.

Avaliação da funcionalidade do folículo dominante e do CL

Devido a capacidade de avaliar indiretamente a função de estruturas e tecidos, a ultrassonografia Doppler vem sendo amplamente usada para avaliar a funcionalidade do folículo dominante e do CL ao longo do ciclo estral em éguas e vacas (Acosta et al., 2005; Siddiqui et al., 2009; Herzog et al., 2010; Ginther et al., 2014b) e mais recentemente em pequenos ruminantes (Balaro et al., 2017). O desenvolvimento dos folículos

ovarianos está estreitamente relacionado a formação da rede vascular na teca interna para prover nutrientes e suportar a esteroidogênese. Assim, diversos resultados indicam uma associação positiva entre a vascularização e a função folicular (revisado em Viana et al., 2013). Nesse sentido uma maior perfusão sanguínea é observada na parede folicular de folículos dominantes e pré-ovulatórios (Miyamoto et al. 2006). Similarmente, tratamentos que promovem maior crescimento do folículo dominante resultam em um folículo pré-ovulatório mais vascularizado e com maior capacidade de secreção de estradiol do que folículos menores (Mesquita et al., 2014; Pugliesi et al., 2016a). Assim, a avaliação da vascularização na parede de folículos dominantes no início do proestro (dia da retirada de dispositivo intravaginal em protocolos de IATF) ou de folículos pré-ovulatórios no dia da IATF poderia indicar a funcionalidade folicular e ser uma ferramenta para prever a gestação. Esta associação de vascularização folicular e probabilidade de gestação foi indicada pelo estabelecimento da gestação apenas em mulheres que receberam embriões oriundos de óocitos aspirados em folículos altamente vascularizados (Chui et al., 1997). No entanto, em bovinos a avaliação da vascularização na parede do folículo pré-ovulatório no dia da IATF não indicou nenhuma relação com a taxa de concepção (Pinaffi et al., 2015).

A avaliação ultrassonográfica do CL com consequente estimativa de seu status funcional é um aspecto importante para o manejo reprodutivo e foi inicialmente desenvolvida como ferramenta de diagnóstico em adição à palpação transretal em vacas de leite e corte. Apesar da avaliação do tamanho de tecido luteal estar positivamente correlacionada com as concentrações circulantes de P4 e servir assim como um indicativo da função luteal, durante o período de regressão do CL esta correlação é menor devido as taxas de decréscimo serem mais rápidas para P4 do que para o tamanho do CL (Kastelic et al., 1990; Assey et al., 1993). Assim, a avaliação da vascularização do tecido luteal pode representar de forma mais precisa a função do CL visto a alta rede vascular presente nesta glândula transitória (Bollwein et al. 2002;2012). Além disso, a avaliação da perfusão sanguínea no CL pode ser bastante útil pois maiores concentrações de P4 no início do diestro estão relacionadas com maior desenvolvimento do conceito (Mann and Lamming, 2001) e associadas a maior probabilidade de gestação. Neste sentido, a vascularização do CL se inicia logo após a ovulação e é altamente correlacionada com as concentrações de P4 durante a sua fase de desenvolvimento que vai até o 8^o-10^o dias do ciclo estral (Acosta et al. 2003). Da mesma forma que observado nos folículos, a maior vascularização luteal também indicou uma maior chance de sucesso gestacional em um estudo (Pugliesi et al., 2016a) mas não em outro (Pinaffi et al., 2015). Tais diferenças podem ser oriundas dos distintos momentos e critérios das avaliações realizados nestes trabalhos.

Deteção da luteólise para diagnóstico precoce da gestação

Apesar de discretas estruturas anecoicas indicativas da vesícula embrionária já poderem ser observadas pela ultrassonografia entre 12-14 dias de gestação (Pierson and Ginther, 1984), e o embrião já poder ser identificado entre 19-24 dias (Hanzen & Delsaux, 1987), o diagnóstico ultrassonográfico em modo B só é recomendado após 28-30 dias (Pieterse et al., 1990). Isto porque a sensibilidade e acurácia na visualização do conceito só chegam a 100% se o diagnóstico for realizado a partir deste período (Nation et al., 2003). Isto permite que os veterinários sugiram um plano para ressincronização das vacas não-gestantes somente após o diagnóstico de gestação aos 30 dias pós-inseminação. Entretanto, em vacas não-gestantes, o estro irá retornar normalmente entre 18 e 24 após a inseminação e após a regressão do CL que normalmente ocorre entre os dias 15 e 18 (Ginther et al., 2010; Pugliesi et al., 2013). Assim, é sugestivo que a avaliação do CL em momentos próximos a sua regressão ou ao reconhecimento materno da gestação poderia permitir um acesso correto do status gestacional.

O uso da ultrassonografia para diagnosticar a gestação precocemente, ou seja, na segunda e terceira semanas de gestação foi inicialmente avaliado por Kastelic et al. (1989;1991). Estes autores reportaram que a simples avaliação do tamanho do CL associada ou não a ecotextura uterina pela ultrassonografia no modo B propiciam baixa acurácia (<75%) antes do dia 18 pós-inseminação; no entanto, uma alta acurácia (90-100%) já é observada quando a avaliação é realizada entre os dias 20 e 22. Apesar dessa boa acurácia só avaliando o tamanho do CL, as concentrações de P4 circulante, as quais indicam a funcionalidade luteal, possuem uma correlação maior com a perfusão sanguínea do que com o tamanho do CL durante o período luteolítico em ruminantes (Herzog et al., 2010; Balaro et al., 2017). Diante desta possível vantagem com o uso da ultrassonografia Doppler para avaliar a função luteal, a perfusão sanguínea foi estudada extensivamente durante a luteólise espontânea e induzida em vacas e novilhas (Ginther et al., 2007; 2010; Shrestha et al., 2011; Pugliesi et al., 2012). Outros estudos (Utt et al., 2009; Herzog et al., 2011; Pugliesi et al., 2014b; Scully et al., 2015) também caracterizaram as mudanças na vascularização do CL entre vacas gestantes e não-gestantes. Os resultados obtidos possibilitaram a definição das características de vascularização e de tamanho do CL durante sua perda de função e serviu como base para a criação de critérios para identificar um CL funcional ou afuncional (Pugliesi et al., 2013). Alguns estudos já indicavam que a ultrassonografia Doppler poderia ser usada como método para diagnosticar precocemente a gestação (Matsui and Myamoto, 2009; Quintela et al., 2012). Subsequentemente, a acurácia do uso da ultrassonografia Doppler no diagnóstico precoce da gestação em bovinos foi avaliada quando realizada aos 20 dias após a inseminação em vacas de leite (Siqueira et al., 2013) e

corte (Pugliesi et al., 2014b). No trabalho de Siqueira et al. (2013) uma alta acurácia e quase 100% de sensibilidade foram observados usando apenas a vascularização do CL como critério para identificar a gestação. Em gado de corte, nosso grupo de pesquisa observou 100% de sensibilidade e 91% de acurácia (Pugliesi et al., 2014b) quando foi usada a perfusão sanguínea luteal associada ao tamanho do CL. Baseado nestes resultados, sugere-se ser a ultrassonografia Doppler uma ótima e acurada ferramenta para diagnosticar a gestação precocemente pois há uma baixa possibilidade de diagnosticar erroneamente uma vaca gestante como não gestante (0% de falso-negativo).

Durante estes estudos alguns critérios foram criados, mas todos se baseiam numa menor vascularização apresentada no CL já afuncional ou em regressão nas vacas não-gestantes (Utt et al., 2009; Siqueira et al. 2013; Pugliesi et al., 2014b). No estudo de Siqueira et al. (2013), foi considerado que não-gestante seria aquela fêmea que não apresentasse sinais coloridos indicando fluxo sanguíneo na região central do CL. Já em vacas de corte da raça Nelore (Pugliesi et al. 2014b), foi determinado que a vaca não-gestante seria aquela com sinais coloridos indicando fluxo sanguíneo $<25\%$ da sua área e $< 2 \text{ cm}^2$. Este valor de proporção de perfusão sanguínea luteal, o qual é obtido através de uma avaliação subjetiva, pode ser transformado para uma escala mais simples e prática através de escores de vascularização, conforme indicado na Figura 2. Desta forma, a avaliação da vascularização pode ser compreendida mais facilmente e ser assim usada de forma mais simples por veterinários para avaliar a funcionalidade do CL.

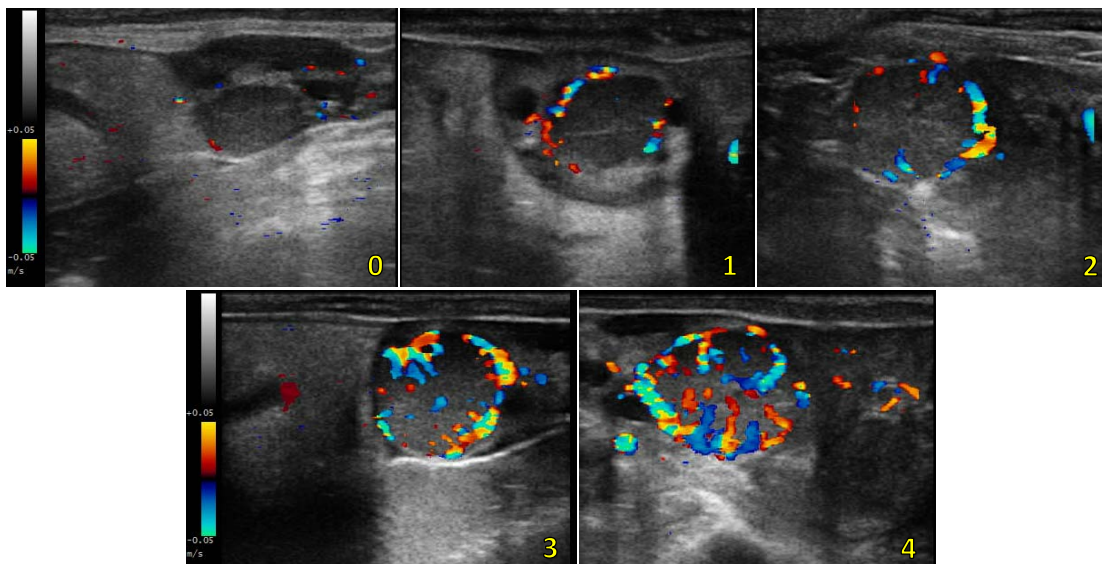


Figura 2. Imagens ultrassonográficas de ovário bovino apresentando corpo lúteo. Os painéis 0 a 4 indicam, respectivamente, os escores 0, 1, 2, 3 e 4 para perfusão sanguínea periférica e central no tecido luteal dos animais avaliados (limite de detecção: 0,05m/seg). Painéis 0 e 1: vacas não-gestantes; Painéis 2, 3 e 4: vacas gestantes.

Quando se usa não apenas a baixa perfusão sanguínea, mas também o tamanho reduzido do CL para se identificar uma vaca como não-gestante, ocorre uma menor chance de diagnóstico falso-negativo (diagnosticar um fêmea gestante como não-gestante), já que o critério fica mais rígido pois a vaca precisa apresentar ambas características para ser considerada não-gestante. Esta maior rigidez evita que erros de subestimação da vascularização durante a avaliação resultem em diagnósticos falso-negativos. Esse ponto é fundamental para uso da técnica, pois as perdas econômicas com uma maior proporção de resultados falso-negativos poderiam sobrepor o ganho com a antecipação da re-inseminação e assim inviabilizar esse tipo de estratégia em programas de IATF. Por outro lado, também deve ser considerada no uso dessa técnica a proporção de resultados falso-positivos, ou seja, a proporção de vacas diagnosticadas como gestantes, mas que não estão gestantes quando confirmado pela ultrassonografia convencional no Dia 30. Essa parcela de resultados pode ocorrer por diversos fatores que levam a presença de um CL funcional no dia do diagnóstico precoce, como: ovulação tardia ao protocolo de IATF e ciclo estral mais longo (>22 dias) de alguns animais. Entretanto, grande parte destes resultados falso-positivos observados com a ultrassonografia Doppler pode ser oriunda de perdas embrionárias entre o diagnóstico precoce (Dias 20-22) até o diagnóstico convencional (Dia 30), visto que estes estudos usaram o diagnóstico no Dia 30 para comparar a acurácia da técnica ultrassonográfica precoce. Desta forma, observa-se que estes 8-10 dias de intervalo entre as técnicas pode representar grandes perdas embrionárias que irão ocorrer neste período (Diskin et al., 2008), e assim ter vacas gestantes no diagnóstico precoce mas que perderam a gestação até o Dia 30. Esta morte embrionária precoce também pode refletir a maior proporção de resultados falso-positivos e menor acurácia observada em vacas de leite (Siqueira et al., 2013) se comparado a vacas de

corde (Pugliesi et al., 2014b), já que a mortalidade embrionária chega a ser 2 a 4 vezes maior em vacas especializadas para produção de leite (Beghelli et al., 1986; Fricke et al., 1998).

Aplicações em programas reprodutivos em bovinos

Frente ao potencial de avaliação da funcionalidade do CL ao longo do ciclo estral, algumas técnicas foram desenvolvidas para inserir a ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF. Para estes fins, o equipamento ultrassonográfico deve ser adequadamente configurado para o modelo escolhido e para identificação da perfusão sanguínea em vasos pequenos e com baixo fluxo sanguíneo. Isso é fundamental visto que a quantidade de sinais coloridos no visor é altamente influenciada pelo tipo de configuração utilizada (frequência, quantidade de frames por segundo, potência usada, ganho do modo Doppler, e frequência de pulso). De forma geral, sugere-se uma configuração no equipamento que permita uma velocidade de detecção mínima ao redor de 4-6cm/seg (Ginther, 2007). Em relação ao custo dos equipamentos, este vem reduzindo nos últimos anos com a disponibilidade de equipamentos mais simples mas com boa qualidade de imagem; entretanto, o custo ainda se situa ao redor de 3 a 4 vezes maior ao de um equipamento em modo B. Isso já tem viabilizado a aquisição destes equipamentos para uso comercial por empresas especializadas em assistência à programas de IATF e TETF em diversas regiões do território brasileiro.

Uso em programas de ressincronização precoce da ovulação pós-IATF

A possibilidade de diagnosticar com alta acurácia (90-95%) as vacas não-gestantes entre 20 e 22 dias pós-inseminação permitiu que novas estratégias fossem desenvolvidas para se ter um intervalo de inseminação menor dentro de uma estação reprodutiva. Dentre estas estratégias, se destaca a possibilidade de realizar uma segunda inseminação em um intervalo de apenas 24 dias após a primeira IATF. Tal mudança, promove uma antecipação de 16 dias no intervalo para segunda IATF se comparado ao sistema tradicional que só ressincroniza as fêmeas detectadas não-gestantes aos 30 dias pós-IATF, ou uma antecipação de 8 dias se comparado ao sistema precoce que ressincroniza todas as vacas aos 22 dias e faz o diagnóstico de gestação convencional aos 30 dias. Entretanto, tal advento só é possível com o diagnóstico precoce da gestação pela ultrassonografia Doppler aos 22 dias e com uma ressincronização da ovulação também precoce a partir dos 14 dias da primeira IATF.

Nesse sentido, Vieira et al. (2014) verificaram que a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol no início do protocolo de ressincronização (13 a 14 dias após prévia IATF) induziu luteólise e reduziu a taxa de concepção da primeira inseminação, fato que não ocorre em vacas ressincronizadas 22 dias após a IATF (Sá Filho et al., 2014). Diante desse limitante, programas de ressincronização super-precoce passaram a ser desenvolvidos sem o uso de estradiol no início do tratamento. Estes protocolos hormonais para ressincronização se baseiam no uso de uma alta dose de P4 injetável no momento da inserção de dispositivo de P4 (14 após a IATF) para induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular. Rezende et al. (2016) verificaram que o início da nova onda de crescimento folicular ocorre no dia $3,0 \pm 0,7$ dias após o tratamento com 100 mg de P4 (Afisterone®, Hertape Calier) em vacas Nelore. Neste sentido, Penteado et al. (2016) compararam a ressincronização precoce (22 dias) com a super-precoce (14 dias) em 244 vacas Nelore lactantes. Neste estudo, todas as fêmeas receberam a primeira IATF (Dia 0) e foram distribuídas em dois programas de ressincronização: super-precoce e precoce. As vacas que receberam ressincronização super-precoce foram tratadas 14 dias após IATF (D14) com dispositivo de P4 associado a 100 mg de P4 injetável. No D22 foi realizado o diagnóstico de gestação pela funcionalidade do CL através da ultrassonografia Color Doppler conforme estabelecido por Pugliesi et al. (2014b). As vacas consideradas não-gestantes no diagnóstico precoce seguiram no protocolo para IATF [remoção do dispositivo de P4 e administração de 0,530 mg de cloprostenol sódico (PGF), 1 mg de CE e 300 UI de eCG i.m.; IATF 48 horas após (D 24)]. As vacas gestantes passaram por remoção do dispositivo de P4 sem tratamento adicional. Além de manter semelhante taxa de concepção à IATF (51% vs. 56%) e prenhez acumulada após a ressincronização (75% [89/118] vs. 77% [97/126]), a ressincronização super-precoce aumentou consideravelmente a taxa de serviço a cada 21 dias (de 66% para 87,5%) em relação à ressincronização precoce com 22 dias.

A fim de avaliar a aplicabilidade do modelo de ressincronização super-precoce em larga escala, 448 vacas Nelore e mestiças (1/2 Nelore vs Angus), lactantes, foram submetidas ao mesmo protocolo super-precoce descrito acima (Penteado et al., 2016). Neste estudo a campo, verificou-se 52% (233/448) de taxa de concepção a primeira IATF no diagnóstico precoce aos 22 dias e 49% (221/448) de concepção no diagnóstico convencional aos 30 dias, 53% (115/215) de taxa de concepção na ressincronização e 75% (336/448) de prenhez acumulada nas duas IATFs (Penteado et al., 2016). Colli et al. (dados não publicados) avaliaram a eficiência da ressincronização super-precoce em novilhas Nelore de 12 a 16 meses, e obtiveram taxa de prenhez a IATF de 43% (270/631), 34% (107/314) na primeira ressincronização, 34% (59/172) na segunda ressincronização, e 69% (436/631) de prenhez acumulada em 3 IATF's, em 48 dias de estação de monta.

Com objetivo de reduzir o custo fixo da P4 em protocolos de ressincronização super-precoce foi avaliada a eficácia do uso de P4 de longa ação P4LA (Sincrogest injetável®, Ouro Fino Saúde Animal), para

sincronização da onda de crescimento folicular no protocolo de ressinchronização super-precoce (Rezende et al., 2017, dados não publicados). Para este estudo foram utilizadas 88 vacas Nelore, previamente inseminadas em tempo fixo, que foram distribuídas em 4 grupos experimentais, alterando apenas o tipo e dose de P4 injetável no dia 14. As vacas que receberam ressinchronização super-precoce foram tratadas 14 dias após IATF (D14) com dispositivo de P4 associado a dose e tipo de P4 i.m. de cada grupo: Grupo P4I-100 (n=22)- 100mg de P4 injetável de curta ação (Afisterone®); Grupo P4I 50mg (n=22) - 50mg de P4 injetável de curta ação (Afisterone®); Grupo P4LA 100mg (n=22) – 100mg de P4 de longa ação (Sincrogest injetável®, Ouro Fino Saúde Animal); Grupo P4LA 50mg (n=22)– 50mg de P4 de longa ação (Sincrogest injetável®). No dia 22 foi realizada remoção do dispositivo de P4 e administração de 0,530 mg de cloprostenol sódico, 1 mg de CE e 300 UI de eCG i.m., e IATF 48 horas após (D 24). Não foi observada diferença entre os grupos experimentais para diâmetro do foliculo dominante nos dias 22 e 24, assim como para a taxa de ovulação (86-100%). Este estudo indica que há possibilidade de substituição do tipo de P4 injetável no início do protocolo de ressinchronização super-precoce, porém mais estudos devem ser realizados para avaliar a prenhez deste protocolo.

Diante do exposto, é possível afirmar que os resultados obtidos com o modelo de ressinchronização super-precoce são consistentes, e de possível aplicação em larga escala. A considerável redução no tempo da estação de monta proporciona mais dias de ganho de peso aos bezerros que nascem mais cedo, principalmente quando comparado a ressinchronização após o diagnóstico gestacional convencional, ou mesmo o uso de uma IATF seguida de repasse com touro. Um fato importante a se considerar é o aumento dos custos relacionados a mão de obra especializada, alto investimento com o equipamento de ultrassonografia com tecnologia Color Doppler, e custo da P4 injetável para a sincronização da nova onda de crescimento folicular. A escolha de qual modelo de ressinchronização utilizar depende do sistema de produção adotado pela fazenda, do manejo de pastos e lotes na fazenda, da disponibilidade de mão de obra do médico veterinário para realização do diagnóstico de gestação, visto que ao adotar a ressinchronização super-precoce alguns manejos irão cair em finais de semana, fator este que pode ser limitante em algumas fazendas. Por outro lado, a realização de 3 IATF's em 48 dias reduz a estação de monta ao ponto de possibilitar a adoção de estação de monta no inverno, em sistemas de integração lavoura pecuária.

Diagnóstico precoce da gestação e seleção de receptoras em programas de TETF

A possibilidade de iniciar ressinchronização após o diagnóstico precoce com Doppler foi também avaliada em 165 receptoras de embrião aos 21 dias, objetivando melhorar o manejo reprodutivo em programas de TETF (Guimarães et al., 2015). Nesse estudo, o diagnóstico precoce da gestação foi realizado por um critério de escore de vascularização do CL e também contou com a informação da presença e lado do CL avaliado no dia da transferência de embrião (Dia 7) para poder auxiliar na distinção de CLs jovens, os quais apresentam um tamanho reduzido, mas alta vascularização. A acurácia e sensibilidade do diagnóstico precoce aos 21 dias observadas nestas receptoras mestiças foram de 88,3% e 100%, respectivamente. Este diagnóstico possibilitou que 80% das receptoras não gestantes já fossem diagnósticas aos 21 dias e assim serem ressinchronizadas para um novo programa de TETF.

Em programas de TE após observação de cio ou em tempo fixo, um dos fatores mais importantes para se determinar o uso de uma receptora é a presença e a qualidade do CL presente. Essa qualidade é tradicionalmente avaliada para seleção de receptoras através da palpação transretal ou pela ultrassonografia em escala-de-cinza para se determinar o tamanho do CL. Entretanto, estas estratégias podem resultar na transferência de embriões para um útero não receptivo devido à presença de um CL pouco ou não-funcional, já que a funcionalidade luteal (secreção de P4) não pode ser acessada por estas avaliações. Desta forma, Pinaffi et al. (2015) avaliaram receptoras através da ultrassonografia Doppler no dia da transferência e classificaram retrospectivamente estas fêmeas como Baixa ($\leq 40\%$ de sinais coloridos indicando vascularização no CL) ou Alta vascularização luteal ($> 40\%$). Apesar do reduzido número de animais usados nesse estudo foi verificado que nenhuma (n=0/12) das receptoras com baixa vascularização no CL foi diagnosticada como gestante; entretanto, a taxa de gestação foi de 48,4% (n=15/31) nas receptoras com alta vascularização luteal. O mais interessante nesse estudo é que apesar da diferença na proporção de vascularização entre estes dois grupos, o diâmetro médio do CL foi semelhante entre as vacas com baixa (17,5 mm) ou alta vascularização (17,0 mm). Mais recentemente (Pugliesi et al., 2016b) foi estudado o impacto do tamanho e da perfusão sanguínea luteal avaliados por ultrassonografia Color-Doppler no momento da TE sobre as taxas de gestação em receptoras de corte mestiças (n=329) com o ciclo estral sincronizado para permitir TETF. As receptoras foram retrospectivamente divididas em dois subgrupos de acordo com o tamanho do CL (Pequeno [$< 3\text{cm}^2$] ou Grande [$\geq 3\text{cm}^2$]) e três subgrupos de acordo com o fluxo sanguíneo luteal (Baixo [$\leq 40\%$], Médio [45 a 50%] ou Alto [$\geq 55\%$]). Das vacas não selecionadas por diversos motivos, 9,5% (7/74) não foram usadas pois o CL estava presente, mas não estava funcional ($< 25\%$ de fluxo sanguíneo). Foi observado apenas um efeito de categoria de fluxo sanguíneo de CL sobre a taxa de gestação. Isto refletiu um aumento progressivo na taxa de gestação associado ao aumento da vascularização luteal (Baixa, 45,1%^B, [37/82]; Média, 55,9%^{AB} [57/102]; e Alta, 62,3%^A [38/61]). Em trabalho subsequente de nosso grupo (Pugliesi et al., 2017; dados não publicados), receptoras foram avaliadas apenas no



dia da TETF e o CL classificado de acordo com a classificação de vascularização luteal proposta acima e uma classificação em forma de escores (0 a 4; Figura 2). Corroborando com os resultados anteriores, observou-se aumento de 41% na taxa de gestação nas receptoras com Alta vascularização luteal comparado com Baixa vascularização. Diferença similar também foi verificada quando usado o sistema de escores de vascularização central do CL, onde a taxa de gestação foi 29% maior nas vacas com Escore 3 (62%, 44/71) em comparação aos Escores 1 e 2 (48,2%, 53/110). Apesar das concentrações circulantes de P4 ainda não terem sido mensuradas nesses estudos, acredita-se que a maior taxa de gestação nas receptoras com Alta vascularização luteal seja oriunda da maior secreção de P4 pelo tecido luteal. Neste sentido, Bollwein et al. (2002) observou que a maior vascularização luteal está associada positivamente com a maior função luteal.

Desta forma, observa-se através destes primeiros estudos que a ultrassonografia Doppler pode ser utilizada para se descartar receptoras que apresentem CL afunção e para selecionar receptoras que teriam uma melhor receptividade e assim seria uma alternativa para se direcionar embriões de maior prioridade para se obter uma gestação. Isto poderia promover um ganho na eficiência reprodutiva em programas de TETF visto que não se perderia embriões transferidos em receptoras com CL não-funcional, e em caso de excedente de receptoras poderia dar preferência para fêmeas com média a alta vascularização luteal.

Considerações finais

Em conclusão, verifica-se que apesar dos diferentes critérios e características consideradas pelos diversos grupos de pesquisa, a acurácia foi alta (80-95%) e a sensibilidade próxima a 100% em todas as metodologias propostas para se diagnosticar a gestação precocemente entre os dias 20 e 22. Desta forma, o uso da ultrassonografia Color-Doppler como um método não-invasivo e em tempo real para estimar a atividade luteal é uma estratégia inovadora e de grande potencial para diagnóstico precoce de gestação após a IATF. Além disso, a avaliação da vascularização do CL através da ultrassonografia Doppler permite a seleção de vacas com alta receptividade, e conseqüentemente pode melhorar a fertilidade em programas de PIV/TETF. Entretanto, diante dos diversos critérios que têm sido adotados para avaliação da função luteal, se faz necessária uma padronização destes critérios para se ter uma avaliação prática e replicável pelos profissionais a campo. A inserção da ultrassonografia Doppler nas práticas reprodutivas a campo dependerá ainda de mais estudos para conhecimento do real ganho destas estratégias e para o aprimoramento de protocolos hormonais para ressincronização. Estes fatores possibilitariam uma melhor difusão e compreensão do real potencial dessa técnica nos programas de IATF e TETF. Além disso, a configuração do equipamento e o seu custo devem ser sempre analisados para propiciar acurácia e viabilidade econômica da técnica.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio das empresas Embryo SYS, Embriotec, Ourofino Saúde Animal e For Medical na disponibilização de animais, fármacos e equipamentos para execução de diversos estudos, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa e auxílio ao primeiro autor (Processos: 2015/10606-9, 2016/23964-3).

Referências

- Acosta TJ, Hayashi KG, Matsui M, Miyamoto A.** Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. *J Reprod Dev*, v.51, p.273-280, 2005.
- Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A.** Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*, v.125, p.759-767, 2003.
- Assey RJ, Purwantara B, Greve T, Hyttel P, Schmidt MH.** Corpus luteum size and plasma progesterone levels in cattle after cloprostenol-induced luteolysis. *Theriogenology*, v.39, p.1321-1330, 1993.
- Baloro MFA, Santos AS, Moura LFGM, Fonseca JF, Brandão FZ.** Luteal dynamic and functionality assessment in dairy goats by luteal blood flow, luteal biometry, and hormonal assay. *Theriogenology*, v.95, p.118-126, 2017.
- Beghelli V, Boiti C, Parmigiani E, Barbacini S.** Pregnancy diagnosis and embryonic mortality in the cow. In: Sreenan JM and Diskin MG. *Embryonic Mortality in Farm Animals*. Martinus Nijhoff, Boston, p.159-167, 1986.
- Bollwein H, Maierl J, Mayer R, Stolla R.** Transrectal color Doppler sonography of the A. uterina in cyclic mares. *Theriogenology*, v.49, p.1483-1488, 1998.
- Bollwein H, Meyer HH, Maier J, Weber F, Baumgartner U, Stolla R.** Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow. *Theriogenology*, v.53, p.1541-1552, 2000.
- Bollwein H, Baumgartner U, Stolla R.** Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. *Theriogenology*, v.57, p.2053-2061, 2002.
- Bollwein H, Lüttgenau J, Herzog K.** Bovine luteal blood flow: basic mechanism and clinical relevance. *Reprod Fertil Dev*, v.25, p.71-79, 2012.



- Bollwein H, Heppelmann M, Lüttgenau J.** Ultrasonographic Doppler Use for Female Reproduction Management. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, v.32, p.149-164, 2016.
- Chui DK, Pugh ND, Walker SM, Gregory L, Shaw RW.** Follicular vascularity the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in-vitro fertilization programme: a preliminary study. *Hum Reprod*, v.12, p.191-196, 1997.
- DesCôteaux L, Carrière PD, Durocher J.** Ultrasonography of the reproductive system of the cow: A 4 languages interactive CD-rom for continuing education of veterinarians. Continuing education services of the University of Montreal, St-Hyacinthe, Québec, Canada. 2005.
- Diskin MG, Morris DG.** Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim*, v.43 p.260-267, 2008.
- Fricke PM, Guenther JN, Wiltbank MC.** Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.50, p.1275-1284, 1998.
- Ginther, OJ.** Ultrasonic imaging and reproductive event in the mare. Cross Plains, WI, Equiservices, Inc. p.1-12, 1986.
- Ginther OJ.** Ultrasonic imaging and animal reproduction: Book 2, Horses. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 394p, 1995.
- Ginther OJ.** Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography. Book 4. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 258p, 2007.
- Ginther OJ, Silva LA, Araujo RR, Beg MA.** Temporal Associations among pulses of 13,14-Dihydro-15-keto-PGF₂alpha, Luteal Blood Flow, and Luteolysis in Cattle. *Biol Reprod*, v.76, p.506-513, 2007.
- Ginther OJ, Shrestha HK, Beg MA.** Circulating hormone concentrations within a pulse of a metabolite of prostaglandin F₂a during preludeolysis and early luteolysis in heifers. *Anim Reprod Sci*, v.122, p.253-258, 2010.
- Ginther OJ, Rakesh HB, Hoffman MM.** Blood flow to follicles and CL during development of the periovulatory follicular wave in heifers. *Theriogenology*, v.82, p.304-311, 2014b.
- Ginther OJ.** How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. *Theriogenology*, v.81, p.112-125, 2014a.
- Guimarães CRB, Oliveira ME, Rossi JR, Fernandes CAC, Viana JHM, Palhao MP.** Corpus luteum blood flow evaluation on Day 21 to improve the management of embryo recipient herds. *Theriogenology*, v.84, p.237-241, 2015.
- Hanzen C, Delsaux B.** Use of transrectal B-mode ultrasound imaging in bovine pregnancy diagnosis. *Vet. Rec*, v.121, p.200-202, 1987.
- Helper LC.** Diagnosis of pregnancy in the bitch with an ultrasonic Doppler instrument. *J Am Vet Med Assoc*, v.156p. 60-62, 1970.
- Heppelmann M, Krüger L, Leidl S, Bollwein H.** Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during the first two weeks after parturition in Simmenthal heifers. *J Vet Sci*, v.14, p.323-327, 2013.
- Herzog K, Brockhan-Lüdemann 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.
- Herzog K, Voss C, Kastelic JP, Beindorff N, Paul V, Niemann H, Bollwein H.** Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.75, p.549-554, 2011.
- Honnens A, Weisser S, Welter H, Einspanier R, Bollwein H.** Relationships between uterine blood flow, peripheral sex steroids, expression of endometrial estrogen receptors and nitric oxide synthases during the estrous cycle in mares. *J Reprod Dev*, v.57, p.43-48, 2011.
- Isakov D, Tierheilkd SA.** Use of ultrasonic technic (Doppler) in the early diagnosis of pregnancy in sows. *Schweiz Arch Tierheilkd*, v.116, p.245-248, 1974.
- Kastelic JP, Curran S, Ginther OJ.** Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology*, v.31, p. 813-820, 1989.
- Kastelic JP, Bergfelt DR, Ginther OJ.** Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, v.33, p.1269-1278, 1990.
- Kastelic JP, Bergfelt DR, Ginther OJ.** Ultrasonic-detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology*, v.35, p.569-581, 1991.
- Krüger L, Koerte J, Tsousis G, Herzog K, Flachowsky G, Bollwein H.** Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during the first 12 weeks after parturition in healthy dairy cows. *Anim Reprod Sci*, v.114, p.23-31, 2009.
- Lindahl IL.** Pregnancy diagnosis in the ewe by intrarectal Doppler. *J Anim Sci*, v.32, p.922-925, 1971.
- Mann GE, Lamming GE.** Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, v.121, p.175-180, 2001
- Matsui M, Miyamoto A.** Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: practical use for reproductive management in the cow. *Vet J*, v.181, p.232-240, 2009.
- Mesquita FS, Pugliesi G, Scolari SC, França MR, Ramos RS, Oliveira M, Papa PC, Bressan FF, Meirelles FV, Silva LA, Nogueira GP, Membrive CM, Binelli M.** Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu



- affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology*, v.81, p.861-869, 2014.
- Mitchell D.** Detection of foetal circulation in the mare and cow by Doppler ultra-sound. *Vet Rec*, v.93, p.365-368, 1973.
- Miyamoto A, Shirasuna K, Hayashi KG, Kamada D, Awashima C, Kaneko E, Acosta TJ, Matsui M.** A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: New observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. *J Reprod Dev*, v.52, p.153-160, 2006.
- Nation DP, Malmo J, Davis GM, Macmillan KL.** Accuracy of bovine pregnancy detection using transrectal ultrasonography at 28 to 35 days after insemination. *Aust Vet J*, v.81, p.63-65, 2003.
- Oliveira BM, Arruda RP, Thomé HE, Maturana Filho M, Oliveira G, Guimarães C, Nichi M, Silva LA, Celeghini EC.** Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. *Theriogenology*, v.82, p.767-72, 2014.
- Penteado L, Rezende RG, Mingoti RD, Colli MHA, Motta JCL, Bayeux BM, Santos FB, Vieira LM, Sá Filho MF, Baruselli, PS.** Pregnancy rate of Nelore cows submitted to resynchronization 14 or 22 days after TAI. *Anim Reprod*, v.13, p.235, 2016.
- Pieterse MC, Taverne MA, Kruip TA, Willemse AH.** Detection of corpora lutea and follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. *Vet Rec*, v.126, p.552-554, 1990.
- Pierson RA, Ginther OJ.** Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers. *Theriogenology*, v.22, p.225-233, 1984.
- Pinaffi FLV, Santos ES, Silva MG, Maturana Filho M, Madureira EH, Silva LA.** Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle. *Pesq Vet Bras*, v.35, p.470-476, 2015.
- Pugliesi G, Khan FA, Hannan MA, Beg MA, Carvalho GR, Ginther OJ.** Inhibition of prostaglandin biosynthesis during postluteolysis and effects on CL regression, prolactin, and ovulation in heifers. *Theriogenology*, v.78, p.443-454, 2012.
- Pugliesi G, Pinaffi FLV, Beg MA, Ginther OJ.** Use of corpus luteum area as a predictor of ongoing functional luteolysis in dairy heifers. *Reprod, Fert and Develop*, v.25, p. 235, 2013. Resumo
- Pugliesi G, Scolari SC, Mesquita FS, Maturana Filho M, Araújo ER, Cardoso D, Sales JN, Martin I, Sá Filho M, Bertan CM, Binelli, M.** Impact of probing the reproductive tract during early pregnancy on fertility of beef cows. *Reprod Domest Anim*, v.49, p.e35-e39, 2014a.
- Pugliesi G, Miagawa BT, Paiva YN, França MR, Silva LA, Binelli M.** Conceptus-induced changes in the gene expression of blood immune cells and the ultrasound-accessed luteal function in beef cattle: How early can we detect pregnancy? *Biol Reprod*, v.95, p.1-12, 2014b.
- Pugliesi G, Santos FB, Lopes E, Nogueira E, Maio JR, Binelli M.** Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. *Theriogenology*, v.85p.1239-1248, 2016a.
- Pugliesi G, Silva JCB, Nishimura T, Miyai D, Silva LA, Binelli M.** Use of Color-Doppler ultrasonography to improve selection of higher fertility beef recipient cows for embryo transfer. *Proc of the 30th Ann Meet of the Braz Embryo Tech So (SBTE); Foz do Iguaçu, PR, Brazil, August 25th to 27th, 2016b.* p.454. Resumo.
- Quintela LA, Barrio M, Peña AI, Becerra JJ, Cainzos J, Herradón PG, Díaz C.** Use of ultrasound in the reproductive management of dairy cattle. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.34-44, 2012.
- Rezende RG, Freitas BG, Mingoti RD, Colli MHA, Carvalho JBP, Sá Filho MF, Motta JCL, Macedo GG, Baruselli PS.** Follicular dynamics of Nelore cows submitted to resynchronization 14 days after TAI using injectable P4 for synchronization of follicular wave. *Anim Reprod*, v.13, p.233, 2016. Resumo.
- Sá Filho MF, Marques MO, Giroto R, Santos FA, Sala RV, Barbuio JP, Baruselli PS.** Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. *Theriogenology*, v.81, p.284-290, 2014.
- ScienceDirect.** Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science>. Acessado em 20 de Março de 2017.
- Scully S, Evans AC, Duffy P, Crowe MA.** Characterization of follicle and CL development in beef heifers using high resolution three-dimensional ultrasonography. *Theriogenology*, v.81, p.407-418, 2014.
- Shrestha HK, Pugliesi G, Beg MA, Ginther OJ.** Role of luteinizing hormone in changes in concentrations of progesterone and luteal blood flow during the hours of a simulated pulse of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F(2alpha) (PGFM) in heifers. *Biol Reprod*, v.85, p.482-489, 2011.
- Siddiqui MAR, Almamun M, Ginther OJ.** Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. *Anim Reprod Sci*, v.113, p.287-292, 2009.
- Silva LA, Ginther OJ.** Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. *Reproduction*, v.139, p.453-463, 2010.
- Siqueira LGB, Areas VS, Ghetti AM, Fonseca JF, Palhao MP, Fernandes CA, Viana JHM.** Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *J Dairy Sci* v.96, p.6461-6472, 2013.



Szatmári V, Sótonyi P, Vörös, K. Normal Duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a Review. *Vet Radiol Ultrasound*, v.42, p.93-107, 2001.

Too K, Kawata K, Fukui Y, Sato K, Kagota K. Studies on pregnancy diagnosis in domestic animals by an ultrasonic Doppler method. I. Pregnancy diagnosis in the pig and fetal heart rate changes during pregnancy. *Jpn J Vet Res*, v.22, p.61-71, 1974.

Utt MD, Johnson GL, Beal WE. The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. *Theriogenology*, v.71, p.707-715, 2009.

Viana JHM, Arashiro EKN, Siqueira LGB, Ghetti AM, Areas VS, Guimarães CRB, Palhão MP, Camargo LSA, Fernandes CAC. Doppler ultrasonography as a tool for ovarian evaluation. *Proc XXVII Annu Meet Braz Embryo Transfer Soc (SBTE) 2013*; v.10, p.215-222, 2013.

Vieira LM, Sá Filho MF, Pugliesi G, Guerreiro BM, Cristaldo MA, Batista EOS, Freitas BG, Carvalho FJ, Guimarães LHC, Baruselli PS. Resynchronization in dairy cows 13 days after TAI followed by pregnancy diagnosis based on corpus luteum vascularization by color Doppler. *Anim Reprod*, v.11, p.378, 2014. Resumo.

Weiner CP, Herrig J, Wang J, Wang L, Farley D, Van Orden D, Chestnut D. Chronic measurement, using a Doppler probe, of uterine artery flow in the gravid guinea-pig. *J Reprod Fertil*, v.77, p.247-256, 1986.
