ERIKO DA SILVA SANTOS

Efeito das características morfológicas e da dinâmica vascular do folículo e corpo lúteo sobre a fertilidade de vacas de corte submetidas à protocolo de sincronização do estro e ovulação

São Paulo 2013

ERIKO DA SILVA SANTOS

Efeito das características morfológicas e da dinâmica vascular do folículo e corpo lúteo sobre a fertilidade de vacas de corte submetidas à protocolo de sincronização do estro e ovulação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2866
FMVZ

Santos, Eriko Da Silva

Efeito das características morfológicas e da dinâmica vascular do folículo e corpo lúteo sobre a fertilidade de vacas de corte submetidas à protocolo de sincronização do estro e ovulação. / Eriko Da Silva Santos. -- 2013.
46 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Andrade Silva.

1. IATF. 2. Folículo. 3. Corpo lúteo. 4. Perfusão vascular. 5. Doppler. I. Título.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Of.CEUAVet.n.142/FMVZ/2013

lfrs

São Paulo, 28 de junho de 2013.

Ao Senhor Professor

Doutor Luciano Andrade Silva

Pesquisador credenciado no Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ/USP

Assunto: Projeto nº 3030/2013, intitulado: "Efeito das características morfológicas e da dinâmica vascular do folículo e corpo lúteo sobre a fertilidade de vacas de corte submetidas à protocolo de sincronização do estro e ovulação."

Senhor Professor,

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, em reunião do dia 26/6/2013, analisou projeto acima mencionado e solicita a Vossa Senhoria encaminhar o número do protocolo do projeto aprovado pela Prefeitura do *campus* Pirassununga.

Atenciosamente,

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Eriko da Silva

Título: **Efeito das características morfológicas e da dinâmica vascular do folículo e corpo lúteo sobre a fertilidade de vacas de corte submetidas à protocolo de sincronização do estro e ovulação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

DEDICO

À minha família, em especial meus pais Júlio e Leda e minha esposa Desirê

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a todas as pessoas que acreditaram, incentivaram e apoiaram minhas escolhas e realização de meus sonhos. Em especial a minha querida esposa Desirrê, que desde que nos conhecemos sempre me deu força em tudo que faço, agradeço muito pelo seu companheirismo, “puxões de orelha” e pelo conforto nas horas difíceis, muito obrigado por estar sempre ao meu lado.

Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial à minha família, meus pais e minha irmã Renata, pelo amor incondicional e apoio que sempre demonstraram durante não apenas no meu desenvolvimento profissional, mas também em toda a minha vida, vocês fazem parte da minha formação de caráter e como pessoa.

Durante minha caminhada profissional e acadêmica tive o prazer de conhecer pessoas que fizeram e ainda fazem parte de minha história, pessoas como o querido Prof. Dr. Otávio M. Ohashi, Profa. Dra. Fabiana A. M. Sterza, Prof. Dr. Luiz F. C. Cunha Filho, Samuel Guemra, Msc. Fábio Pinaffi, Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, Prof. Marco A. Laffranchi e Prof. Dr. Paulo R. Adona, a amizade e os ensinamentos de vocês foram de fundamental importância para minha formação na graduação, minha vida profissional e ingresso na pós-graduação.

Amigos são pessoas que temos o privilégio de conhecer em nossas vidas e a escolha de não deixá-los sair jamais. São pessoas que rimos juntos, sofremos juntos, apoiamos nas horas difíceis, e em qualquer momento de nossas vidas. Por isso gostaria de agradecer muito aos meus irmãos Renato Zanin, Gustavo Toledo, Roberta Garbelini, Ingredy Borges, Pedro Kather, Jean A. Baudraz, Fábio C. Romagnolli e Henrique Ancioto, amigos de faculdade, de pós-graduação, de trabalho e da vida, pessoas que sempre contei, sempre podem contar comigo e sempre contarei.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Agradeço em especial ao Prof. Dr. Luciano Andrade Silva, nunca esquecerei as palavras de amizade quando o convite para me orientar, e a paciência e amizade nas horas difíceis que enfrentei, nunca medindo esforços para a realização deste projeto, e orientações durante esta fase de minha vida.

Por fim, devo um imenso agradecimento a meus familiares, tios, primos, meus avós e bisavós que hoje já não se encontram mais entre nós, sempre estarão acima de todas as conquistas.

Muito obrigado!!!

RESUMO

SANTOS, E. S. Efeito das características morfológicas e da dinâmica vascular do folículo e corpo lúteo sobre a fertilidade de vacas de corte submetidas à protocolo de sincronização do estro e ovulação. [Effect of the morphological characteristics and the vascular dynamics of the follicle and corpus luteum in the fertility of beef cows submitted to a protocol of estrus synchronization and ovulation]. 2013. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O presente estudo visou avaliar o efeito das características morfológicas e da dinâmica vascular do folículo e corpo lúteo sobre a fertilidade de vacas de corte submetidas à protocolo de sincronização de estro e ovulação. Para isso o estudo foi dividido em três experimentos sendo: No primeiro experimento foi avaliado, no momento da transferência de embriões (TE), a vascularização do corpo lúteo e sua relação com as taxas de prenhez em vacas multíparas Nelore utilizadas como receptoras de embriões. No segundo experimento analisou-se a área e vascularização do folículo no momento da inseminação artificial em vacas, novilhas e primíparas Nelore e vacas Tabapuã multíparas submetidas a protocolo de sincronização de estro e ovulação. No dia 11 após as inseminações foram avaliados a área, diâmetro e vascularização do corpo lúteo e no dia 30 realizou-se o diagnóstico gestacional dos animais. No terceiro experimento foram utilizadas vacas multíparas Nelore e cruzadas submetidas ao mesmo protocolo de sincronização de estro e ovulação do experimento 2. Neste experimento foi analisada a área dos folículos no momento da inseminação artificial e aplicados 400 UI de eCG 14 dias após, quando então avaliou-se o tamanho do corpo lúteo e dos folículos existentes. No dia 30 após a IA foi realizado o diagnóstico gestacional e análise da vascularização do corpo lúteo permitindo avaliar a relação da aplicação do eCG com o aumento da vascularização e taxas de prenhez. No presente estudo foi encontrada uma provável correlação positiva em relação à vascularização e tamanho do folículo pré-ovulatório com o tamanho e vascularização do corpo lúteo, porém apenas nos experimentos 1 e 3 houve um aumento nas taxas de prenhez conforme o aumento na vascularização.

Palavras-chave: IATF. Folículo. Corpo lúteo. Perfusão vascular. Doppler.

ABSTRACT

SANTOS, E. S. Effect of the morphological characteristics and the vascular dynamics of the follicle and corpus luteum in the fertility of beef cows submitted to a protocol of estrus synchronization and ovulation. [Efeito das características morfológicas e da dinâmica vascular do folículo e corpo lúteo sobre a fertilidade de vacas de corte submetidas à protocolo de sincronização do estro e ovulação]. 2013. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The present study evaluated the effect of the morphological characteristics and the vascular dynamics of the follicle and corpus luteum in the fertility of beef cows submitted to a protocol of estrus synchronization and ovulation. Three experiments were done. In the first experiment, the corpus luteum vascular perfusion and its relationship with the pregnancy rates of Nelore recipient cows after embryo transfer (ET) were evaluated. In the second experiment, the area and vascular perfusion of the follicle at the time of artificial insemination (AI), the area, diameter and vascular perfusion of the corpus luteum on Day 11 after ovulation of Nelore cows submitted to a protocol of estrus synchronization and ovulation were evaluated. In the third experiment, Nelore cows were submitted to the same protocol of estrus synchronization and ovulation used in experiment 2 and the area of the follicle was measured at the time of the AI. After 14 days of the AI, 400 UI de eCG was given to the cows and the size of the corpus Luteum and the largest follicle were evaluated. On Day 30 after AI the size and vascular perfusion of the corpus luteum was evaluated. The pregnancy diagnosis was done on Day 30 after ovulation for all the three experiments. In the present study, it was found a positive correlation between the vascular perfusion and the size of the pre-ovulatory follicle, and the size and vascular perfusion of the corpus luteum. However, only in the experiments 1 and 3 the pregnancy rates increased with the increase in the corpus luteum vascular perfusion.

Key words: TFAI. Follicle. Corpus luteum. Vascular perfusion. Doppler.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho experimental 1.....	23
Figura 2 - Desenho experimental 2.....	24
Figura 3 - Desenho experimental 3.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos divididos por porcentagem de vascularização do corpo lúteo, média do tamanho do corpo lúteo e respectivas taxas de prenhez (Experimento 1)	27
Tabela 2 - Grupos divididos por porcentagem de vascularização do corpo lúteo, média do tamanho do corpo lúteo e taxa de prenhez (Experimento 2).....	28
Tabela 3 - Diâmetro e fluxo sanguíneo (FS) do folículo pré-ovulatório (FPO); diâmetro, área, fluxo sanguíneo e área de fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL) dos animais com diagnóstico de gestação (DG) positivas (+: n = 155) e negativas (-: n = 151).....	29
Tabela 4 - Divisão de cada parâmetro em dois grupos de menor e maior valores, baseando-se na mediana. Parâmetros analisados: diâmetro e fluxo sanguíneo (FS) do folículo pré-ovulatório (FPO); diâmetro, área, fluxo sanguíneo e área de fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL).....	30
Tabela 5 - Divisão de cada parâmetro em dois grupos de menor e maior valores, baseando-se no primeiro e quarto quartis. Parâmetros analisados: diâmetro e fluxo sanguíneo (FS) do folículo pré-ovulatório (FPO); diâmetro, área, fluxo sanguíneo e área de fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL).....	32
Tabela 6 - Grupos controle, tratado e combinado divididos em subgrupos da porcentagem de vascularização do CL no dia 30. FPO D0 = folículo pré-ovulatório no dia 0 (dia da IATF), média do tamanho do corpo lúteo nos dias 14 e 30 após IATF e taxa de prenhes ao dia 30 do experimento 3.....	34
Tabela 7 - Diâmetro e fluxo sanguíneo (FS) do folículo pré-ovulatório (FPO); diâmetro, área, fluxo sanguíneo e área de fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL) dos animais com diagnóstico de gestação (DG) positivas (+: n = 24) e negativas (-: n = 26).....	35
Tabela 8 - Divisão de cada parâmetro em dois grupos de menores e maiores valores, baseando-se na mediana. Parâmetros analisados: diâmetro e fluxo sanguíneo (FS) do folículo pré-ovulatório (FPO); diâmetro do maior folículo no D14, diâmetro do CL nos dias 14 e 60 e fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL).....	36
Tabela 9 - Divisão de cada parâmetro em dois grupos de menores e maiores valores, baseando-se no primeiro e terceiro quartis. Parâmetros analisados: diâmetro e fluxo sanguíneo (FS) do folículo pré-ovulatório (FPO); diâmetro do maior	

folículo no D14, diâmetro do CL nos dias 14 e 60 e fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL).....	37
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).....	15
2.2	Relação entre diâmetro e área dos folículos pré-ovulatórios vs área do corpo lúteo vs produção de progesterona e fertilidade.....	16
2.3	Ultrassonografia Doppler.....	17
2.4	Ultrassonografia Doppler em Folículos e Corpo lúteo.....	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e Transferência de embriões em tempo fixo (TETF)	21
3.2	Ultrassonografia	22
3.3	Experimento 1: Vascularização do corpo lúteo em vacas receptoras de embriões.....	22
3.4	Experimento 2: Avaliação comparativa dos diâmetros e áreas dos folículos e corpos lúteos e suas vascularizações com as taxas de prenhes em vacas submetidas a IATF.....	23
3.5	Experimento 3: Aplicação de eCG 14 dias após a inseminação artificial e melhora do corpo lúteo.....	24
3.6	Análises Estatísticas	25
4	RESULTADOS	27
4.1	EXPERIMENTO 1	27
4.2	EXPERIMENTO 2.....	28
4.3	EXPERIMENTO 3	32
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

As novas tendências da cadeia de produção de carne visam à proteção e a preservação do meio ambiente, competitividade em mercados internos e externos, adaptação às exigências do consumidor e redução nos custos de produção. Desse modo, o produtor é impelido a otimizar a atividade pecuária em um crescimento vertical, a fim de buscar maior produtividade em menores áreas.

O Brasil se destaca no mercado mundial de carne, contando com um rebanho de 212.8 milhões de cabeças, sendo considerado o maior rebanho comercial do mundo (IBGE, 2012). Entretanto, a exploração da atividade pecuária no país foi, por muitos anos, realizada de maneira extensiva, sem a aplicação de tecnologias e de manejo adequados que assegurassem maior eficiência na produção. Atualmente esta realidade vem mudando. O pecuarista, à procura de maior rentabilidade econômica, tem investido em melhoramento genético e biotecnologias. O resultado disso é o precoce abate de animais, melhor qualidade de carne e aumento da produção em uma menor área, tornando o Brasil cada vez mais agressivo e competitivo no setor.

Para potencializar a rentabilidade dos rebanhos de corte é fundamental investir em eficiência reprodutiva, ou seja, concentrar o maior número de nascimentos em menor tempo. Diversos fatores interferem na eficiência reprodutiva, sendo alguns exemplos, a sanidade do rebanho (PEREIRA et al., 2013), fatores nutricionais (DISKIN et al., 2003) e a genética dos animais (ARCHBOLD et al., 2012). Um adequado manejo de vacinação, a profissionalização da mão de obra e o manejo e tratamento de pastagens são fatores primários e essenciais para a melhoria da produção de gado de corte. Além disso, a associação desses fatores com as biotécnicas reprodutivas permite um aumento significativo da eficiência reprodutiva.

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a transferência de embriões (TE) são ferramentas muito utilizadas para a propagação de animais geneticamente superiores. Por este motivo, grupos de pesquisa vêm, há alguns anos desenvolvendo modificações nessas técnicas com o intuito de aperfeiçoá-las.

O presente estudo visou avaliar as relações entre o tamanho e a vascularização dos folículos pré-ovulatórios e do corpo lúteo nos níveis de progesterona e suas implicações nas taxas de prenhez, e propiciar um método não invasivo de análise ultrassonográfica para prever o sucesso de uma futura gestação.

Foi avaliado ainda, o efeito da aplicação de 400 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG), no 14º dia após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), na vascularização do corpo lúteo e seus efeitos nas taxas de prenhez. Outra análise realizada foi à estimativa da vascularização e tamanho do corpo lúteo no dia da transferência de embriões para avaliar diferenças nas taxas de prenhez relacionadas com diferentes graus de vascularização.

O desenvolvimento de pesquisas relacionadas às biotecnologias reprodutivas, se mostra necessário para a otimização dos resultados encontrados nas taxas de prenhez em vacas de produção. A eficiência reprodutiva desses animais está diretamente relacionada com a rentabilidade da atividade pecuária, sendo fundamental para o desenvolvimento econômico do setor no país.

O estudo teve como objetivo geral caracterizar um novo parâmetro de avaliação da funcionalidade do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo para predição da fertilidade pela avaliação da perfusão sanguínea (vascularização) por ultrassonografia Doppler, em vacas de corte, no momento da inseminação artificial e 11 dias após. Como objetivos específicos, foram pesquisados ainda, as relações entre: - tamanho e vascularização do folículo pré-ovulatório x tamanho e vascularização do corpo lúteo; - tamanho e vascularização do corpo lúteo x fertilidade.

As hipóteses apresentadas foram que:

- Vacas que apresentam folículos pré-ovulatórios maiores geram corpos luteos maiores e mais vascularizados, sendo as taxas de gestação resultantes significativamente maiores que em animais que apresentam uma situação oposta.

- Animais que apresentam maior vascularização do folículo pré-ovulatório terão um corpo lúteo mais vascularizado e conseqüentemente com maior produção de progesterona, propiciando melhor ambiente uterino, aumentando a chance de manutenção embrionária e, conseqüentemente, aumentando as taxas de prenhez.

- O uso do eCG no 14º dia após a IATF tende a possibilitar a formação de um corpo lúteo acessório, aumento da vascularização e melhora do ambiente uterino para o desenvolvimento da gestação.

- A formação de um novo corpo lúteo e o aumento da sua vascularização, aumentará os níveis de progesterona uterina, implicando em menores perdas gestacionais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IATF e TETF

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a transferência de embriões em tempo fixo (TETF) são procedimentos de manipulação hormonal onde o ciclo estral das fêmeas é sincronizado e a ovulação induzida de modo a ocorrer no mesmo momento na maioria dos animais sincronizados. Isso facilita o manejo de rebanhos com grande número de animais, pois os procedimentos de inseminação artificial ou de transferência de embriões podem então ser realizados num mesmo momento.

A IATF é uma biotécnica reprodutiva muito empregada tanto para a maior produtividade de uma criação como para a produção de animais geneticamente superiores. Cada vez mais, estudos são realizados para aumentar a eficiência desta técnica, envolvendo o melhor entendimento da dinâmica folicular, ovulação e das características do corpo lúteo (CL). Para isso, diversos tratamentos hormonais são utilizados visando uma melhor sincronização da ovulação e maior fertilidade (BISINOTTO ; SANTOS, 2011).

Sá Filho et al. (2010a), relataram em estudo com vacas sincronizadas que folículos maiores no momento da IATF resultaram em maiores taxas de prenhes.

Meneghetti e Vasconcelos (2008) avaliaram protocolos de IATF com as datas de parição e condição corporal e observaram uma maior taxa de prenhes em vacas de corte primíparas com maior escore corporal e uma menor condição corporal em vacas primíparas com maiores dias pós-parto, sugerindo uma estratégia nas datas de parto coincidindo com a data do início da estação de monta.

A TETF é outra biotécnica muito explorada para difundir animais geneticamente superiores. Baruselli et al. (2003), avaliaram a eficiência da sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo em novilhas *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus* e observaram que corpos lúteos com maior área obtiveram maiores concentrações de progesterona e taxas de concepção, e que a sincronização da ovulação para TETF aumentaram as taxas de ovulação, de aproveitamento e prenhez em novilhas receptoras de embrião.

Barreiros et al. (2006), analisando as taxas de prenhes em receptoras com corpos lúteos cavitários e compactos, submetidas a protocolos de TETF e sincronizadas com

prostaglandina, não observaram diferença significativa nas taxas de aproveitamento e de prenhez entre as receptoras tratadas com protocolos de TETF ou prostaglandina e nas receptoras com corpo lúteo cavitário ou compacto.

2.2 Relação entre diâmetro e área dos folículos pré-ovulatórios vs área do corpo lúteo vs produção de progesterona e fertilidade.

Estudos sobre a função luteal precoce e sua relação com as taxas de prenhes em vacas após IATF têm demonstrado uma correlação positiva entre a produção luteínica de progesterona e taxas de prenhes (BARUSELLI et al., 2012). Pesquisas recentes indicam que vacas apresentando diâmetros maiores do folículo pré-ovulatório produzem um corpo lúteo de maior tamanho e, conseqüentemente, determina uma maior produção de progesterona (BISINOTTO et al., 2012; MACHADO et al., 2008).

Muitos estudos com manipulações hormonais em programas de sincronização do ciclo estral e indução de ovulação foram e ainda têm sido realizados com o objetivo de manipular o desenvolvimento folicular ovariano de modo a aumentar a qualidade oocitária e as taxas de prenhes em vacas (BARUSELLI et al., 2004; SÁ FILHO et al., 2010a,b,c; SALES, 2011). Estes trabalhos mostraram que maiores taxas de prenhes são obtidas quando um corpo lúteo de maior tamanho está presente.

Wecker et al. (2012) avaliaram dois tratamentos hormonais utilizando eCG e hCG sete dias após a inseminação artificial em tempo fixo, e suas relações com o tamanho do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo e formação de corpos lúteos acessórios comparadas com taxas de prenhes. Os autores verificaram uma relação significativa entre o diâmetro do folículo ovulatório e o tamanho do corpo lúteo, porém não encontraram diferenças significativas nas taxas de prenhez.

Com o mesmo objetivo, Nuñez et al. (2011) analisaram o efeito da aplicação do eCG 14 dias após a inseminação em vacas e novilhas. O resultado mostrou aumento significativo nas taxas de prenhez em vacas do grupo tratado, e foi relacionado com o aumento da atividade luteal e melhor desenvolvimento placentário.

Rizzi et al. (2009) relataram que a aplicação de eCG em vacas leiteiras promoveu o crescimento folicular, aumento no tamanho do corpo lúteo e elevação nas concentrações de progesterona.

Mann (2009) descreveu relação positiva entre o tamanho do corpo lúteo e a produção de progesterona, especialmente entre os dias 4 e 6 após o estro, observando a importância deste aumento da progesterona na fase inicial embrionária e consequentemente entre a segunda e terceira semana devido ao reconhecimento materno. Lonergan (2011) encontrou em seus estudos clara relação entre alterações induzidas pela progesterona no ambiente uterino com o desenvolvimento embrionário, mesmo antes da presença do embrião, sendo que este aumento de progesterona induzido no início do ciclo estral influi na receptividade uterina.

2.3 Ultrassonografia Doppler

A ultrassonografia efeito Doppler pode ser definida, segundo Ginther e Utt (2004), como sendo o princípio físico no qual se verifica a alteração da frequência das ondas sonoras refletidas quando o objeto refletor se move em relação a uma fonte de onda sonora. Supondo que o transdutor do equipamento capte o movimento de um objeto analisado, deve-se esperar um deslocamento da frequência incidente sobre o objeto, promovendo aumento da resposta quando ambos se aproximam e redução quando se afastam.

O sistema vascular é responsável pelas trocas de nutrientes, gases, hormônios, fatores de crescimento e excreções entre tecidos e órgãos (FABER e THORNBURG, 1983). Herzog e Bollwein (2007) relataram o uso da ultrassonografia Doppler colorido como ferramenta para investigação do fluxo sanguíneo genital e novas informações sobre alterações fisiológicas dos órgãos genitais. A ultrassonografia Doppler tem sido utilizada na medicina humana com o intuito de acompanhar o ciclo estral de mulheres férteis, inférteis e explorar as causas de perdas gestacionais (STEER et al., 1990; STEER et al., 1994; FERREIRA et al., 2007). Diversos pesquisadores vêm estudando esta técnica, na medicina veterinária para compreender a vascularização e suas interferências no ciclo estral ou outras fases da vida reprodutiva dos animais, assim como durante a gestação (REED et al., 1996; NAUTRUP, 1998; BOLLWEIN et al., 2000; KÖSTER et al., 2001; BOLLWEIN et al., 2002a,b; BOLLWEIN et al., 2004; ALVAREZ-CLAU; LISTE, 2005; DI SALVO et al., 2006;

SCOTTI et al., 2008; BRITO et al., 2010; MIRANDA; DOMINGUES, 2010; POLISCA et al., 2010; BLANCO et al., 2011; PEREIRA et al., 2012a,b).

Pareja et al. (2010) relataram a possibilidade do mapeamento com Doppler colorido do sítio ovariano podendo observar e estimar quantitativamente as mudanças da vascularização intraovariana. Miyamoto et al. (2006) descreveram a importância da utilização da ultrassonografia Doppler para identificar o fluxo sanguíneo local, proporcionando uma estimativa facilmente obtida do estado fisiológico dos folículos, corpo lúteo e conceito.

Witt et al. (2012) verificaram, através de ultrassonografia Doppler, que o tratamento com gonadotrofinas para induzir a superovulação em éguas, está associado a aumento acentuado na perfusão uterina e ovariana, concomitante com o desenvolvimento de múltiplos folículos. Este fato, parece estar relacionado a eficácia da resposta à estimulação do ovário.

2.4 Ultrassonografia Doppler em Folículos e Corpo lúteo

Segundo Reynolds, Grazul-Bilska e Redmer (2000), o corpo lúteo é a primeira fonte de progesterona e devido a sua importância após a ovulação sua vascularização é constituída rapidamente.

Uma descrição do fluxo sanguíneo ovariano durante o ciclo estral de éguas foi publicado por Bollwein et al. (2002a). Eles demonstraram uma correlação positiva entre o aumento do fluxo vascular ovariano com o aumento dos níveis circulantes de estrógenos. Um estudo um pouco mais detalhado sobre a vascularização do corpo lúteo em éguas usando ultrassonografia em modo color-Doppler indicou um aumento do fluxo sanguíneo temporalmente associado com a atividade do corpo lúteo (BOLLWEIN et al., 2002b).

Extensa formação vascular (angiogênese) ocorre na parede folicular durante seu desenvolvimento até que a ovulação ocorra (GEVA; JAFFE 2000; REISINGER et al., 2007) e as alterações da perfusão sanguínea ovariana tem sido correlacionada, em vários estudos, com os diferentes estágios do desenvolvimento folicular nas diversas ondas de crescimento (ACOSTA et al., 2005), com o aparecimento do pico de LH na fase folicular pré-ovulatória (ACOSTA et al., 2003), com folículos pré-ovulatórios em éguas (GASTAL et al., 2006), com o desenvolvimento de folículos císticos em vacas (RAUCH et al., 2008), com folículos em fases de transição em éguas (ACOSTA et al., 2004a; GASTAL et al., 2007), com os processos

de seleção e dominância folicular em éguas (ACOSTA et al., 2004b), dentre vários outros estudos.

Todos estes trabalhos mostraram aspectos das alterações de fluxo sanguíneo relacionadas às alterações morfológicas e funcionais (endócrinas) nos folículos ovarianos. Recentemente, alguns estudos avaliaram a relação entre o fluxo sanguíneo folicular e a eficiência reprodutiva.

A extensão da perfusão sanguínea na parede perifolicular foi avaliada por color-Doppler e o seu aumento têm sido positivamente associados com melhores taxas de prenhes em mulheres (COULAM et al., 1999; BHAL et al., 2001; BORINI et al., 2001). Um estudo realizado em mulheres submetidas à fertilização in vitro mostrou que folículos bem vascularizados desde o início da onda folicular e no dia do tratamento com hCG, no final da onda folicular, resultaram em maiores taxas de prenhes depois da transferência do embrião (SHRESTHA et al., 2006).

Resultados de outro estudo indicaram que o escaneamento pelo modo spectral-Doppler para cálculo de índices de vascularidade da porção distal da artéria ovariana pode ser útil para o acesso à qualidade oocitária (DU et al., 2006). Estes estudos foram a base inicial para os estudos similares em grandes animais. Em grandes animais, o primeiro estudo utilizando a ultrassonografia em modo color-Doppler para a avaliação da perfusão perifolicular foi realizado em éguas (SILVA et al., 2006). Os autores mostraram que uma perfusão perivascular elevada após injeção de hCG estava correlacionada à elevadas taxas de prenhez após inseminação. Outro estudo similar foi realizado com novilhas (SIDDIQUI et al., 2008) e os resultados foram similares aos achados previamente descritos em éguas, confirmando os primeiros e demonstrando a correlação entre perfusão perifolicular e fertilidade em duas espécies diferentes.

Utt et al. (2009) avaliaram a vascularização do corpo lúteo como um possível indicador de fertilidade ou prenhez em vacas. Eles concluíram que a avaliação da vascularização do corpo lúteo não é específica e sensível o suficiente para prever a prenhez precocemente. Estudos detalhados sobre os aspectos fisiológicos das alterações do fluxo sanguíneo em corpos lúteos durante sua formação e luteólise em éguas e vacas tem sido publicados e podem ser visitados para maior aprofundamento nesta área (ACOSTA; MIYAMOTO 2004; MIYAMOTO et al., 2005; GINTHER et al., 2007). Durante o desenvolvimento precoce do corpo lúteo, o fluxo sanguíneo aumenta paralelamente ao aumento da concentração circulante de progesterona, sendo então a vascularidade associada com o potencial luteal em produzir progesterona (ACOSTA et al., 2003). Este estudo

demonstrou o imenso potencial e aplicabilidade da ultrassonografia Doppler como uma ferramenta de pesquisa com a qual é possível entender, em exame não invasivo, as respostas e necessidades teciduais ao fluxo sanguíneo.

A dinâmica folicular, ovulação, formação do CL, bem como a preparação do endométrio para a gestação são dependentes do estabelecimento de vascularização adequada para uma melhor produção hormonal durante as diferentes fases do ciclo estral (PINTO, 2009). Uma técnica não invasiva para a avaliação da vascularização de órgãos reprodutivos é a ultrassonografia transretal no modo Doppler. Por meio dessa técnica, a perfusão sanguínea dos ovários e do útero pode ser acessada, sendo as imagens avaliadas subjetivamente ou objetivamente (GINTHER, 2007). Embora envolva equipamentos caros e utilizados somente em pesquisa, a utilização desse tipo de avaliação poderá ser difundida à campo caso proporcione um retorno financeiro significativo à criação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi dividido em 3 experimentos. No primeiro, foi avaliado a vascularização do corpo lúteo no momento da transferência de embriões, e a sua relação com as taxas de prenhez. Para este estudo foram utilizadas 43 vacas multíparas da raça Nelore como receptoras.

O experimento 2 analisou a área e a vascularização do folículo pré-ovulatório no momento da inseminação artificial. O grupo utilizado neste experimento foi composto por 155 vacas, 51 novilhas e 80 primíparas da raça Nelore e 21 vacas multíparas da raça Tabapuã. Os animais foram submetidos a protocolo de sincronização de estro e ovulação, e após 11 dias foi avaliado a área, o diâmetro e a vascularização do corpo lúteo. O diagnóstico gestacional foi realizado no dia 30 após a inseminação.

No terceiro experimento foram utilizadas 37 vacas multíparas da raça Nelore e 13 vacas Cruzadas, as quais foram submetidas ao mesmo protocolo de sincronização de estro e ovulação do experimento 2. Neste grupo, foi analisado, inicialmente a área dos folículos, no momento da inseminação artificial e após 14 dias administrou-se 400 UI de eCG para avaliação do tamanho do corpo lúteo e dos folículos existentes. O diagnóstico gestacional foi realizado após 30 dias da inseminação, permitindo analisar as correlações da aplicação do eCG com aumento da vascularização e taxas de prenhez.

3.1 Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e Transferência de embriões em tempo fixo (TETF)

Todos os animais dos três experimentos receberam o mesmo protocolo de sincronização de estro e ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. O protocolo consistiu em:

- Colocação do implante intravaginal de liberação lenta de progesterona (Sincrogest®) de 2º uso e administração de 2 ml de benzoato de estradiol (Sincrodiol®) intramuscular;

- Retirada do implante intravaginal de progesterona após 8 dias e aplicação intramuscular de 2 ml de prostaglandina (Sincrocio®), 0.5 ml de cipionato de estradiol (E.C.P.®) e 1.5 ml de gonadotrofina coriônica eqüina (Folligon®)

Após 48 horas da retirada dos implantes, todas as vacas dos experimentos 2 e 3 foram inseminadas artificialmente em tempo fixo, sendo este considerado o Dia 0 destes experimentos

Nos animais do experimento 1, embriões foram transferidos nove dias após a retirada dos implantes. O dia da ovulação (48 horas após a retirada dos implantes) foi considerado o Dia 0 para este experimento.

3.2 Ultrassonografia

Análises ultrassonográficas foram feitas no modo B e Doppler colorido, a fim de mensurar tanto as dimensões quanto vascularização das estruturas ovarianas.

As imagens obtidas durante a avaliação ultrassonográfica foram gravadas para posterior análise. As mensurações das estruturas foram feitas nas imagens gravadas, por meio de um software, a fim de minimizar o tempo de contenção do animal.

As estruturas mensuradas foram: diâmetro do folículo e corpo lúteo e área do corpo lúteo. No caso de corpos lúteos cavitários, o diâmetro e área da cavidade foram subtraídos dos valores totais para o cálculo real do diâmetro e área luteais. As análises da vascularização pelo modo Doppler colorido foram feitas subjetivamente em graus de vascularização (0 – 100 %), ou seja, pela porcentagem de área com sinais de vascularização em relação à área total do tecido avaliado.

3.3 Experimento 1: Vascularização do corpo lúteo em vacas receptoras de embriões

Neste experimento foram utilizadas 43 vacas multíparas da raça Nelore como receptoras. Todos os animais selecionados para receberem os embriões foram submetidos ao protocolo de sincronização de estro e ovulação e apresentavam um corpo lúteo no dia da

transferência dos embriões (TE). Vale ressaltar que os procedimentos de TE foram realizados por um único médico veterinário.

Os embriões transferidos foram produzidos pelo método de fertilização *in vitro* e os oócitos aspirados foram provenientes de 10 vacas doadoras da raça Brangus. O sêmen utilizado fora de um mesmo touro, sendo transferidos apenas embriões de grau 1 para todas as receptoras, a fim de proporcionar o máximo de homogeneidade possível. O critério utilizado para selecionar os embriões como sendo de grau 1 segue os padrões estabelecidos pela International Embryo Transfer Society (IETS).

A transferência de embriões ocorreu sete dias após a ovulação, no corno uterino do mesmo lado onde fora observado presença de corpo lúteo (D7). Neste momento foram realizadas análises ultrassonográficas no modo B e Doppler colorido, a fim de mensurar tanto as dimensões quanto a vascularização do corpo lúteo.

Após a transferência dos embriões, os animais permaneceram em um mesmo piquete com pastagem, água e sal mineral à vontade. Vinte e três dias após a transferência dos embriões (D30), os animais foram submetidos a diagnóstico gestacional (Figura 1).

Em seguida, os 43 animais do experimento foram divididos em grupos, formados de acordo com as porcentagens de vascularização de seus corpos lúteos.

Figura 1 - Desenho experimental 1

- D7: Escaneamento ultrassonográfico via transretal no modo Doppler colorido para avaliação da perfusão sanguínea luteal segundo Silva et al., (2006) e Utt et al. (2009).
- D7: Escaneamento ultrassonográfico via transretal no modo B para mensuração do corpo lúteo.
- D30: Diagnóstico de gestação a partir do Dia 30 após a ovulação.

3.4 Experimento 2: Avaliação comparativa dos diâmetros e áreas dos folículos e corpos lúteos e suas vascularizações com as taxas de prenhez em vacas submetidas a IATF

Neste experimento (Figura 2) foram utilizados 307 animais divididos nas seguintes categorias: novilhas nelore (n = 51), primíparas nelore (n = 80), vacas nelore (n = 155) e vacas tabapuã (n = 21). As análises por ultrassonografia transretal foram feitas imediatamente antes da IA e 11 dias após a IA. No dia 30 após à IA foi realizado o diagnóstico de gestação. Análises ultrassonográficas foram feitas no modo B e Doppler colorido, a fim de mensurar tanto as dimensões quanto a vascularização das estruturas.

As inseminações foram realizadas pelo mesmo operador e utilizado sêmen de um único touro com uma mesma partida.

Os animais que não apresentaram corpo lúteo foram excluídos do experimento.

Figura 2: Desenho experimental 2

- D0 e D11: Escaneamento ultrassonográfico via transretal no modo Doppler colorido para avaliação da perfusão sanguínea perifollicular e luteal segundo Silva et al. (2006) e Utt et al. (2009).
- D0 e D11: Escaneamento ultrassonográfico via transretal no modo B para mensuração do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo.
- D30: Diagnóstico de gestação a partir do Dia 30 após inseminação artificial (IA).

3.5 Experimento 3: Aplicação de eCG 14 dias após a inseminação artificial e melhora do corpo lúteo

Neste experimento foram utilizados 50 animais divididos nas seguintes categorias: vacas multíparas Nelore (n = 37) e vacas multíparas cruzadas (n = 13).

Nas vacas Nelore fora utilizado um touro apenas, sendo suas doses de sêmen divididas em 2 partidas, e nas vacas cruzadas foram utilizados 2 touros, cada um com uma única partida. Todas as doses utilizadas foram avaliadas quanto a motilidade, patologias, vigor, turbilhonamento e aspecto, não havendo diferença significativa entre as doses.

No momento da inseminação artificial (D0) os folículos pré-ovulatórios foram mensurados quanto ao diâmetro e área, e também foram anotados os escores corporais dos animais. Os animais foram divididos em grupo tratado e grupo controle de acordo com o tamanho do folículo e escore corporal, para manter dois grupos uniformes. Após 14 dias da inseminação artificial os animais do grupo tratado receberam 400UI de eCG intramuscular e os animais do grupo controle receberam 2ml de solução fisiológica. O diagnóstico gestacional dos animais foi realizado 30 dias após a IA, quando foram mensurados o tamanho e vascularização do corpo lúteo (Figura 3), pelo mesmo método aplicado nos experimentos 1 e 2.

Figura 3 - Desenho experimental 3

- D0 e D14: Escaneamento ultrassonográfico via transretal no modo B para mensuração do folículo e do corpo lúteo
- D30: Escaneamento ultrassonográfico via transretal no modo Doppler colorido para avaliação da perfusão sanguínea luteal segundo Silva et al. (2006) e Utt et al. (2009).
- D30: Diagnóstico de gestação a partir do Dia 30 após inseminação artificial (IA).

3.6 Análises Estatísticas

Comparações entre proporções foram feitas pelo teste de Qui-quadrado. Dados objetivos foram verificados para normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Dados não normais

foram transformados para adquirirem normalidade (ex. escala logarítmica). Após verificação da normalidade, análise de variância foi feita com o uso do programa SAS (GLM procedure; version 9.2; SAS Institute, Inc., Cary, NC) para determinação dos efeitos principais e de interação. Teste *t*-student foi utilizado para localizar diferenças entre médias dentro do mesmo grupo ou entre grupos quando efeitos principais e/ou de interação foram significativos. Probabilidade entre $P \leq 0.10$ e $P > 0.05$ indicou tendência à significância e $P \leq 0.05$ indicou significância.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1

Neste experimento, os animais foram selecionados antes do início do protocolo pela sua ciclicidade e escore corporal, sendo divididos, no momento da transferência dos embriões, em grupos de acordo com a porcentagem de vascularização do corpo lúteo. A partir de então, obteve-se a média do diâmetro do corpo lúteo de acordo com vascularização para cada grupo. Foram separados quatro grupos distintos, sendo estes de 40%, 50%, 60% e 70% da área do corpo lúteo vascularizado. A análise do percentual de vascularização foi feita de forma subjetiva, e encontra respaldo na literatura conforme estudos anteriores. Quando avaliado o diâmetro do corpo lúteo no D7 com as taxas de prenhez (D30) não foram encontradas diferenças expressivas entre maior taxa de prenhez em animais com área de corpo lúteo maior ($P > 0.05$). O mesmo ocorreu ao comparar a área do corpo lúteo com a sua vascularização, onde não foi encontrada relação entre o tamanho e a vascularização do corpo lúteo ($P > 0.05$), indicando que mesmo corpos lúteos de menor área podem ser mais vascularizados ou vice versa, entretanto, esses resultados não foram estatisticamente significantes. Ao avaliarmos a vascularização do corpo lúteo com as taxas de prenhez, encontramos um efeito positivo para um aumento de prenhez relacionado à maior vascularização do corpo lúteo ($P < 0.05$), conforme ilustrado na tabela 1.

Tabela 1 - Grupos divididos por porcentagem de vascularização do corpo lúteo, média do tamanho do corpo lúteo e respectivas taxas de prenhez – transferência de embriões (Experimento 1)

Grupos (% Vascularização do CL)	N	Diâmetro do CL (D7) (mm)	Taxa de prenhez (%)
Até 40	12	17,51	0,0 (0/12) ^a
41-50	10	16,69	40,0 (4/10) ^b
51-60	11	16,84	45,4 (5/11) ^b
61-70	10	17,56	60,0 (6/10) ^b
Total	43	Média/desvios	34,88 (15/43)

P<0,05

4.2 Experimento 2

Como no experimento 1, os animais foram organizados em grupos por porcentagem de vascularização do corpo lúteo, sendo apresentados o diâmetro médio do corpo lúteo e as taxas de prenhez (tabela 2). Cinco grupos de vascularização foram formados, sendo estes de até 40%, de 41 a 50%, de 51 a 60%, de 61 a 70% e acima de 70% da área do corpo lúteo vascularizado. Quando avaliado o diâmetro do corpo lúteo com as taxas de prenhez também não foram encontradas diferenças entre maior taxa de prenhez em animais com área de corpo lúteo maiores ($P > 0.05$). Na análise da área do corpo lúteo com a sua vascularização, também não foram verificadas relações entre o tamanho do corpo lúteo e a vascularização ($P > 0.05$). Porém quando avaliado a vascularização do corpo lúteo com as taxas de prenhez, diferentemente do resultado do primeiro experimento, não houve uma variação positiva para um aumento de prenhez paralelamente a um aumento da vascularização do corpo lúteo ($P > 0.05$), conforme ilustrado na tabela 2.

Tabela 2 - Grupos divididos por porcentagem de vascularização do corpo lúteo, média do tamanho do corpo lúteo e taxa de prenhez – Inseminação artificial em tempo fixo (Experimento 2)

Grupos (% Vascularização do CL)	N	Diâmetro do CL (D11) (mm)	Taxa de prenhez (%)
Até 40	83	17,07	47,0 (39/83) ^a
41-50	108	17,24	57,4 (62/108) ^a
51-60	62	17,52	54,8 (34/62) ^a
61-70	25	17,09	56,0 (13/25) ^a
Acima de 71	10	17,60	30,0 (3/10) ^b
TOTAL	288	Desvio/média	52,4% (151/288)

$P < 0,05$

Os valores médios do diâmetro e do fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório, e do diâmetro, área, fluxo sanguíneo e área de fluxo sanguíneo do corpo lúteo entre os animais gestantes e não gestantes, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P >$

0.05). Porém, uma tendência a diferença estatística foi encontrada entre as áreas dos corpos lúteos dos grupos gestantes e não gestantes ($P = 0.07$; tabela 3).

Tabela 3 - Diâmetro e fluxo sanguíneo (FS) do folículo pré-ovulatório (FPO); diâmetro, área, fluxo sanguíneo e área de fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL) dos animais com diagnóstico de gestação (DG) positivas (+: $n = 155$) e negativas (-: $n = 151$)

	Diâmetro do FPO	FS do FPO	Diâmetro do CL	Área do CL	FS do CL	Área de FS do CL
DG +	$13,0 \pm 0,25$	$29,4 \pm 2,1$	$17,52 \pm 0,3$	$2,86 \pm 0,1$	$51,99 \pm 1,0$	$1,49 \pm 0,0$
DG -	$12,7 \pm 0,31$	$29,3 \pm 2,0$	$17,17 \pm 0,3$	$2,74 \pm 0,1$	$51,46 \pm 1,2$	$1,42 \pm 0,0$
<i>P</i>	0,21	0,48	0,21	0,07	0,36	0,12

O valor de *P* está representado na base da tabela. Não houve diferença estatística entre os parâmetros analisados, sendo observado somente uma tendência a uma área maior de CL para o grupo com DG +.

As médias de cada parâmetro entre si foram avaliadas para verificação da hipótese de que um aumento no diâmetro e fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório representaria posteriormente um aumento no diâmetro, área, fluxo sanguíneo e área do fluxo sanguíneo do corpo lúteo. Para isso, para cada parâmetro avaliado foi calculado a mediana. Os animais foram então divididos em dois grupos. Os dados dos demais parâmetros foram então calculados. Esse procedimento repetido para cada parâmetro. A mediana é uma medida de tendência central, portanto analisou-se os valores da metade superior e inferior de cada parâmetro para obter-se os resultados.

Quando fixado os dados pela mediana do diâmetro do folículo pré-ovulatório entre os grupos menor e maior, com os demais parâmetros, notou-se um aumento na área, no fluxo sanguíneo e área do fluxo sanguíneo do corpo lúteo entre os animais com maior folículo pré-ovulatório (Tabela 4; $P < 0.05$). Quando avaliados, os dados fixados pela mediana do fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório mostraram um aumento também no fluxo sanguíneo e na área do fluxo sanguíneo do corpo lúteo nos animais que apresentaram um maior fluxo sanguíneo no folículo pré-ovulatório (Tabela 4; $P < 0.05$).

Ao avaliar o diâmetro do corpo lúteo verificou-se aumento na área do CL e na área do fluxo sanguíneo do CL nos animais que apresentaram maior diâmetro do corpo lúteo (Tabela 4; $P < 0.05$). Na análise da área do corpo lúteo observou-se no grupo de animais que apresentaram maior área, um aumento no diâmetro do folículo pré-ovulatório e na área do

fluxo sanguíneo, como encontrado na avaliação do diâmetro do folículo pré-ovulatório, porém foi encontrado também um aumento no diâmetro do corpo lúteo (Tabela 4; $P < 0.05$).

Avaliando o fluxo sanguíneo do corpo lúteo, nos animais do grupo com maior fluxo verificou-se um aumento no diâmetro do folículo pré-ovulatório, na área do fluxo sanguíneo do corpo lúteo e no fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório (Tabela 4; $P < 0.05$).

Os animais com maior área do fluxo sanguíneo do corpo lúteo demonstraram aumento em todos os parâmetros avaliados (Tabela 4; $P < 0.05$).

Tabela 4 - Divisão de cada parâmetro em dois grupos de menor e maior valores, baseando-se na mediana. Parâmetros analisados: diâmetro e fluxo sanguíneo (FS) do folículo pré-ovulatório (FPO); diâmetro, área, fluxo sanguíneo e área de fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL)

	Mediana		Diâmetro do FPO	FS do FPO	Diâmetro do CL	Área do CL	FS do CL	Área de FS do CL
Diâmetro do FPO	12,6	Menor	11,4 ± 0,1	27,7 ± 2,1	17,5 ± 0,3	2,8 ± 0,1	46,8 ± 1,1	1,3 ± 0,1
		Maior	14,7 ± 0,2	32,2 ± 1,9	17,8 ± 0,4	3,1 ± 0,1 ^a	51,7 ± 1,2 ^b	1,6 ± 0,1 ^c
FS do FPO	30,0	Menor	13,0 ± 0,2	12,2 ± 0,7	17,9 ± 0,4	3,0 ± 0,1	46,4 ± 1,1	1,4 ± 0,1
		Maior	13,3 ± 0,2	44,5 ± 1,4	17,5 ± 0,3	2,9 ± 0,1	52,0 ± 1,3 ^d	1,5 ± 0,1 ^e
Diâmetro do CL	18,1	Menor	13,0 ± 0,2	31,0 ± 2,0	15,0 ± 0,2	2,6 ± 0,1	49,3 ± 1,2	1,3 ± 0,1
		Maior	13,2 ± 0,2	29,2 ± 2,1	20,3 ± 0,2	3,2 ± 0,1 ^f	49,4 ± 1,2	1,6 ± 0,1 ^g
Área do CL	2,8	Menor	12,5 ± 0,2	29,0 ± 1,9	16,2 ± 0,3	2,4 ± 0,1	48,3 ± 1,2	1,2 ± 0,1
		Maior	13,7 ± 0,2 ^h	31,3 ± 2,1	19,1 ± 0,3 ⁱ	3,5 ± 0,1	50,4 ± 1,2	1,7 ± 0,1 ^j
FS do CL	50,0	Menor	12,5 ± 0,2	25,9 ± 2,1	17,7 ± 0,4	3,0 ± 0,1	38,9 ± 0,6	1,2 ± 0,1
		Maior	13,6 ± 0,2 ^k	33,6 ± 1,9 ^l	17,6 ± 0,3	2,9 ± 0,1	58,1 ± 0,8	1,7 ± 0,1 ^m
Área de FS do CL	1,4	Menor	12,3 ± 0,2	26,4 ± 1,9	16,6 ± 0,3	2,5 ± 0,1	42,3 ± 0,9	1,1 ± 0,1
		Maior	13,9 ± 0,2 ⁿ	33,6 ± 2,0 ^o	18,7 ± 0,3 ^p	3,3 ± 0,1 ^q	56,4 ± 1,1 ^r	1,8 ± 0,1

As médias ± erro padrão médio do parâmetro utilizado para a divisão dos dois grupos estão em negrito. Valores com diferenças estatísticas significativas estão destacadas em cinza. Letras minúsculas sobrescritas representam os seguintes valores de p : ^a $p = 0,0004$; ^b $p = 0,001$; ^c $p < 0,0001$; ^d $p = 0,0007$; ^e $p = 0,02$; ^f $p < 0,0001$; ^g $p < 0,0001$; ^h $p = 0,0001$; ⁱ $p < 0,0001$; ^j $p < 0,0001$; ^k $p < 0,0001$; ^l $p = 0,003$; ^m $p < 0,0001$; ⁿ $p < 0,0001$; ^o $p = 0,006$; ^p $p < 0,0001$; ^q $p < 0,0001$; ^r $p < 0,0001$.

Avaliou-se também os parâmetros analisados até então, baseando-se no primeiro e quarto quartis, separando 25% da menor e 25% da maior parte dos dados coletados. Nesta avaliação, quando mensurados o diâmetro do folículo pré-ovulatório, houve um aumento no fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório, da área do corpo lúteo e também do fluxo sanguíneo e área do fluxo sanguíneo do corpo lúteo (Tabela 5; $P < 0.05$).

Na análise do fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório, houve um aumento no diâmetro do folículo pré-ovulatório, e aumento do fluxo sanguíneo e área do fluxo sanguíneo do corpo lúteo, nos animais com fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório maior (Tabela 5; $P < 0.05$).

Os animais com corpo lúteo de maior diâmetro apresentaram também, aumento no diâmetro do folículo pré-ovulatório, da área do CL e na área do fluxo do corpo lúteo (Tabela 5; $P < 0.05$). Nos animais com maior área do corpo lúteo verificou-se um aumento no diâmetro do folículo pré-ovulatório, do diâmetro do CL e na área do fluxo do corpo lúteo (Tabela 5; $P < 0.05$). No grupo de animais com maior fluxo sanguíneo do corpo lúteo, foram encontrados animais com maior diâmetro e fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório e também da área do fluxo sanguíneo do corpo lúteo (Tabela 5; $P < 0.05$).

Por fim, ao avaliar os animais com maior área do fluxo sanguíneo do corpo lúteo observou-se animais com maior diâmetro do folículo pré-ovulatório e área, fluxo sanguíneo e área do fluxo sanguíneo do corpo lúteo (Tabela 5; $P < 0.05$).

Tabela 5 - Divisão de cada parâmetro em dois grupos de menores e maiores valores, baseando-se no primeiro e terceiro quartis. Parâmetros analisados: diâmetro e fluxo sanguíneo (FS) do folículo pré-ovulatório (FPO); diâmetro, área, fluxo sanguíneo e área de fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL)

	Quartilhes	Diâmetro do FPO	FS do FPO	Diâmetro do CL	Área do CL	FS do CL	Área de FS do CL
Diâmetro do FPO	1º (11,8)	10,6 ± 0,1	27,8 ± 2,8	17,7 ± 0,4	2,6 ± 0,1	46,7 ± 1,7	1,2 ± 0,1
	3º (14,3)	16,3 ± 0,2	34,1 ± 2,5 ^a	18,1 ± 0,5	3,2 ± 0,1 ^b	56,7 ± 1,8 ^c	1,8 ± 0,1 ^d
FS do FPO	1º (10)	12,7 ± 0,3	7,7 ± 0,5	17,8 ± 0,5	2,9 ± 0,1	46,4 ± 1,2	1,4 ± 0,1
	3º (40)	13,6 ± 0,3 ^e	51,9 ± 1,6	17,3 ± 0,4	2,9 ± 0,1	51,9 ± 1,6 ^f	1,5 ± 0,1 ^g
Diâmetro do CL	1º (15,6)	12,1 ± 0,3	29,2 ± 2,8	15,3 ± 0,3	2,2 ± 0,1	49,8 ± 1,7	1,1 ± 0,1
	3º (20,0)	13,8 ± 0,3 ^h	31,4 ± 2,8	20,1 ± 0,4	3,8 ± 0,1 ⁱ	49,1 ± 1,5	1,9 ± 0,1 ^j
Área do CL	1º (2,4)	12,1 ± 0,3	29,2 ± 2,8	15,4 ± 0,3	2,2 ± 0,1	50,0 ± 1,7	1,1 ± 0,1
	3º (3,3)	13,8 ± 0,3 ^k	31,4 ± 2,8	20,1 ± 0,4 ^l	3,8 ± 0,1	49,1 ± 1,5	1,9 ± 0,1 ^m
FS do CL	1º (40)	12,4 ± 0,2	26,2 ± 2,5	17,4 ± 0,4	2,9 ± 0,1	36,4 ± 0,6	1,1 ± 0,1
	3º (60)	14,1 ± 0,3 ⁿ	35,4 ± 2,3 ^o	17,4 ± 0,4	2,9 ± 0,1	64,4 ± 0,8	1,9 ± 0,1 ^p
Área de FS do CL	1º (1,1)	12,2 ± 0,3	30,2 ± 2,9	16,3 ± 0,4	2,4 ± 0,1	37,1 ± 1,0	0,9 ± 0,1
	3º (1,8)	14,5 ± 0,3 ^q	32,6 ± 2,7	19,8 ± 0,4 ^r	3,5 ± 0,1 ^s	60,4 ± 1,5 ^t	2,1 ± 0,1

As médias ± erro padrão médio do parâmetro utilizado para a divisão dos dois grupos estão em negrito. Valores com diferenças estatísticas significativas estão destacadas em cinza. Letras minúsculas sobrescritas representam os seguintes valores de p : ^a $p = 0,05$; ^b $p < 0,0001$; ^c $p < 0,0001$; ^d $p < 0,0001$; ^e $p = 0,007$; ^f $p = 0,004$; ^g $p = 0,03$; ^h $p < 0,0001$; ⁱ $p < 0,0001$; ^j $p < 0,0001$; ^k $p < 0,0001$; ^l $p < 0,0001$; ^m $p < 0,0001$; ⁿ $p < 0,0001$; ^o $p = 0,0004$; ^p $p < 0,0001$; ^q $p < 0,0001$; ^r $p < 0,0001$; ^s $p < 0,0001$; ^t $p < 0,0001$.

4.3 Experimento 3

Neste experimento os grupos foram divididos também de acordo com as porcentagens de vascularização do corpo lúteo aos 30 dias após a inseminação artificial em tempo fixo. Dentro destes grupos foram analisados os seguintes parâmetros: diâmetro do corpo lúteo aos 14 dias após a inseminação; diâmetro do corpo lúteo 30 dias após a inseminação; e taxas de prenhez. Inicialmente, foi notado um aumento no diâmetro do corpo lúteo do dia 14 para o dia 30 após a inseminação, porém esse aumento não teve relação com as taxas de prenhez ($P > 0.05$), nem mesmo com a vascularização do corpo lúteo ($P > 0.05$). Quando avaliado o diâmetro do corpo lúteo no dia 30 com as taxas de prenhez, houve um pequeno aumento na

taxa de prenhez com o aumento do diâmetro do CL, porém sem significância estatística ($P > 0.05$). Ao analisar a vascularização do corpo lúteo aos 30 dias após a inseminação, o resultado demonstrou aumento significativo nas taxas de prenhez, tanto do grupo tratado com eCG, quanto do grupo controle ($P < 0.05$), conforme aumentou a vascularização do corpo lúteo, como ilustrado na Tabela 6. Quando avaliado o diâmetro do folículo pré-ovulatório, notou-se um aumento significativo no diâmetro do corpo lúteo aos 14 dias e aos 30 dias e também das taxas de prenhez, em ambos os grupos ($P < 0.05$).

Na comparação dos grupos tratados e controle, o resultado demonstrou aumento significativo no tamanho do corpo lúteo entre os dias 14 e 30 após a inseminação do grupo tratado em relação ao grupo controle ($P < 0.05$), porém esse aumento não foi significativo em relação ao aumento nas taxas de prenhez ($P > 0.05$).

Resultados

Tabela 6 - Grupos controle, tratado e combinado divididos em subgrupos da porcentagem de vascularização do CL no dia 30. FPO D0 = folículo pré-ovulatório no dia 0 (dia da IATF), média do tamanho do corpo lúteo nos dias 14 e 30 após IATF e taxa de prenhez ao dia 30 do experimento 3

Grupos	% Vascularização do CL D30	N	Diâmetro do FPO D0(mm)	Diâmetro do CL D14(mm)	Diâmetro do CL D30(mm)	Taxa de prenhez D30 (%; N)
Controle	Até 40	4	9,5 ± 2,0	14,6 ± 3,2	17,8 ± 0,4	25,0 (1/4)
	41-50	4	12,5 ± 0,9	16,8 ± 1,2	17,3 ± 0,8	25,0 (1/4)
	51-60	9	13,3 ± 1,8	15,2 ± 0,8	18,5 ± 0,4	22,2 (2/9)
	61-70	6	13,4 ± 1,6	16,5 ± 2,5	18,4 ± 0,6	66,6 (4/6)
	Acima de 71	4	14,7 ± 0,7	15,7 ± 2,4	19,0 ± 0,6	100 (4/4)
	P		> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,0557
Tratado	Até 40	4	14,8 ± 0,3 ^a	12,9 ± 3,8	17,8 ± 1,1	25,0 (1/4)
	41-50	5	12,3 ± 1,3 ^{ab}	14,3 ± 1,5	19,0 ± 0,8	20,0 (1/5)
	51-60	5	10,8 ± 0,9 ^b	16,4 ± 0,9	19,4 ± 0,4	40,0 (2/5)
	61-70	7	11,2 ± 0,6 ^b	15,8 ± 0,8	19,9 ± 0,6	85,7 (6/7)
	Acima de 71	2	13,7 ± 0,5 ^a	16,4 ± 2,1	21,4 ± 0,2	100 (2/2)
	P		0,0360	> 0,05	> 0,05	0,0736
Combinado	Até 40	8	12,5 ± 1,3	13,8 ± 2,2	18,0 ± 0,6	25,0 (2/8) ^a
	41-50	9	12,4 ± 0,7	15,4 ± 1,0	18,2 ± 0,6	22,2 (2/9) ^a
	51-60	14	11,9 ± 1,2	15,8 ± 0,6	18,6 ± 0,3	28,8 (4/14) ^a
	61-70	13	12,3 ± 0,9	16,1 ± 1,2	19,2 ± 0,5	76,9 (10/13) ^b
	Acima de 71	6	14,3 ± 0,5	15,9 ± 1,6	19,8 ± 0,6	100 (6/6) ^b
	P		> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,0018

Ao analisar o diâmetro do folículo pré-ovulatório com as taxas de prenhez não foram encontrados resultados significativos entre maior e menor diâmetro ($P > 0.05$), nem mesmo quando comparados entre os grupos tratado e controle ($P > 0.05$). Quando avaliou-se o diâmetro do folículo pré-ovulatório com o diâmetro do corpo lúteo aos 14 e 30 dias após a inseminação os resultados encontrados não foram significativos entre os grupos tratados e controle ($P > 0.05$) e também entre os animais com prenhez positiva ou negativa ($P > 0.05$).

Comparando a vascularização do corpo lúteo aos 30 dias notou-se um aumento no fluxo sanguíneo dos animais do grupo tratado em relação aos animais do grupo controle ($P < 0.05$; Tabela 7).

Tabela 7 - Diâmetro e fluxo sanguíneo (FS) do folículo pré-ovulatório (FPO); diâmetro, área, fluxo sanguíneo e área de fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL) dos animais com diagnóstico de gestação (DG) positivas (+: n = 24) e negativas (-: n = 26)

Grupos	DG	N	Diâmetro do FPO D0	Diâmetro do CL D14	Diâmetro do CL D30	% Vascularização do CL D30
Controle	+	11	13,3 ± 0,7	15,5 ± 1,3	18,6 ± 0,4	68 ± 4 ^a
	-	14	12,6 ± 1,3	15,9 ± 1,0	18,0 ± 0,3	54 ± 3 ^b
	P		<i>> 0,05</i>	<i>> 0,05</i>	0,0904	0,0062
Tratado	+	11	12,6 ± 1,3	15,9 ± 1,0	18,0 ± 0,3	54 ± 3
	-	9	12,9 ± 0,9	14,1 ± 1,0	18,8 ± 0,6	49 ± 4
	P		<i>> 0,05</i>	<i>> 0,05</i>	<i>> 0,05</i>	0,0029
Combinado	+	24	12,6 ± 0,5	16,0 ± 0,8	19,1 ± 0,3 ^a	67 ± 2
	-	26	12,8 ± 0,8	15,1 ± 0,7	18,3 ± 0,3 ^b	52 ± 3
	P		<i>> 0,05</i>	<i>> 0,05</i>	0,0382	0,0001

Quando separados os parâmetros analisados, para avaliação pela mediana, não foi encontrada diferença significativa do diâmetro do folículo pré-ovulatório no dia da inseminação artificial em tempo fixo e do folículo maior no dia 14 após a inseminação artificial em tempo fixo ($P > 0.05$). Ao avaliar o diâmetro do corpo lúteo no D14 notou-se um aumento significativo no diâmetro do folículo pré-ovulatório no dia da inseminação artificial (D0) ($P < 0.05$). Comparando o diâmetro do corpo lúteo aos 30 dias após a inseminação (D30) observou-se aumento no fluxo sanguíneo do corpo lúteo aos mesmos 30 dias, bem como o inverso ($P < 0.05$; Tabela 8).

Tabela 8 - Divisão de cada parâmetro em dois grupos de menores e maiores valores, baseando-se na mediana. Parâmetros analisados: diâmetro e fluxo sanguíneo (FS) do folículo pré-ovulatório (FPO); diâmetro do maior folículo no D14, diâmetro do CL nos dias 14 e 60 e fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL)

	Mediana		Diâmetro do FPO (D0)	Diâmetro do maior folículo (D14)	Diâmetro do CL (D14)	Diâmetro do CL (D30)	FS do CL
Diâmetro do FPO (D0)	13,2	Menor	10,5 ± 1,5^a	8,3 ± 1,3	15,3 ± 2,3	18,6 ± 1,3	61 ± 0,1
		Maior	14,9 ± 1,4	8,6 ± 2,2	15,8 ± 3,1	18,8 ± 1,3	57,6 ± 0,2
Diâmetro do FPO (D14)	8,2	Menor	12,4 ± 1,7	6,6 ± 1,1^b	16,4 ± 2,2	18,7 ± 1,2	60,5 ± 0,1
		Maior	13 ± 2,6	10,4 ± 1,7	14,8 ± 3	18,8 ± 1,4	58 ± 0,1
Diâmetro do CL (D14)	16,0	Menor	12 ± 2 ^c	9,1 ± 1,6	12,9 ± 2,3^d	18,8 ± 1,5	61 ± 0,1
		Maior	13,4 ± 2,2	7,9 ± 1,9	18,3 ± 1,2	18,6 ± 1,2	57,4 ± 0,1
Diâmetro do CL (D30)	18,3	Menor	12 ± 2,2	8,5 ± 1,5	15,2 ± 3,1	17,4 ± 0,5^e	55 ± 0,1 ^f
		Maior	13,3 ± 2,1	8,4 ± 2,2	15,8 ± 2,5	20 ± 1	63,2 ± 0,1
FS do CL	60,0	Menor	12,7 ± 2,4	8,5 ± 2,1	15,2 ± 2,7	18,3 ± 1,1 ^g	50,3 ± 0,1^h
		Maior	12,8 ± 1,9	8,4 ± 1,5	16 ± 2,9	19,4 ± 1,4	73,2 ± 0

As médias ± erro padrão médio do parâmetro utilizado para a divisão dos dois grupos estão em negrito. Valores com diferenças estatísticas significativas estão destacadas em cinza. Letras minúsculas sobrescritas representam os seguintes valores de p : ^a $p < 0,0001$; ^b $p < 0,0001$; ^c $p = 0,0388$; ^d $p < 0,0001$; ^e $p < 0,0001$; ^f $p = 0,0213$; ^g $p = 0,0077$; ^h $p < 0,0001$.

Baseando-se no primeiro e terceiro quartis, verificou-se todos os parâmetros, encontrando diferença significativa apenas quando comparados o diâmetro do corpo lúteo 30 dias após a inseminação artificial em tempo fixo e o fluxo sanguíneo do corpo lúteo ao mesmo período ($P < 0,05$), indicando maior diâmetro com maior fluxo e o inverso, conforme ilustrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Divisão de cada parâmetro em dois grupos de menores e maiores valores, baseando-se no primeiro e terceiro quartis. Parâmetros analisados: diâmetro e fluxo sanguíneo (FS) do folículo pré-ovulatório (FPO); diâmetro do maior folículo no D14, diâmetro do CL nos dias 14 e 60 e fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL)

	Quartis	Diâmetro do FPO (D0)	Diâmetro do FPO (D14)	Diâmetro do CL (D14)	Diâmetro do CL (D60)	FS do CL
Diâmetro do FPO (D0)	1º (10,8)	9,0 ± 1,1^a	8,9 ± 1,5	13,9 ± 2,5	18,9 ± 1,4	59,0 ± 0,1
	3º (14,3)	16,2 ± 2	9,3 ± 2,3	15,8 ± 3,5	18,5 ± 1,4	56,1 ± 0,1
Diâmetro do FPO (D14)	1º (7,0)	12,3 ± 1,8	5,6 ± 0,8^b	16,8 ± 1,8	19,1 ± 1,1	60,0 ± 0,1
	3º (9,3)	13,2 ± 3	12,0 ± 2,2	14,4 ± 2,9	18,7 ± 1,2	58,2 ± 0,1
Diâmetro do CL (D14)	1º (14,1)	12,4 ± 2,2	9,0 ± 1,7	10,8 ± 2,1^c	18,3 ± 1,5	53,0 ± 0,1
	3º (18,1)	13,1 ± 2	7,4 ± 1,4	19,5 ± 0,8	18,6 ± 1,5	59,0 ± 0,1
Diâmetro do CL (D60)	1º (17,6)	11,9 ± 2,7	8,7 ± 1,9	13,6 ± 3,6	16,9 ± 0,4^d	49,1 ± 0,1 ^e
	3º (19,7)	12,6 ± 1,8	7,4 ± 1,7	15,5 ± 2,7	21,0 ± 0,7	66,0 ± 0,1
FS do CL	1º (50)	12,8 ± 2	8,6 ± 1,5	14,7 ± 3,5	18,1 ± 1,2 ^f	42,4 ± 0,1^g
	3º (70)	14,3 ± 1	7,9 ± 1,7	15,9 ± 2,8	19,8 ± 1,3	80,0 ± 0

As médias ± erro padrão médio do parâmetro utilizado para a divisão dos dois grupos estão em negrito. Valores com diferenças estatísticas significativas estão destacadas em cinza. Letras minúsculas sobrescritas representam os seguintes valores de p : ^a $p < 0,0001$; ^b $p < 0,0001$; ^c $p < 0,0001$; ^d $p < 0,0001$; ^e $p = 0,0058$; ^f $p = 0,0058$; ^g $p < 0,0001$.

5 DISCUSSÃO

O experimento 1 foi utilizado como experimento preliminar para os demais estudos, apesar do reduzido número de animais, observou-se um resultado satisfatório para as hipóteses sobre o aumento nas taxas de prenhez com o aumento da vascularização do corpo lúteo. A primeira avaliação feita neste experimento, não demonstrou relação positiva entre o diâmetro do corpo lúteo e as taxas de prenhez, resultado encontrado nos experimentos 2 e 3, e também relatado por Nuñez et al. (2011)

No experimento 2 comparando a área do corpo lúteo foi observada uma tendência a melhora das taxas de prenhez mas não significativo, ao contrário dos resultados encontrados por Baruselli et al. (2003); Baruselli et al. (2004); Sá Filho et al. (2010a,b,c); Sales et al. (2011), e Nuñez et al. (2011) em experimentos com vacas.

Wecker et al. (2012), verificaram uma relação significativa entre o diâmetro do folículo pré-ovulatório e o tamanho do corpo lúteo, em estudo analisando a utilização de tratamentos hormonais (eCG e hCG) sete dias após a IATF, porém, também não encontraram diferenças significativas nas taxas de prenhez, resultado semelhante ao encontrado no experimento 1.

Na avaliação da vascularização do corpo lúteo dos animais do experimento 1, verificou-se aumento significativo nas taxas de prenhez quanto maior o fluxo sanguíneo, dados também encontrados no experimento 3. Estes resultados explicam-se pelos estudos de Bollwein et al. (2002b) que indicou um aumento do fluxo sanguíneo temporalmente associado com a atividade do corpo lúteo. Segundo Utt et al. (2009) a vascularização do corpo lúteo é um possível indicador de fertilidade ou prenhez em vacas, e também conforme Acosta et al. (2003), durante o desenvolvimento precoce do corpo lúteo, o fluxo sanguíneo aumenta paralelamente a concentração circulante de progesterona, sendo então a vascularidade associada com o potencial luteal em produzir progesterona, promovendo então, um melhor ambiente para gestação.

Em estudo semelhante, Rizzi et al. (2009) relataram que a aplicação de eCG promoveu o crescimento folicular, aumento no tamanho do corpo lúteo e elevação nas concentrações de progesterona, e Mann (2009) descreveu relação positiva entre o tamanho do corpo lúteo e a produção de progesterona. Posteriormente, Lonergan (2011) demonstrou em seus estudos

clara relação entre alterações induzidas pela progesterona no ambiente uterino com o desenvolvimento embrionário.

Ao comparar os parâmetros entre si, não levando em consideração as taxas de prenhez, foi encontrado um aumento significativo na área, no fluxo sanguíneo e área do fluxo sanguíneo do corpo lúteo em animais com diâmetro do folículo pré-ovulatório maior, assim como no experimento 3, onde verificou-se aumento nas áreas do corpo lúteo e taxas de prenhez nos grupos tratado e controle. Este resultado reforça o encontrado por Mann et al. (2009); Nuñez et al. (2011) e Wecker et al. (2012) indicando um aumento de progesterona.

Sá Filho et al. (2010a), observaram resultado semelhante em estudo com vacas sincronizadas. Os autores relataram que folículos maiores no momento da IATF resultaram em maiores taxas de prenhez.

Na análise do fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório, o resultado demonstrou aumento no fluxo sanguíneo e na área do fluxo sanguíneo do corpo lúteo nos animais do experimento que apresentaram maior fluxo sanguíneo no folículo pré-ovulatório. Isto se deve, provavelmente, ao aumento de estrógenos circulante, conforme estudo de Bollwein et al. (2002a). Reynolds, Grazul-Bilska e Redmer (2000), relataram que o corpo lúteo é a primeira fonte de progesterona e devido a sua importância após a ovulação sua vascularização é constituída rapidamente.

Quando comparado apenas o tamanho do corpo lúteo com sua vascularização não verificou-se índices maiores de vascularização nos corpos lúteos de maior diâmetro nos animais do experimento 1. Este resultado contradiz o encontrado nos experimentos 2 e 3.

No experimento 3, foi evidenciado aumento no tamanho do corpo lúteo nos animais do grupo tratado, porém esta diferença não se expressou nas taxas de prenhez. Estes dados foram os mesmos observados quando, Nuñez et al. (2011) trabalharam com novilhas, mas diferiu em seu mesmo trabalho no grupo de vacas, onde encontrou resultado significativo nas taxas de prenhez.

O presente estudo encontrou uma relação entre o tamanho e a vascularização do folículo pré-ovulatório com o desenvolvimento do corpo lúteo e sua vascularização. Com relação ao tamanho do corpo lúteo pode-se afirmar uma relação positiva apenas no experimento 2 e 3 no aumento nas taxas de prenhez. Quanto a vascularização do corpo lúteo notou-se nos experimentos 1 e 3 uma forte relação com as taxas de prenhez concordando com

Reynolds et al. (2000), que afirmou que por ser o corpo lúteo a primeira fonte de progesterona e devido a sua importância, após a ovulação sua vascularização é constituída rapidamente.

Os animais do experimento 2 são de extrema seleção para fertilidade, o que foi considerado ter sido relevante para os resultados estatisticamente indiferentes, nos grupos de vascularização, onde todos os animais estão em um nível de seleção muito alto de fertilidade. Os níveis de progesterona coletados no momento do diagnóstico gestacional aos 30 dias após a inseminação artificial em tempo fixo são de suma importância para a concretização dos resultados obtidos, entretanto, ainda dependem dos resultados laboratoriais. Estes dados são base para o desenvolvimento de novos estudos e devem ser analisados de forma aprofundada.

6 CONCLUSÃO

- No experimento 1, apesar do grupo de animais com número experimental menor, observou-se uma forte relação entre a vascularização do corpo lúteo com as taxas de prenhez. Contudo não foi encontrada relação positiva entre o tamanho do corpo lúteo e as taxas obtidas.
- No experimento 2, considerou-se a hipótese de que os animais deste grupo não apresentaram diferenças significativas devido a interferência direta do elevado padrão de seleção para fertilidade. Neste experimento, os animais obtiveram melhor desenvolvimento do corpo lúteo quando apresentaram folículo pré-ovulatório de maior tamanho, embora, este resultado não tenha interferido nas taxas de prenhez.
- No experimento 3, concluiu-se que o aumento da vascularização teve relação direta com o aumento nas taxas de prenhez, e que um folículo pré-ovulatório de maior tamanho propiciou um corpo lúteo maior e provavelmente de melhor qualidade, porém não foi encontrada uma relação positiva entre a aplicação do eCG com a melhora do corpo lúteo.
- Apesar dos resultados indicarem relação entre o aumento da vascularização do corpo lúteo com o aumento das taxas de prenhez, novos estudos se fazem necessários para elucidar melhor essas correlações e suas reais interferências nas taxas de prenhez.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; 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.
- ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 127-140, 2004.
- ACOSTA, T. J., BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. **Biol Reprod**, v. 71, p. 637-642, 2004a.
- ACOSTA, T. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Differential blood flow changes between the future dominant and subordinate follicles precede diameter changes during follicle selection in mares. **Biol Reprod**, v. 71, p. 502-507, 2004b.
- ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; 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.
- ALVAREZ-CLAU, A.; LISTE, R. Ultrasonographic characterization of the uterine artery in the nonestrus bitch. **Ultrasound Med Biol**, v. 31, p. 1583-1587, 2005
- ARCHBOLD, H.; SHALLOO, L.; KENNEDY, E.; PIERCE, K. M.; BUCKLEY, F. "Influence of age, body weight and body condition score before mating start date on the pubertal rate of maiden Holstein-Friesian heifers and implications for subsequent cow performance and profitability." **Animal : an International Journal of Animal Bioscience**, v. 6, n. 7, p. 1143-51, 2012.
- BARREIROS, T. R. R.; BLASCHI, W.; BORSATO, E. A.; LUDWIG, H. E.; SILVA, D. R. M.; SENEDA, M. M. Comparação das taxas de prenhez entre receptoras com corpos lúteos cavitários ou compactos após protocolo de sincronização com cloprostenol ou transferência de embriões em tempo fixo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 657-664, 2006.
- BARUSELLI, O. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; BERBER, R. C. A.; VALENTIM, R.; CARVALHO FILHO, A. F.; COSTA NETO, W. P. Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo "Ovsynch" para inovulação em tempo fixo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 96-106, 2003.
- BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BO´, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.
- BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N.; GIMENES, L. U.; VIEIRA, L. M.; MENDANHA, M. F.; BÓ, G. A. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reprod Domest Anim.**, 2012 v. 4, p. 134-41, 2012. Supplement, 4.

- BHAL, P. S.; PUGH, N. D.; GREGORY, L.; O'BRIEN, S.; SHAW, R. W. Perifollicular vascularity as a potential variable affecting outcome in stimulated intrauterine insemination treatment cycles: a study using transvaginal power Doppler. **Hum Reprod.**, v. 16, p. 1682-1689, 2001.
- BISINOTTO, R. S.; SANTOS, J. E. P. "The use of endocrine treatments to improve pregnancy rates in cattle." **Reprod fertility, and Development** v. 24, n. 1, p. 258–66, 2011.
- BISINOTTO, R. S.; IBIAPINA, B. T.; PONTES, E. O.; BERTAN, C. M.; SATRAPA, R.; BARROS, C. M.; BINELLI, M. Luteal function and follicular growth following follicular aspiration during the peri-luteolysis period in *Bos indicus* and crossbred cattle. **Reprod Domest Anim.**, v. 47, n. 2, p. 319-27, 2012.
- BLANCO, P. G.; RODRÍGUEZ, R.; RUBE, A.; ARIAS, D. O.; TÓRTORA, M.; DÍAZ, J. D.; GOBELLO, C. Doppler ultrasonographic assessment of maternal and fetal blood flow in abnormal canine pregnancy. **Anim Reprod Sci**, v. 126, p. 130-135, 2011.
- BOLLWEIN, H.; MEYER, H. H. D.; MAIERL, J.; WEBER, F.; BAUMGARTNER, U.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle. **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, 2002a.
- BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; KOLBERG, B.; STOLLA, R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 65, p. 2129-2138, 2002b.
- BOLLWEIN, H.; BAUMGARTNER, U.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. **Theriogenology**, v. 57, p. 2053-2061, 2002a.
- BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; WEBER, F.; STOLLA, R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 57, p. 2043-2051, 2002b.
- BOLLWEIN H, WEBER F, WOSCHÉE I, STOLLA R. Transrectal Doppler sonography of uterine and umbilical blood flow during pregnancy in mares. **Theriogenology**, v.61, p.499-509, 2004.
- BORINI, A.; MACCOLINI, A.; TALLARINI, A.; BONU, M. A.; SCIAJNO, R.; FLAMIGNI, C. Perifollicular vascularity and its relationship with oocyte maturity and IVF outcome. **Ann N Y Acad Sci**, v. 943, p. 64-67, 2001.
- BRITO, A. B.; MIRANDA, S. A.; RUAS, M. R.; SANTOS, R. R.; DOMINGUES, S. F. S. Assessment of feline fetal viability by conceptus echobiometry and triplex Doppler ultrasonography of uterine and umbilical arteries. **Anim Reprod Sci**, v. 122, p. 276-281, 2010.
- COULAM, C. B.; GOODMAN, C.; RINEHART, J. S. Colour Doppler indices of follicular blood flow as predictors of pregnancy after in-vitro fertilization and embryo transfer. **Hum Reprod**, v. 14, p. 1979-1982, 1999.
- DI SALVO, P.; BOCCI, F; ZELLI, R, POLISCA, A. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch. **Res Vet Sci**, v. 81, p. 382-388, 2006.

- DISKIN, M. G.; MACKEY, D. R.; ROCHE, J. F.; SREENAN, J. M. "Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle." **Anim Reprod Sci**, v. 78, n. 3-4, p. 345-370, 2003.
- DU, B.; TAKAHASHI, K.; ISHIDA, G. M.; NAKAHARA, K.; SAITO, H.; KURACHI, H. Usefulness of intraovarian artery pulsatility and resistance indices measurements on the day of follicle aspiration for the assessment of oocyte quality. **Fertil Steril.**, v. 85, n. 2, p. 366-70, 2006.
- FABER, J. J.; THORNBURG, K. L. Placental Physiology. Structure and Function of Fetomaternal Exchange, **Raven Press**, New York, p. 143-150. 1983.
- FERREIRA, A.M.; PIRES, C.R.; MORON, A.F.; ARAÚJO JÚNIOR, E.; TRAINA, E.; MATTAR, R. Doppler assessment of uterine blood flow in recurrent pregnancy loss. **Int J Gynecol Obstet**, v.98, p.115-119, 2007.
- GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. **Reproduction** v. 131, p. 699-709, 2006.
- GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; DONADEU, F. X.; ACOSTA, T. J.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Temporal relationships among LH, estradiol, and follicle vascularization preceding the first compared with later ovulations during the year in mares. **Anim Reprod Sci.**, v. 102 p. 314-321, 2007.
- GEVA, E.; JAFFE, R. B. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. **Fertil Steril**, v. 74, n. 3, p. 429-438, 2000.
- GINTHER, O. J.; UTT, M. D.; Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v 24 516-526, 2004.
- GINTHER, O. J.; SILVA, L. A.; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂alpha, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biol Reprod**, v76 506-513, 2007.
- HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. **Reprod Domestic Anim.**, v. 42, p. 51-58, 2007.
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2012.Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2241> > Acesso em: 15 Abr. 2013.
- KÖSTER, K.; POULSEN NAUTRIP, C.; GÜNZEL-APEL, A. R. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. **Reproduction**, v. 122, p. 453-461, 2001.
- LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, v. 76, p. 1594-1601, 2011.
- MANN, G.E. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. **Animal Reproduction Science**. v. 115, n.1, p. 296-299, 2009.

- MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A.; BARBOSA, R. T.; OLIVEIRA, C. A.; BINELLI, M. Ovarian function in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows after post-ovulation hormonal treatments. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 798-804, 2008.
- MENEGHETTI, M.; VASCONCELOS, J.L.M. Mês de parição, condição corporal e resposta ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte primíparas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 60, n. 4, p. 786-793, 2008
- MIRANDA, S. A.; DOMINGUES, S. F. S. Conceptus ecobiometry and triplex Doppler ultrasonography of uterine and umbilical arteries for assessment of fetal viability in dog. **Theriogenology**, v. 74, p. 608-617, 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. **Dom Anim Endocrinol.**, v. 29, p. 329-339, 2005.
- MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; HAYASHI, K.; KAMADA, D.; KAWASHIMA, C.; KANEKO, E.; ACOSTA, T. J.; 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 Development**, v. 52, n. 1, p. 153-160, 2006.
- NAUTRUP, C. P. Doppler ultrasonography of canine maternal and fetal arteries during normal gestation. **J Reprod Fertil**, v. 112, p. 301-314, 1998.
- NUÑEZ, R.; DE CASTRO, T.; CUTAIA, L.; BÓ, G.; MENCHACA, A. Pregnancy rates after administration of equine chorionic gonadotropin (eCG) at progesterone intravaginal device removal and 14 days after fixed-time AI in beef cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n.1, p.163, 2011.
- PAREJA, O. S.; URBANETZ, A. A.; URBANETZ, L. A. M. L.; CARVALHO, N. S.; PIAZZA, M. J. Características ecográficas do corpo lúteo em gestações iniciais: morfologia e vascularização. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 32, n. 11, p. 549-55, 2010.
- PEREIRA, B. S.; FREIRE, L. M. P.; PINTO, J. N.; DOMINGUES, S. F. S.; SILVA, L. D. M. Triplex Doppler evaluation of uterine arteries in cyclic and pregnant domestic cats. **Anim Reprod Sci**, v.130, p. 99-104, 2012a.
- PEREIRA, B. S.; PINTO, J. N.; FREIRE, L. M. P.; CAMPELLO, C. C.; DOMINGUES, S. F. S.; SILVA, L. D. M. Study of the development of uteroplacental and fetal feline circulation by triplex Doppler. **Theriogenology**, v. 77, p. 989-997, 2012b.
- PEREIRA, M. H. C.; COOKE, R. F.; ALFIERI, A. A.; VASCONCELOS, J. L. M. "Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of lactating dairy cows submitted to AI." **Anim Reprod Sci**, v.137, n. 3-4, p. 156-62, 2013.
- PINTO, J. M. **eCG e densidade vascular em úteros bovinos**. 17f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- POLISCA, A.; SCOTTI, L.; ORLANDI, R.; BRECCHIA, G.; BOITI, C. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in rabbits. **Theriogenology**, v. 73, p. 358-366, 2010.

- RAUCH, A.; KRÜGER, L.; MIYAMOTO, A.; BOLLWEIN, H. Colour Doppler sonography of cystic ovarian follicles in cows. **J Reprod Dev.**, v. 54, p. 447-453, 2008.
- REED, K. L.; CHAFFIN, D. L.; ANDERSON, C. F. Umbilical venous doppler velocity pulsations and inferior vena cava pressure elevations in fetal lambs. **Obstet Gynecol**, v. 8, n. 4, p. 617-620, 1996.
- REISINGER, K.; BAAL, N.; MCKINNON, T.; MÜNSTEDT, K.; ZYGMUNT, M. The gonadotropins: tissue-specific angiogenic factors? **Mol Cell Endocrinol.**, v. 269, p. 65-80, 2007.
- RIZZO A., SPEDICATO M., MINOIA G., MUTINATI M., CINONE M., JIRILLO F. & SCIORSCI L. Follicular development in pregnant cows after the administration o equine chorionic gonadotropin (eCG): a new insight. **Imunopharmacology, immunotoxicology.**, v. 31 (4): p. 536-542, 2009.
- REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the corpus luteum. **Endocrine**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2000.
- SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M.; SANTOS, J. E. P.; PERRY, G. A.; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled Bos indicus cows. **Anim Reprod Sci**, v. 13, v. 120, p. 23-30, 2010a.
- SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; SILVA, R. C.; RODRIGUES, C. A.; MADUREIRA, E. H.; BO´, G. A.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet- based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (Bos indicus) cows. **Theriogenology**, v. 73, p. 651-658, 2010b.
- SÁ FILHO, M. F.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L.; GIMENES, L. U.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CASTRO, E.; PAULA, L. A.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, O. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (Bos indicus) heifers. **Anim Reprod Sci.**, v. 118, p. 182-187, 2010c.
- SÁ FILHO, M. F.; BALDRIGHI, J. M.; SALES, J. N.; CREPALDI, G. A.; CARVALHO, J. B.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for Bos indicus cattle. **Anim Reprod Sci.**, v. 129, n. 3-4, p. 132-139, 2011.
- SALES, J. N. S. **Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas Bos indicus e Bos taurus**. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- SCOTTI, L.; DI SALVO, P.; BOCCI, F.; PIERAMATI, C.; POLISCA, A. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in queen. **Theriogenology**, v. 69, p. 1111-1119, 2008.
- SHRESTHA, S. M.; COSTELLO, M. F.; SJOBLUM, P.; MCNALLY, G.; BENNETT, M.; STEIGRAD, S. J.; HUGHES, G. J. Power Doppler ultrasound assessment of follicular

vascularity in the early follicular phase and its relationship with outcome of in vitro fertilization. **J Assist Rep Gen.**, v. 23, p. 161-169, 2006.

SIDDIQUI, M. A.; ALMAMUN, M.; GINTHER, O. J. 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, 2008.

SILVA, L. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. **Anim Reprod.**, v. 3, p. 339-346, 2006.

STEER, C.V.; CAMPBELL, S.; PAMPIGLIONE, J.S.; KINGSLAND, C.R.; MASON, B.A.; COLLINS, W.P. Transvaginal colour flow imaging of the uterine arteries during the ovarian and menstrual cycles. **Hum Reprod**, v.5, p.391-395, 1990.

STEER, C.V.; TAN, A.L.; MASON, B.A.; CAMPBELL, S. Midluteal-phase vaginal color Doppler assessment of uterine artery impedance in a subfertile population. **Fertil Steril**, v.61, p.53-68, 1994.

UTT, M. D.; JOHNSON, G. L.; BEAL, W. E. 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.

WECKER, F.; THEDY, D.X.; GONSIOROSKI, A.V.; BORGES, J.B.S. Effect of Administration of eCG or hCG 7 Days after FTAI on the Development of Ovarian Structures and Pregnancy Rates in Beef Cows. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 4, p.1072-1080, 2012.

WITT, M. C.; BOLLWEIN, H.; PROBST, J.; BAACKMANN, C.; SQUIRES, E. L.; SIEME, H. Doppler sonography of the uterine and ovarian arteries during a superovulatory program in horses. **Theriogenology**, v. 77, 1406-1414, 2012.