

# Diagnóstico de pérdida embrionaria y detección muy temprana de vacas no gestantes mediante ecografía Doppler

Lorenti, S.N.<sup>(1,A)</sup>, Madoz, L.V.<sup>(2,3,A)</sup>, Rearte, R.<sup>(2,3)</sup>, Quintero-Rodriguez, L.<sup>(2,3,B)</sup>, Migliorisi, A.L.<sup>(2)</sup>, Jaureguiberry, M.<sup>(2,3)</sup>, Gabler, C.<sup>(4)</sup>, Drillich, M.<sup>(5)</sup>, de la Sota, R.L.<sup>(2,3,B)</sup>

## Resumen

Los productores lecheros enfrentan grandes desafíos que amenazan los resultados económicos del sistema, siendo la eficiencia reproductiva uno de los principales factores para tener en cuenta. Para alcanzar el objetivo de un parto por año/vaca y mantener así la rentabilidad del tambo, es primordial lograr la mayor cantidad de vacas inseminadas en el menor tiempo posible. Tanto las vacas que fallan en la concepción como aquellas que padecen de pérdidas embrionarias son en las que hay que focalizar los esfuerzos para detectarlas e inseminarlas nuevamente en forma rápida y de esta manera acortar el intervalo de tiempo entre el parto y la nueva concepción. Los objetivos de este estudio fueron 1) validar la ultrasonografía (USG) Doppler para la detección de vacas no gestantes a los 19-20 d post-IA y 2) determinar las pérdidas embrionarias entre los 19 y 34 días de gestación en vacas de tambo. Al día 19-20 post IA, se evaluó la perfusión sanguínea del cuerpo lúteo (CL-FS) por USG Doppler en modo color y en modo power en todas las vacas ingresadas en el estudio (n= 131). En la misma visita también se evaluó la ecotextura uterina mediante USG en modo B para determinar si dicha evaluación podría aportar datos que mejoraran el diagnóstico de no-preñez al día 19-20 post IA. Además, se obtuvieron muestras de sangre para la medición de progesterona (P4) y para determinar la expresión de genes relacionados con la gestación temprana (genes estimulados por el interferón tau; ISG) mediante PCR en tiempo real. Finalmente se realizó el diagnóstico de gestación a los 33-34 d post-IA mediante USG en modo B. El modo Color de la USG Doppler mostró alta precisión para detectar vacuidad al pie de la vaca usando la categoría  $\leq 1$  (escala 0-4) en todos los cuadrantes del CL. La tasa de no-preñez diagnosticada USG Doppler a los 19-20 d post-IA fue de 38,9 % (51/131), mientras que el 62,6 % (82/131)

(1) Práctica privada, Brandsen, BA, Argentina.

(2) Instituto de Investigaciones en Reproducción Animal (INIRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, BA, Argentina.

(3) CONICET, CABA, Argentina.

(4) Instituto de Bioquímica Veterinaria, Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad Libre de Berlín, Alemania.

(5) Departamento de Producción Animal y Salud Pública Veterinaria, Universidad de Medicina Veterinaria, Viena, Austria.

(A) Estos autores contribuyeron equitativamente a este trabajo.

(B) Dirección actual: Universidad de Santander, Facultad de Ciencias Agrícolas y Veterinarias, Bucaramanga, Colombia.

(C) Correspondencia de autor: Instituto de Investigaciones en Reproducción Animal (INIRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118. La Plata, B1900AVW. BA, Argentina. Tel: +54-9221-4596966. E-mail: dairydoc82@gmail.com

Recibido: 10 de agosto de 2022.

Aceptado: 16 de agosto de 2022.

Taurus Año 24; N° 95: 18-25

fueron diagnosticadas como no gestantes a los 33-34 días por la ecografía en modo B. La presencia de una capa endometrial gruesa y la visualización del estrato vascular uterino a los 19-20 d post IA se correlacionaron con el diagnóstico de no-preñez por ecografía en modo B a los 33-34 días ( $p < 0,001$ ). Basándonos en la expresión de ISG en vacas con CL-FS positivo y con niveles de progesterona  $> 1$  ng/ml al día 19-20 post IA, detectamos que un 28,1% de las vacas pudo haber presentado pérdida de preñez entre el día 19 y 34 post IA. La USG Doppler permitió detectar rápidamente vacas no gestantes entre los 19-20 d post-IA y la evaluación del grosor del estrato vascular y del endometrio puede ser beneficiosa para mejorar la detección de vacas no preñadas a los 19-20 días post-IA. El diagnóstico temprano mediante la utilización de estas técnicas es una herramienta muy útil que puede ser implementada en protocolos de resincronización para minimizar los días abiertos.

**Palabras clave:** Doppler; irrigación del cuerpo lúteo; diagnóstico de preñez; pérdidas de gestación.

---

## Diagnosis of embryonic loss and very early detection of non-pregnant cows by Doppler ultrasound

### Summary

Dairy producers face important challenges threatening the system's financial results, making reproductive efficiency one of the most important. To achieve the goal of a calving per cow/year and thus maintain the profitability of the dairy, it is essential to achieve a high number of inseminated cows in the shortest possible time. Cows that fail to conceive and those that suffer embryo loss are the ones that we should focus on detecting and inseminating them promptly, shortening the time interval between calving and new conception. The objectives of this study were 1) to assess the ultrasound (USG) Doppler for the detection of non-pregnant cows at 19-20 d post-IA and 2) to determine the embryo loss between 19-34 d of pregnancy in dairy cows. In all cows included in the study ( $n=131$ ), the corpus luteum (CL-FS) perfusion was assessed by the color and the power mode of the Doppler USG. In addition, the uterine echotexture was evaluated by USG mode B to predict if, including this information, the precision of the USG Doppler at 19-20 d post AI improved. At the same time, blood samples were collected to measure progesterone (P4) and to determine the expression of genes related to early pregnancy (interferon-stimulated genes; ISG) by real-time PCR. Finally, the pregnancy diagnosis was performed at 33-36 d after IA using USG mode B. Color mode showed higher precision in detecting non-pregnant cows using category  $\leq 1$  (scale 0-4) in all CL quadrants. The non-pregnancy rate at 19-20 d post-AI was 38,9% (51/131) by CL-FS Doppler USG. In contrast, the non-pregnancy rate at 33-34d post-AI was 62,6 (82/131) by B-mode USG based on the lack of embryo visualization. The presence of a thick endometrial layer and the visualization of the uterine stratum vascular at 19-20 d post-AI was related to the non-pregnancy diagnosis at 33-34 d post-AI ( $p < 0.001$ ). Based on the expression of ISG in cows with positive CL to Doppler assessment and with P4  $> 1$ ng/ml at 19-20 d post-AI, we detected that 28,1% of the cows potentially lost the pregnancy between 19-34 d. Doppler USG allowed the detection of non-pregnant cows between 19-20 d post-AI, and the additional B-mode ultrasound evaluation of the uterine echo structure improved the detection of non-pregnant cows. The early diagnosis using these techniques is a valuable and quick tool to be implemented in resynchronization protocols to minimize open days.

**Keywords:** Doppler; corpus luteum perfusion; pregnancy diagnosis; pregnancy loss.

---

## Introducción

Actualmente el foco de muchas investigaciones en el campo de la reproducción bovina busca diagnosticar preñeces de la manera más precoz posible debido a la necesidad de aumentar la presión de servicio, mejorar las tasas de preñez y acortar el intervalo parto-concepción. Los métodos de diagnóstico se focalizan en encontrar a la vaca vacía (que falla en la concepción) prontamente para poder re-inseminarla y que su intervalo entre partos sea lo más corto posible<sup>[1-3]</sup>.

La incorporación de nuevas tecnologías al uso cotidiano en tambos, como la USG Doppler, per-

mite una visión más detallada del útero, de los folículos ováricos y del CL permitiendo mejorar sustancialmente la detección temprana de las vacas vacías próximas al estro natural alrededor del día 21 post servicio<sup>[3,4]</sup>. La mayor practicidad y velocidad diagnóstica de esta técnica a diferencia de otros métodos más complejos, concede la posibilidad de utilizarla de manera rutinaria en los tambos y mejorar sustancialmente la detección de las vacas a inseminar. Por otro lado, no todas las vacas que logran concebir llegan a parir, es por eso, que las pérdidas de gestación en rodeos lecheros se han vuelto un campo de investigación muy extenso en

la actualidad. La detección de muertes embrionarias en el ganado puede evaluarse utilizando diferentes herramientas de diagnóstico. La más utilizada en la práctica veterinaria es la USG en modo B transrectal que permite detectar falta del latido cardíaco fetal, membranas desprendidas o estructuras flotantes, incluyendo remanentes embrionarios y reducciones de tamaño fetal a partir de los 28 d post-IA <sup>[5,6]</sup>. Otras herramientas de diagnóstico que se pueden utilizar son la medición de la concentración de P4 en la leche o en suero 20-24 días después de la IA y la evaluación de la perfusión sanguínea del CL (CL-FS) mediante ecografía Doppler <sup>[7]</sup>. Existe una correlación positiva entre la CL-FS y las concentraciones circulantes de P4 en vacas cíclicas y gestantes <sup>[8]</sup>. Finalmente, la expresión de genes estimulados por el interferón tau (ISG) ha sido también postulada como una técnica válida para detectar vacas gestantes a partir del día 18 post-IA <sup>[9]</sup> así como también para detectar vacas que padecen muerte embrionaria (ME) <sup>[10]</sup>. Finalmente, y teniendo en cuenta que todas estas técnicas mencionadas podrían generar beneficios económicos y facilitar prácticas de manejo, sería importante realizar nuevos estudios que determinen la precisión de las mismas para diagnosticar gestación muy temprana (d19-20) o incluso, muerte embrionaria.

Los objetivos de este estudio fueron validar el uso de la USG Doppler para la detección de vacas no gestantes a los 19-20 días post-IA y para la detección de muertes embrionarias 19-34 días post-IA en vacas de tambo bajo condiciones pastoriles de producción. Además, evaluamos si la ecotextura uterina mediante la evaluación de USG en modo B podría agregar información valiosa para mejorar la detección de vacas no preñadas a los 19-20 días post-A.

## **Materiales y métodos**

### *Manejo reproductivo del rodeo*

Este estudio se realizó en un tambo comercial con 400 vacas en ordeño y con un rango de producción de leche de entre 6.000 y 12.000 kg en 305 días en lactancia, ubicado en la localidad de Brandsen, provincia de Buenos Aires (35° 24' S, 58° 06' O). El sistema de producción era de base pastoril con suplementación con silo de maíz y concentrado. Los partos ocurrían a lo largo de todo el año y el período de espera voluntaria

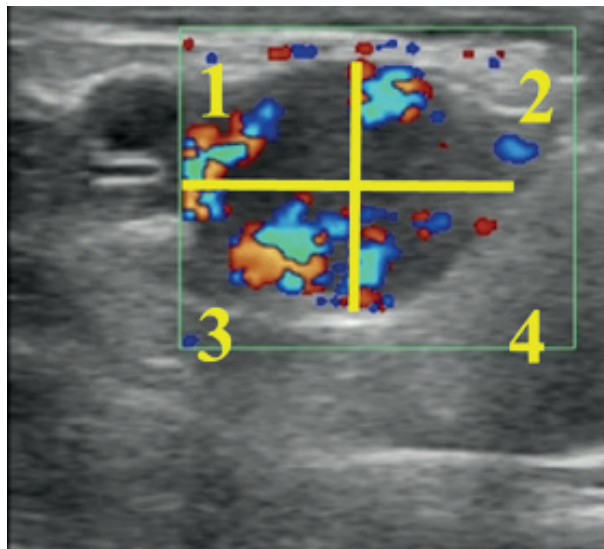
(PEV) fue fijado en 45 días. Luego de transcurrido el PEV, se seleccionaron vacas cíclicas con flujo vaginal normal (sin pus) y se realizó un protocolo de IATF. Para esto, todas las vacas incluidas recibieron un dispositivo intravaginal que contenía 1,2 g de P4 (Diprogest 1200, Zoovet, Argentina) y 2,0 mg de benzoato de estradiol (Zoovet, Argentina) al inicio del protocolo. Al séptimo día del protocolo, se retiró el dispositivo de P4 y las vacas recibieron 0,150 mg de PGF<sub>2</sub>α (D-Cloprostenol, Ciclar Zoovet, Argentina), 2 mg de cipionato de estradiol (Zoovet, Argentina) y 450 UI de eCG (Novormon 5000, Syntex, Argentina). La IA se realizó 55-60 h después de retirar el dispositivo de P4.

### *Evaluaciones ecográficas*

Un total de 131 vacas sanas y con presencia de cuerpo lúteo (CL) que se encontraban entre 19-20 días post-IA fueron incluidas en este estudio. Todos los CL fueron examinados por el modo de Power y por el modo Color de USG Doppler. Se utilizó un equipo ESAOTE MyLab OneVET (Génova, Italia) equipado con un transductor transrectal lineal de 2,2 a 12 MHz. Las configuraciones de los Modos de USG Doppler utilizadas fueron fijadas y no modificadas a lo largo de los exámenes para minimizar las variaciones entre las vacas. El mismo investigador realizó todas las evaluaciones de ultrasonido. En la evaluación se consideró la cantidad de área coloreada dentro del tejido lúteo como un indicador de la funcionalidad de CL <sup>[11,12]</sup>. Se seleccionó la vista más coloreada para el mayor diámetro de cada CL. Al momento de la evaluación, en el tambo, cada cuadrante se clasificó de acuerdo al grado aparente de perfusión sanguínea del CL (escala 0-4; 0: área con 0% de vascularización, 1: 1-25 %, 2: 26-50%, 3: 51-75% y 4: 76-100%). Se almacenaron dos videoclips por vaca que contenían la sección transversal completa del CL en los modos Power y Doppler color para su posterior análisis. Los clips fueron analizados a ciegas por un segundo evaluador de forma independiente. Al igual que en la evaluación visual de CL-FS en el tambo, el CL se dividió en cuatro cuadrantes iguales. El porcentaje de áreas coloreadas en cada cuadrante se determinó mediante el software de procesamiento de imágenes ImageJ 1.42q (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, EE. UU. <sup>[13]</sup>). Se examinaron tres imágenes de cada CL

para calcular el área coloreada. La imagen más vascularizada de las tres imágenes fue seleccionada y utilizada para el análisis estadístico final. La escala de clasificación fue la misma que se había utilizado en el tambo al momento de la evaluación ecográfica. El CL-FS se consideró negativo cuando los cuatro cuadrantes se calificaron como  $\leq 1$  (escala 0-4) o cuando la evaluación del software indicó  $< 25\%$  de CL-FS <sup>[14]</sup> (Figura 1 y 2). Durante la misma visita, 19-20 días después de la IA, se realizó un examen adicional con USG en modo B (ESAOTE MyLab OneVET, Génova, Italia) para evaluar la ecotextura uterina. Se determinó la proporción de grosor entre el endometrio y el miometrio en la bifurcación de los cuernos uterinos (EN: MI) y se clasificó como 1:1, 2:1 y 3:1. También se evaluó la presencia (SI/NO) de la luz uterina y del estrato vascular.

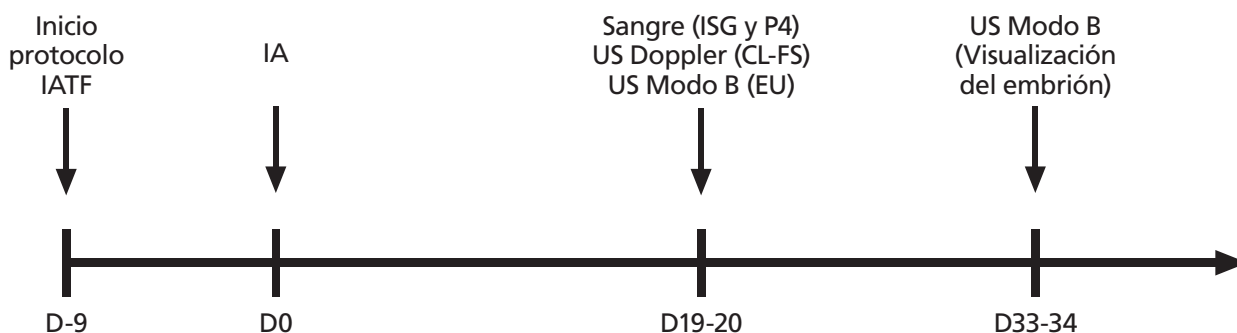
El diagnóstico de preñez mediante identificación visual de la vesícula embrionaria y el latido del corazón se realizó a los 33-34 días después de la IA mediante USG en modo B (Mindray DP 30 Vet). Las vacas diagnosticadas por USG Doppler con un CL-FS positivo a los 19-20 d que no estaban preñadas a los 33-34 d por el USG en modo B se denominaron POS-VACIA. Las vacas diagnosticadas por USG Doppler con un CL-FS negativo a los 19-20 d y diagnosticadas como preñadas a los 33-34 d se denominaron NEG-PREÑADA. Las vacas que fueron diagnosticadas positivas en ambos exámenes estadounidenses se denominaron POS-PREÑADA. Finalmente, las vacas diagnosticadas con un CL negativo a los 19-20 d y no preñadas a los 33-34 d se denominaron NEG-VACIA.



**Figura 2.** Cuerpo lúteo dividido en cuadrantes para la evaluación de la perfusión sanguínea.

#### *Obtención y procesamiento de muestras sanguíneas*

A todas las vacas, al momento de la realización de la USG Doppler (19-20 d post IA), se les tomó una muestra de sangre (9 ml) en tubos conteniendo EDTA. Las muestras fueron procesadas para la obtención de plasma y de la fracción leucocitaria. El plasma fue utilizado para la medición de las concentraciones de progesterona sérica mediante quimioluminiscencia (Immunoanalyzer Elecsys and Cobas e, Roche®, Mannheim, Alemania) utilizando como controles internos, muestras conocidas con concentraciones altas (7 ng/ml) y bajas (1 ng/ml) de progesterona al comienzo y al final de las determinaciones. Las vacas que tenían una concentración plasmática de P4  $\geq 1,0$  ng/mL se clasificaron



**Figura 1.** Línea de tiempo del diseño del estudio y las técnicas de diagnóstico utilizadas.

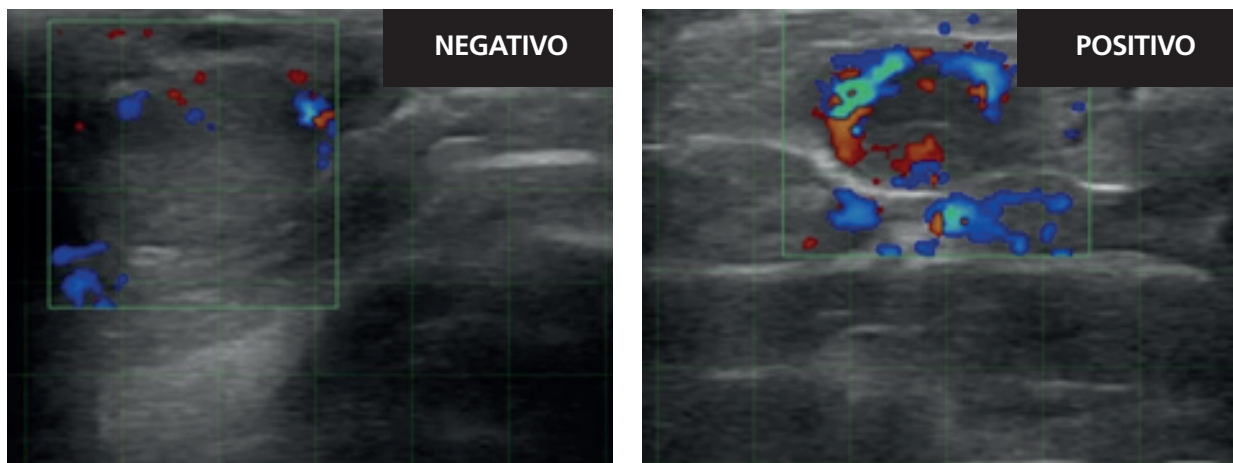
IATF: Inseminación artificial a tiempo fijo;

ISG: genes estimulados por el interferón tau, determinación por PCR en tiempo real;

P4: progesterona; determinación por quimioluminiscencia;

CL-FS: perfusión sanguínea del cuerpo lúteo, determinación por Doppler modo Color y modo Power;

EU: ecoestructura uterina; determinación por ultrasonografía modo B.



**Figura 3.** Evaluación de la perfusión sanguínea del cuerpo lúteo por ultrasonografía Doppler en modo Color. Cuerpo lúteo de una vaca vacía clasificado como negativo (izquierda). Cuerpo lúteo clasificado con perfusión positiva en una vaca preñada (derecha).

como con CL funcional, y aquellas con concentraciones de P4 <1,0 ng/mL se clasificaron como con CL no funcional. Se consideró CL activo cuando CL-FS se clasificó como positivo a USG Doppler y funcional a la medición de P4.

Por otro lado, para la obtención de la fracción leucocitaria, se siguieron los pasos de la técnica descrita por Gifford y col.<sup>[9]</sup> y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realizó la extracción de ARN, cuantificación, validación de la calidad del ARN, retrotranscripción y PCR en tiempo real<sup>[15]</sup>. Se procesaron un total de 59 muestras para la determinación de la expresión de los genes estimulados por el interferón tau. Los cebadores utilizados para este fin fueron específicamente diseñados utilizando el software Primer 3<sup>[16]</sup>. La expresión de los genes de interés fue normalizada usando como referencia 3 genes específicos y el software geNorm<sup>[17]</sup>.

### Análisis estadístico

El grado de acuerdo entre la perfusión del CL diagnosticado por USG Doppler a campo y el diagnóstico posterior de las imágenes por el software (ImageJ 1.42q) se evaluó mediante la estimación del coeficiente kappa. La capacidad predictiva del diagnóstico de no-preñez a los 19-20 días post-IA del USG Doppler color modo se evaluó estimando la sensibilidad (SE), especificidad (SP), Valor Predictivo Positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) utilizando Proc FREQ (SAS 9.4).

La concordancia entre el diagnóstico CL-FS Doppler a los 19-20 días, el diagnóstico de preñez

por USG en modo B a los 33-34 días y la ecoestructura uterina a los 19-20 días (luz uterina, estrato vascular y espesor relativo EN: MI) se evaluaron ajustando modelos de regresión logística (Proc GLIMMIX, SAS 9.4) y SE, SP, PPV y NPV se estimaron mediante Proc FREQ (SAS 9.4).

Los ISG se utilizaron como método de referencia para la detección de preñez en vacas con un CL activo a los 19-20 días post-IA. Se utilizaron curvas ROC para determinar los valores de corte críticos para los genes de interés que proporcionaron evidencia de la presencia de un embrión a los 19-20 días posteriores a la IA (Proc LOGISTIC, SAS 9.4). Para mejorar la capacidad predictiva, los genes que se seleccionaron como biomarcadores de preñez (área bajo la curva >80%) se utilizaron de varias formas combinadas (pruebas en paralelo y en serie)<sup>[18]</sup> para el diagnóstico de preñez (Proc FREQ, SAS 9.4). Una vez que se determinaron valores de corte de los ISG, todas las vacas POS-NONPREG fueron reclasificadas de acuerdo con sus valores de expresión de ARNm en vacas con muerte embrionaria (ME; vacas positivas a ISG y CL activo) o vacas con diagnóstico de Doppler-falso positivo (vacas negativas a ISG o sin CL activo). La pérdida potencial de preñez se calculó como el número de vacas clasificadas como ME dividido por el número de vacas diagnosticadas preñadas a los 33-34 días mediante visualización de embriones más las vacas ME.

La concordancia entre el diagnóstico CL-FS por USG Doppler, el diagnóstico de preñez por USG en modo B, los valores de expresión de

ARNm y la concentración de P4 se evaluó estimando los coeficientes kappa (Proc FREQ, SAS 9.4). La significación estadística se fijó en  $P < 0,05$  y la tendencia de significación se fijó en  $P < 0,10$ .

## Resultados

La tasa de no-preñez a los 19-20 días diagnosticada por USG Doppler fue del 38,9 % (51/131), mientras que el 62,6 % (82/131) fueron diagnosticadas como no gestantes a los 33-34 días por la ecografía en modo B basada en la falta de visualización del embrión.

Las mediciones del área CL-FS realizadas a los 19-20 días posteriores a la IA mediante el software de procesamiento de imágenes tuvieron una mayor concordancia con el modo Color que con el modo Power (Kappa = 0,70 vs. 0,42). La presencia de un CL-FS considerable se consideró un signo positivo de un CL activo, mientras que su ausencia o cantidades pequeñas (cuatro cuartas partes del CL puntuadas como  $\leq 1$ , escala 0-4) denotaron una falta de actividad del CL y, por lo tanto, se consideró como un signo de no-preñez. El modo Color mostró alta precisión para detectar posible preñez al pie de la vaca por simple visualización (74,8%) al usar la categoría  $\geq 2$  en cualquier cuadrante. Asimismo, el USG Doppler, al igual que el diagnóstico ISG, mostró un alto SE y VPN cuando se comparaban con el diagnóstico tradicional con la USG en modo B (método de oro) y una concordancia sustancial con P4 en plasma.

La presencia de una capa endometrial gruesa (ME:MI de 3:1) a los 19-20 días se correlacionó con el diagnóstico de no-preñez por Doppler y también por ecografía en modo B a los 33-34 días ( $p < 0,001$ ). Además, la visualización del estrato vascular uterino a los 19-20 d (OR = 2.79 95% IC 1.31- 5.93  $P < 0.01$ ) también se correlacionó con vacas no gestantes en el diagnóstico modo B a los 33-34 d.

De todos los genes evaluados, ISG15, MX2 y OAS1 fueron seleccionados como posibles biomarcadores para detectar ME. Posteriormente se determinó que para detectar el 100% de vacas preñadas, se deberían utilizar como valores de corte los niveles de expresión de solo dos de los posibles biomarcadores (ISG15/MX2 en interpretación paralela). De esta manera, si la expresión de una vaca era mayor a uno u ambos de los valores de corte de estos genes, se la diagnosticaba

como potencialmente preñada (100% SE y 70,5 % de SP). Como consecuencia, las vacas que habían sido clasificadas como POS-NONPREG se reclasificaron según su concentración de P4 y los valores de ISG (interpretación paralela de ISG15/MX2). Encontramos que el 47,4% (9/19) de las vacas POS-NONPREG tuvieron evidencia de presencia embrionaria (valor de expresión por encima del punto de corte para ISG15 o MX2) y presentaron concentración de P4  $> 1,0$  ng/mL (SE, 100%), por lo que fueron clasificadas como ME. El 5,2% (1/19) presentó P4 bajo y el 47,4% (9/19) presentó ISG15/MX2 bajo, por lo que fueron clasificados como Doppler falso positivo. Con base en las vacas clasificadas con ME ( $n=9$ ) y aquellas diagnosticadas preñadas a los 33-34 d ( $n=23$ ), estimamos que el 28.1% (9/23+9) de las vacas pudo haber presentado una potencial pérdida de preñez.

Todas las vacas que tenían un CL no funcional (P4  $< 1.0$  ng/mL) a los 19-20 días fueron diagnosticadas como no preñadas a los 33-34 días por USG en modo B (SE 100%, 13/13), mientras que la mitad de las vacas con concentración de P4  $\geq 1.0$  ng/mL a los 19-20 tuvieron un embrión detectado a los 33-34 días por USG en modo B (SP 50%, 23/46).

## Discusión

El USG Doppler color ha sido descrita como una herramienta valiosa para evaluar la perfusión sanguínea en el tracto reproductivo de grandes animales <sup>[14]</sup>. Además, el modo Color ha demostrado ser más eficaz que el modo Power para detectar el flujo sanguíneo en los vasos pequeños del centro del CL <sup>[19]</sup>. Por ello, y en concordancia con estudios previos, elegimos la evaluación USG Doppler color para este estudio <sup>[11, 20]</sup>. Sin embargo, es importante tener en cuenta que solo la evaluación visual al pie del animal puede considerarse apropiada en la práctica lechera ya que la evaluación de las imágenes por medio del software de procesamiento de imágenes requiere tiempo para su evaluación por lo que no permite tomar decisiones en el momento.

Nuestros resultados mostraron una alta concordancia con los informados por Siqueira y col. <sup>[4]</sup> en cruzas Holstein-Gir que encontraron alta SE y VPN (99% y 98.5%, respectivamente) para el diagnóstico por USG-Doppler Color a los 20 d usando

como referencia el diagnóstico por USG en modo B a los 30 d. El alto VPN indica que la evaluación del CL-FS parece ser una herramienta de diagnóstico confiable para detectar vacas abiertas y reinseminarlas antes de lo que sería posible evaluando el retorno al estro <sup>[4]</sup>. Reducir el intervalo entre el parto y la concepción mediante un diagnóstico temprano y preciso de no-preñez puede tener una importancia económica significativa. Por otro lado, de acuerdo con estudios previos, encontramos que la evaluación CL-FS presentó resultados falsos positivos y una menor precisión como limitante <sup>[21, 22]</sup>. El diagnóstico incorrecto de preñez puede ocurrir en ciclos estrales con fases lúteas extendidas con un retraso en la regresión de CL y pérdidas embrionarias tempranas <sup>[23]</sup>.

Por otro lado, encontramos que un endometrio grueso (relación EN:MI de 3:1) y la visualización del estrato vascular a los 19-20 días se relacionaron con la no gestación. Esto está en concordancia con estudios previos que encontraron que el grosor de la pared uterina aumenta durante la regresión lútea con la disminución de P4 y el aumento de estradiol <sup>[24]</sup>. De manera similar, la visualización del estrato vascular se explica por el aumento en los diámetros de las arterias uterinas y el flujo sanguíneo como una influencia de las concentraciones crecientes de estradiol. Por lo tanto, incluir la evaluación del estrato vascular y el grosor del endometrio como una evaluación adicional puede mejorar el diagnóstico de las vacas no gestantes a los 19-20 días posteriores a la IA.

En este estudio, la estimación de la tasa de preñez en vacas lecheras lactantes en pastoreo a los 19-20 días post IA fue del 61,1 % utilizando solo USG Doppler, 62,7 % usando solo ISG y del 50,8 % si se combinaban las tres técnicas diagnósticas (P4 + USG Doppler + ISG). La pérdida de preñez aparente para el período de 19 a 34 días fue del 28,1 %. La ocurrencia de pérdidas de embriones que encontramos fue similar a otros estudios (25-40,5%), utilizando también ISG como método de referencia para la detección temprana de preñez. Sin embargo, esos estudios presentaron diferencias metodológicas con nuestro estudio, tuvieron mayor número de resultados falsos negativos (FN) y se realizaron bajo un sistema confinado <sup>[25-27]</sup>. Además, es importante notar que en nuestro estudio, todas las vacas consideradas como candidatas para la pérdida de embriones tenían un CL activo

en el día 19-20. Seleccionamos como estándar de oro para el diagnóstico de preñez a los 19-20 d para este estudio, la interpretación conjunta (en serie) de las tres técnicas diagnósticas (P4 + USG Doppler + ISG). Entendemos que esta es la mejor estimación que se puede obtener de las técnicas diagnósticas disponibles. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que informa la estimación de pérdidas de preñez en ganado lechero diagnosticado por ISG en condiciones de pastoreo; sin embargo, somos conscientes de que este estudio representa solo un tambo. Nuevos estudios que incluyan mayor número de establecimientos y animales podrían contribuir a comprender la mortalidad embrionaria en vacas lecheras en pastoreo.

## Conclusión

Se demostró que USG Doppler es una buena opción para detectar rápidamente vacas no preñadas para que puedan volver a inseminarse antes, minimizando los días abiertos. Sin embargo, sugerimos evaluar el grosor del estrato vascular y del endometrio como una evaluación adicional para mejorar la detección de vacas no preñadas a los 19-20 días post-IA. En combinación con el diagnóstico de preñez mediante USG en modo B a los 33-34 días, podría ser una aplicación práctica y útil para los protocolos de resincronización en la práctica lechera veterinaria. Por último, evaluando en conjunto la detección de ISG, USG Doppler y P4, estimamos una pérdida potencial de embriones del 28,1 % entre los 19 y los 34 días posteriores a la IA.

## Bibliografía

1. Bollwein H, Luttgenau J, Herzog K: Bovine luteal blood flow: basic mechanism and clinical relevance. *Reproduction, fertility, and development* 2012, 25(1):71-79.
2. Dalmaso de Melo G, Mello BP, Ferreira CA, Souto Godoy Filho CA, Rocha CC, Silva AG, Reese ST, Madureira EH, Pohler KG, Pugliesi G: Applied use of interferon-tau stimulated genes expression in polymorphonuclear cells to detect pregnancy compared to other early predictors in beef cattle. *Theriogenology* 2020, 152:94-105.
3. Diaz PU, Belotti EM, Notaro US, Salvetti NR, Leiva CJM, Durante LI, Marelli BE, Stangaferro ML, Ortega HH: Hemodynamic changes detected by Doppler ultrasonography in the ovaries of cattle during early development of cystic ovarian disease. *Animal reproduction science* 2019, 209:106164.
4. Dohoo I, Martin W, Stryhn H: *Veterinary epidemiology*

- research: University of Prince Edward Island, Canada; 2003.
5. Dubuc J, Houle J, Rousseau M, Roy JF, Buczinski S: Short communication: Accuracy of corpus luteum color flow Doppler ultrasonography to diagnose nonpregnancy in dairy cows on day 21 after insemination. *Journal of dairy science* 2020, 103(2):2019-2023.
  6. Ealy AD, Seekford ZK: Symposium review: Predicting pregnancy loss in dairy cattle. *Journal of dairy science* 2019, 102(12):11798-11804.
  7. Fricke PM: Scanning the future--ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *Journal of dairy science* 2002, 85(8):1918-1926.
  8. Fricke PM, Lamb GC: Potential applications and pitfalls of reproductive ultrasonography in bovine practice. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice* 2005, 21(2):419-436.
  9. Gifford CA, Racicot K, Clark DS, Austin KJ, Hansen TR, Lucy MC, Davies CJ, Ott TL: Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. *Journal of dairy science* 2007, 90(1):274-280.
  10. Giordano JO, Guenther JN, Lopes G, Jr., Fricke PM: Changes in serum pregnancy-associated glycoprotein, pregnancy-specific protein B, and progesterone concentrations before and after induction of pregnancy loss in lactating dairy cows. *Journal of dairy science* 2012, 95(2):683-697.
  11. Guimaraes CR, Oliveira ME, Rossi JR, Fernandes CA, Viana JH, Palhao MP: Corpus luteum blood flow evaluation on Day 21 to improve the management of embryo recipient herds. *Theriogenology* 2015, 84(2):237-241.
  12. Han H, Austin KJ, Rempel LA, Hansen TR: Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. *The Journal of endocrinology* 2006, 191(2):505-512.
  13. Herzog K, Brockhan-Ludemann M, Kaske M, Beindorff N, Paul V, Niemann H, Bollwein H: Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology* 2010, 73(5):691-697.
  14. Kaya S, Kacar C, Polat B, Colak A, Kaya D, Gurcan IS, Bollwein H, Aslan S: Association of luteal blood flow with follicular size, serum estrogen and progesterone concentrations, and the inducibility of luteolysis by PGF2alpha in dairy cows. *Theriogenology* 2017, 87:167-172.
  15. Lutgenau J, Bollwein H: Evaluation of bovine luteal blood flow by using color Doppler ultrasonography. *Reproductive biology* 2014, 14(2):103-109.
  16. Monteiro PL, Jr., Ribeiro ES, Maciel RP, Dias AL, Sole E, Jr., Lima FS, Bisinotto RS, Thatcher WW, Sartori R, Santos JE: Effects of supplemental progesterone after artificial insemination on expression of interferon-stimulated genes and fertility in dairy cows. *Journal of dairy science* 2014, 97(8):4907-4921.
  17. Odau S, Gabler C, Holder C, Einspanier R: Differential expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in the bovine oviduct. *The Journal of endocrinology* 2006, 191(1):263-274.
  18. Pugliesi G, Dalmaso de Melo G, Silva JB, Carvalhedo AS, Lopes E, de Siqueira Filho E, Silva LA, Binelli M: Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. *Theriogenology* 2019, 135:73-79.
  19. Quintero Rodriguez LE, Rearte R, Dominguez G, Luzbel de la Sota R, Madoz LV, Giuliadori MJ: Late embryonic losses in supplemented grazing lactating dairy cows: Risk factors and reproductive performance. *Journal of dairy science* 2019, 102(10):9481-9487.
  20. Silke V, Diskin MG, Kenny DA, Boland MP, Dillon P, Mee JF, Sreenan JM: Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Animal reproduction science* 2002, 71(1-2):1-12.
  21. Siqueira LG, Areas VS, Ghetti AM, Fonseca JF, Palhao MP, Fernandes CA, Viana JH: Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *Journal of dairy science* 2013, 96(10):6461-6472.
  22. Stevenson JS: Breeding strategies to optimize reproductive efficiency in dairy herds. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice* 2005, 21(2):349-365.
  23. Sugiura T, Akiyoshi S, Inoue F, Yanagawa Y, Moriyoshi M, Tajima M, Katagiri S: Relationship between bovine endometrial thickness and plasma progesterone and estradiol concentrations in natural and induced estrus. *The Journal of reproduction and development* 2018, 64(2):135-143.
  24. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG: Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* 2012, 40(15):e115.
  25. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 2002, 3(7):RESEARCH0034.
  26. Wijma R, Stangaferro ML, Kamat MM, Vasudevan S, Ott TL, Giordano JO: Embryo Mortality Around the Period of Maintenance of the Corpus Luteum Causes Alterations to the Ovarian Function of Lactating Dairy Cows. *Biology of reproduction* 2016, 95(5):112.
  27. Wiltbank MC, Baez GM, Garcia-Guerra A, Toledo MZ, Monteiro PL, Melo LF, Ochoa JC, Santos JE, Sartori R: Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2016, 86(1):239-253.