

**UNIVERSIDADE PROFESSOR EDSON ANTÔNIO VELANO – UNIFENAS
RAFAEL AUGUSTO DA ANUNCIAÇÃO**

**CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E VASCULARES DO CORPO LÚTEO EM
RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS POSTERIORMENTE
DIAGNOSTICADAS COMO NÃO-GESTANTES OU GESTANTES ATÉ O TERÇO
MÉDIO DA GESTAÇÃO**

**ALFENAS- MG
2024**

RAFAEL AUGUSTO DA ANUNCIÇÃO

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E VASCULARES DO CORPO LÚTEO EM
RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS POSTERIORMENTE DIAGNOSTICADAS
COMO NÃO-GESTANTES OU GESTANTES ATÉ O TERÇO MÉDIO DA GESTAÇÃO

Tese apresentada à Universidade Edson Antônio Velano,
como parte das exigências do Doutorado no Programa de Pós-
Graduação em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal para
a obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gustavo Bruno Siqueira.

Alfenas – MG
2024

Dados internacionais de catalogação-na-publicação
Biblioteca Central da UNIFENAS

Anunciação, Rafael Augusto da

Características morfológicas e vasculares do corpo lúteo em receptoras de embriões bovinos posteriormente diagnosticadas como não-gestantes ou gestantes até o terço médio da gestação / Rafael Augusto da Anunciação. -- Alfenas, 2024.

56 f.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gustavo Bruno Siqueira

Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal - Universidade Professor Edson Antônio Velano, Alfenas, 2024.

1. Bovinos. 2. Corpo lúteo. 3. Receptoras de embriões. 4. Reprodução. 5. Ultrassonografia doppler. I. Universidade Professor Edson Antônio Velano. II. Título.

CDU: 636.2 (043)

Samira Vidal da Silva Ramos
Bibliotecária CRB6 3474



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: “CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E VASCULARES DO CORPO LÚTEO EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS POSTERIORMENTE DIAGNOSTICADAS COMO NÃO-GESTANTES OU GESTANTES ATÉ O TERÇO MÉDIO DA GESTAÇÃO”

Autor: RAFAEL AUGUSTO DA ANUNCIÇÃO

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gustavo Bruno Siqueira

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **DOUTOR EM REPRODUÇÃO, SANIDADE E BEM-ESTAR ANIMAL** pela Comissão Examinadora.

Documento assinado digitalmente
 **LUIZ GUSTAVO BRUNO SIQUEIRA**
Data: 06/01/2025 09:01:14-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. Luiz Gustavo Bruno Siqueira
Orientador

Documento assinado digitalmente
 **CARLOS ANTONIO DE CARVALHO FERNANDES**
Data: 06/01/2025 10:37:52-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. Carlos Antonio Carvalho Fernandes

Documento assinado digitalmente
 **JOAO HENRIQUE MOREIRA VIANA**
Data: 06/01/2025 10:42:40-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana

Documento assinado digitalmente
 **LUIZ FRANCISCO MACHADO PFEIFER**
Data: 06/01/2025 15:15:55-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer

Documento assinado digitalmente
 **MILLER PEREIRA PALHAO**
Data: 21/02/2025 12:48:29-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. Miller Pereira Palhão

Alfenas, 05 de dezembro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **BRUNO CESAR CORREA SALLES**
Data: 21/02/2025 15:24:29-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. Bruno Cesar Correa Salles
Diretor de Pesquisa e Pós-graduação
UNIFENAS

Dedico a minha filha Yasmin e deixo registrado para a eternidade que te amarei para sempre. Você é a luz no meu caminho.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas graças alcançadas e por ter me dado sabedoria.

Aos meus Pais que sempre me apoiaram.

A minha futura esposa Isabele, que além de sempre estar ao meu lado, me presentiu com a oportunidade de ser pai.

À Unifenas pela oportunidade.

À Capes que proporcionou a bolsa de estudos para a realização desse trabalho.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro por meio do projeto aprovado APQ-02126/21

À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade de execução do projeto de pesquisa e apoio técnico.

Ao Prof. Dr Luiz Gustavo Bruno Siqueira pela orientação, paciência e por não desistir de mim. Exemplo de pessoa e profissional que levo em meu coração.

Aos Amigos feitos nessa jornada, agradeço imensamente pelo apóio e por sempre estarem dispostos a ajudar. A vocês Vinicius e Felipe meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Jairo Pereira Neves, que sempre acreditou e coordenou o programa de Pós graduação.

Ao corpo Docente da Unifenas, foram anos de muito aprendizado.

À todos que de alguma forma contribuiu para a realização desse sonho.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi demonstrar as características morfológicas e funcionais do corpo lúteo (CL) em fêmeas bovinas submetidas à transferência de embriões (TE), avaliando a relação destas variáveis com o estabelecimento e a manutenção da gestação até o final do segundo trimestre. A pesquisa foi realizada com um rebanho de gado leiteiro, composto por 113 vacas e novilhas da raça Girolando utilizadas como receptoras. Para a produção *in vitro* de embriões (PIV), utilizou-se ovócitos de fêmeas Nelore abatidas. A TE foi realizada em receptoras previamente sincronizadas com um protocolo padrão para TE em tempo fixo (TETF), sendo transferido um blastocisto expandido 7º dia (D7) após o cio arbitrário do protocolo. A área do CL foi mensurada, sua vascularização quantificada e amostras de sangue foram coletadas para dosagem de progesterona (P4) no dia da TE. Os mesmos procedimentos, exceto a coleta de sangue para dosagem de P4, foram realizados no dia do diagnóstico de gestação (D33) e, naquelas fêmeas gestantes, semanalmente até o 4º mês e mensal no 5º e 6º meses. Os dados foram analisados com o software SAS (versão 9.4), verificando previamente a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Caso a normalidade não fosse alcançada, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foram submetidos à ANOVA, com diferenças significativas analisadas pelo teste t de Student ou Tukey-Kramer. O nível de significância adotado foi $P \leq 0,05$. A concentração plasmática de P4 no dia da TE não apresentou diferença ($p=0,14$) entre vacas futuramente prenhes ($4.14 \pm 1.57 \text{ ng/mL}$) e vazias ($3.7 \pm 1.44 \text{ ng/mL}$). Ao analisar a relação entre as variáveis medidas no D7 e a probabilidade de gestação, houve diferença no escore de fluxo sanguíneo das receptoras que posteriormente foram diagnosticadas como prenhas (2.33 ± 0.82 ; escala 1 a 4) em relação aquelas futuramente diagnosticadas como vazias (2.66 ± 0.76 ; $p=0,05$). A área do CL apresentou tendência ($p=0,08$) de superioridade nos animais prenhes ($3.25 \pm 0.85 \text{ cm}^2$ vs 3.18

$\pm 1.09\text{cm}^2$; prenhes e vazias, respectivamente) enquanto o fluxo sanguíneo do CL (CLBF) não diferiu entre prenhes e vazias ($18.09 \pm 10.11\%$ vs $20.77 \pm 8.57\%$; prenhes e vazias, respectivamente; $p=0,12$). Ao avaliar as alterações temporais de área e fluxo sanguíneo do CL nos animais gestantes até 6º mês (D181), foi observado efeito de tempo sobre a área do CL ($P=0,0004$), escore ($p<0,0001$) e CLBF ($p<0,0001$), aumentando no terço inicial da gestação e com posterior declínio. Em conclusão, características morfológicas e vasculares no D7 não influenciaram a chance de estabelecimento da gestação, porém foram observadas alterações importantes no CL durante os dois primeiros trimestres da gestação em receptoras de embriões bovinos.

Palavras-chave: bovinos; corpo lúteo; receptoras de embriões; reprodução; ultrassonografia doppler.

ABSTRACT

The objective of this study was to demonstrate the morphological and functional characteristics of the corpus luteum (CL) in female cattle subjected to embryo transfer (ET), evaluating the relationship between these variables and the establishment and maintenance of pregnancy until the end of the second trimester. The research was conducted with a dairy cattle herd consisting of 113 cows and heifers of the Girolando breed used as recipients. For in vitro embryo production (IVP), oocytes from slaughtered Nelore females were used. ET was performed in recipients previously synchronized with a standard protocol for timed artificial insemination (TAI), with an expanded blastocyst transferred on the 7th day (D7) after the arbitrary estrus of the protocol. The CL area was measured, its vascularization quantified, and blood samples were collected to measure progesterone (P4) on the day of ET. The same procedures, except for the blood collection for P4 measurement, were performed on the pregnancy diagnosis day (D33) and, for those pregnant females, weekly until the 4th month and monthly during the 5th and 6th months. The data were analyzed using SAS software (version 9.4), first checking the normality of the residuals with the Shapiro-Wilk test. If normality was not achieved, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used. The data were subjected to ANOVA, with significant differences analyzed using the Student's t-test or Tukey-Kramer test. The significance level was set at $P \leq 0.05$. The plasma concentration of P4 on the day of ET did not differ ($p=0.14$) between cows that became pregnant (4.14 ± 1.57 ng/mL) and those that remained non-pregnant (3.7 ± 1.44 ng/mL). When analyzing the relationship between the measured variables on D7 and the probability of pregnancy, there was a difference in the blood flow score of recipients later diagnosed as pregnant (2.33 ± 0.82 ; scale 1 to 4) compared to those diagnosed as non-pregnant (2.66 ± 0.76 ; $p=0.05$). The CL area showed a trend ($p=0.08$) of being larger in pregnant animals (3.25 ± 0.85 cm² vs 3.18 ± 1.09 cm²; pregnant and non-pregnant, respectively), while the CL blood flow (CLBF) did not differ between pregnant and non-pregnant cows ($18.09 \pm 10.11\%$ vs $20.77 \pm 8.57\%$; pregnant and non-pregnant, respectively; $p=0.12$). When evaluating the temporal changes in CL area and blood flow in pregnant animals until the 6th month (D181), a time effect was observed for the CL area ($P=0.0004$), score ($p<0.0001$), and CLBF ($p<0.0001$), with an increase in the early third of pregnancy followed by a decline. In conclusion, morphological and vascular characteristics on D7 did not influence the likelihood of pregnancy establishment; however, significant changes in the CL were observed during the first two trimesters of pregnancy in

embryo transfer recipients.

Keywords: cattle; corpus luteum; doppler ultrasonography; embryo recipients; reproduction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração plasmática de progesterona (P4) no D7 em receptoras posteriormente diagnosticadas prenhes ou vazias.	43
Tabela 2 - Características do corpo lúteo, escore de vascularização e CLBF no D7, comparando-se receptoras prenhes e vazias.	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Área em Cm^2 do CL de receptoras prenhas durante o D7 ao D181	45
Figura 2 - Escore do fluxo sanguíneo do CL do D7 ao D181 da gestação em receptoras de embriões	45
Figura 3 - Fluxo sanguíneo do CL (CLBF) do D7 ao D181 de gestação em receptoras de embriões.	46
Figura 4 - Gráfico tipo <i>scatter plot</i> da área do CL em função do tempo de gestação.	47
Figura 5 - Gráfico do tipo <i>scatter plot</i> do CLBF em função do tempo de gestação.....	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Luteólise: mecanismos envolvidos na luteólise funcional e física.....	15
2.2	Mecanismos de prevenção da luteólise e reconhecimento materno da gestação	18
2.3	Importância do corpo lúteo na gestação e desenvolvimento embrionário.....	20
2.4	Receptividade uterina ao embrião e perda gestacional.....	21
2.5	Ultrassografia na avaliação do ciclo estral e gestação.....	24
2.6	Seleção de receptoras para transferência de embriões.....	28
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivo geral:	30
3.2	Objetivos específicos:.....	30
4	HIPÓTESES	30
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
	<i>CAPÍTULO 1: Características morfológicas e vasculares do corpo lúteo em receptoras de embriões bovinos.....</i>	<i>37</i>

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se globalmente na pecuária, sendo um dos líderes mundiais tanto na exportação de carne, quanto no desenvolvimento e aplicação comercial de biotecnologias reprodutivas (Baruselli *et al.*, 2017). Significativas melhorias na produtividade pecuária foram alcançadas por meio das tecnologias de embriões, forma eficaz de produzir bezerros, contribuindo com o melhoramento genético do rebanho (Choi *et al.*, 2023).

A multiplicação de animais de mérito genético superior, seja por produção de embriões *in vivo* ou *in vitro*, é especialmente relevante devido aos longos intervalos entre as gerações dos bovinos (Lamb *et al.*, 2021). Na última década, a produção *in vitro* de embriões bovinos tornou-se essencial para o melhoramento genético leiteiro, graças à combinação de seleção genômica, estimulação ovariana e técnicas avançadas, como coleta de oócitos guiada por ultrassom, maturação e fertilização *in vitro*, e cultivo de embriões até o estágio de blastocisto (Sirard *et al.*, 2019). Essas tecnologias tanto *in vivo*, que permitem que fêmeas tenham múltiplos descendentes em poucos meses, com a transferência de embriões ocorrendo a cada 6 a 8 semanas ou *in vitro*, onde a coleta de oócitos podendo ser feita a cada 2 semanas, maximizam a produção de embriões (Sirard *et al.*, 2019).

O sucesso no uso das tecnologias de embriões depende de fatores associados à doadora, à qualidade do embrião e à receptora (Phillips; Jahnke, 2016). Após a colheita dos embriões transferíveis de uma fêmea doadora ou a produção de embriões *in vitro* (PIV), é crucial realizar a seleção criteriosa das receptoras afim de otimizar as taxas de gestação, envolvendo cuidados com manejo, nutrição e controle do ciclo estral desses animais, para garantir a presença de um corpo lúteo (CL) funcional durante a gestação (Lamb *et al.*, 2021; Thomson *et al.*, 2021). A presença de um CL de boa qualidade é fundamental para a seleção de receptoras aptas, sendo um dos principais fatores determinantes para que se alcance altas taxas de prenhez (Pugliesi *et al.*, 2023).

A ultrassonografia como ferramenta de análise do CL tem sido realizada para identificar o estágio do ciclo estral e o estado funcional do CL (Pugliesi *et al.*, 2019). Com o advento da ultrassonografia Doppler colorido tornou possível avaliar além da área do CL, a intensidade do fluxo sanguíneo nos folículos ovarianos e no CL (Pugliesi *et al.*, 2023). Esse modo ultrassonográfico fornece imagens que percebem as vascularizações do CL, tanto no seu desenvolvimento quanto na luteólise funcional e estrutural, proporcionando a estimativa do estado fisiológico do CL (Pugliesi *et al.*, 2019). Sendo assim, ao determinar a perfusão

sanguínea lútea, é possível estimar a função lútea em diferentes fases do ciclo estral, bem como no início da gestação, e sua associação com o perfil de progesterona circulante (Pugliesi *et al.*, 2019). Dessa forma, a associação do modo B e Doppler colorido disponibilizam estratégias para avaliar o estado funcional do CL fornecendo dados para o preparo no manejo reprodutivo das vacas receptoras de embrião (Siqueira *et al.*, 2019).

Sendo assim, objetivou-se investigar as características morfológicas e funcionais do CL em receptoras bovinas submetidas a TE de embriões e sua relação com a situação gestacional, demonstrando as características do CL até o final do segundo trimestre gestacional, e as alterações na dinâmica da perfusão vascular do CL durante esse período. Uma vez que, em bovinos por mais que o CL permaneça ao longo de toda a gestação o número de células lúteas sofre uma redução significativa no terço final da gestação (Shemesh *et al.*, 1988). Além disso, a função secretora de P4 do CL bovino na gestação apresenta uma queda acentuada a partir dos dias 190 e 275 (Shemesh, 1990). Essa diminuição na secreção é atribuída à redução tanto no número de células lúteas, quanto na atividade secretora e na responsividade das células (Shemesh, 1990). Uma vez que a placenta bovina apresenta atividade esteroideogênica nos primeiros estágios da gestação, ela só consegue substituir totalmente o CL na produção de P4 em quantidade suficiente para manter a gestação nos estágios finais, a partir de cerca de 180 a 200 dias de gestação (Nguyen *et al.*, 2012). Sendo assim a principal hipótese é que associação das características morfológicas e vasculares do CL de fêmeas submetidas a TE de podem afetar a probabilidade do estabelecimento da gestação e a manutenção da mesma, havendo alterações morfológicas do CL durante a gestação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Luteólise: mecanismos envolvidos na luteólise funcional e física

O funcionamento ideal do CL requer o desenvolvimento de uma extensa rede capilar, uma vez que a maior parte do fluxo sanguíneo ovariano flui para o ovário que contém o CL (Pohler *et al.*, 2019). Essa variação no fluxo sanguíneo durante o ciclo estral causa alterações no transporte de nutrientes, hormônios e gases, a fim de fornecer nutrientes para a produção e secreção de P4 (Yamei Luo, 2020). A luteólise e a luteostase são processos que determinam a vida útil do CL dentro do espaço anatômico do ovário, bem como o período

fisiológico de duração do ciclo estral não gestacional ou do período do estro ao parto, em um ciclo gestacional (Meidanl *et al.*, 1996). A luteólise é o processo que refere-se à quando o CL sofre degradação e, portanto, perda da capacidade de síntese de P4, para que haja o retorno ao estro, após a queda da P4 e da inibição que ela exerce sobre a liberação de gonadotrofinas (pico pré-ovulatório de LH), possibilitando uma nova ovulação (Davis; Lavoie, 2019) .

Duas das características marcantes da luteólise são a rápida diminuição na produção de progesterona pelo CL e a morte programada (apoptose) das células luteais (Diaz; Wiltbank, 2005). A luteólise é caracterizada pela regressão funcional, na qual a produção de P4 diminui; e pela regressão estrutural, na qual o CL fisicamente se dissipa, formando uma estrutura dentro do estroma ovariano chamada de corpo *albicans* (Monaco; Davis, 2023). A regressão estrutural envolve várias vias de remodelação tecidual, incluindo infiltração de células imunes, quebra e acúmulo de matriz extracelular e regressão da microvasculatura (Monaco; Davis, 2023). Portanto, os sinais iniciais da regressão lútea são a ruptura na vascularização e o declínio na secreção de P4, seguidos pela regressão estrutural do CL através de apoptose e reabsorção do tecido (Davis; Lavoie, 2019).

A luteólise é iniciada pelos efeitos da produção de prostaglandina F2 alfa (PGF2 α) pelas células endometriais, que atinge o ovário pela via unilateral em rota direta de um corno uterino ipsilateral ao contendo o CL na maioria das espécies (por exemplo, bovinos e ovinos). O mecanismo de contracorrente entre a veia uterina e a artéria ovariana faz com que a artéria fique enovelada à superfície da veia útero-ovariana, facilitando o transporte de muitas substâncias, permitindo assim que a PGF2 α chegue diretamente ao ovário sem entrar na circulação sistêmica, onde seria metabolizada 80% nos pulmões e inativada (Silva *et al.*, 2010).

Na circulação sistêmica, a PGF2 α é inativada em 13, 14-diidro-15-ceto prostaglandina F2-alfa (PGFM) (Martin *et al.*, 2015). Devido ao rápido metabolismo nos pulmões e à meia vida-curta da PGF2 α , logo grande parte é metabolizada na primeira passagem pelos pulmões, fazendo com que a concentração plásmatica de PGFM seja frequentemente utilizada para representar padrão de liberação de PGF2 α , uma vez que o metabólito PGFM apresenta uma meia vida mais longa na circulação periférica, cerca de 8 min, em comparação com <1 min da PGF2 α , possibilitando sua mensuração (Pugliesi *et al.*, 2011). Durante a luteólise são observados valores de pulsos de PGFM variando entre 150 a 570 pg/ml, o que indica a ocorrência de cinco a oito pulsos de PGF2 α com duração de 1 a 5 horas em um período de dois a três dias (Martin *et al.*, 2015). Esses pulsos sequenciais de

PGF2 α , conforme determinado pelas concentrações de PGFM, são necessários para induzir a luteólise completa em bovinos (Pugliesi *et al.*, 2011). Essa PGF2 α chegando no CL se associará a receptores presentes na membrana plasmática das células luteais, iniciando as cascatas intracelulares que resultam na luteólise (Silva *et al.*, 2010).

Em relação à estrutura vascular, a extensão da angiogênese dentro do CL atinge o seu máximo dentro de 2 a 5 dias após a ovulação, na medida em que o CL se torna maduro e a maioria das células esteroidogênicas estabelece contato com os capilares, tornando-se altamente vascularizado (Acosta; Miyamoto, 2004). Nesse momento o CL se torna responsivo aos efeitos da PGF2 α , sendo agora capaz de sofrer luteólise, pois essas alterações vasculares resultam na diminuição do diâmetro vascular e estão intimamente relacionadas à hemodinâmica do CL, evidenciando que a rápida diminuição do fluxo sanguíneo é uma das principais ações luteolíticas da PGF2 α (Miyamoto *et al.*, 2005).

Para que se inicie o processo de luteólise, próximo ao final da fase luteal, receptores endometriais de P4 são reduzidos ao final do diestro, permitindo a ação do E2, com a elevação de receptores ativos de estradiol, os quais induzem o aumento de receptores de ocitocina no endométrio (Ivell, 1999). A ocitocina é um hormônio neurohipofisário, inicialmente secretada pelas células neurosecretoras do hipotálamo (Billhaq; Lee, 2023), sendo esse hormônio armazenado na hipófise posterior até sua liberação na corrente sanguínea (Billhaq; Lee, 2023). Além disso, a ocitocina também é produzida por fontes não neurais e já foram observados transcritos (RNAm) da ocitocina e de seus receptores em locais de síntese local no trato reprodutivo, incluindo o próprio CL (Arrowsmith; Wray, 2014).

Assim, com a subsequente ativação dos receptores de ocitocina no endométrio, ocorre o estímulo da atividade da fosfolipase C, proteína quinase C e fosfolipase A2, que cliva o ácido araquidônico, convertendo-o em prostaglandina H2 pela ciclooxigenase 2, a qual é convertida em PGF2 α pelos membros da família 1 da aldo-ceto redutase B1 (AKR1B1) e C4 (AKR1C4) (Cracken; Custer; Lamsa, 1999). A secreção de PGF2 α induz a secreção de ocitocina estocada no CL e, conseqüentemente, amplia a produção de PGF2 α endometrial em resposta a essa suplementação auxiliar de ocitocina; ou seja, há uma retroalimentação positiva entre a ocitocina e PGF2 α , causando a regressão do CL (Ivell, 1999).

Segundo Yamei *et al.* (2012) há uma diminuição do fluxo sanguíneo ovariano durante a regressão lútea e níveis baixos durante a formação lútea inicial após ovulação, caracterizado por baixo oxigênio no ambiente do CL. Respostas celulares a condições de hipóxia são reguladas através de fatores induzíveis (HIFs), fatores esses específicos de

condições de hipóxia e reguladores de muitos processos, incluindo angiogênese, glicólise, apoptose, autofagia e função ovariana, demonstrando que os vasos sanguíneos e as células endoteliais do CL tem papel essencial na função lútea, com grande importância nos sistemas que regulam a luteólise.

O fluxo sanguíneo tem papel crucial na fisiologia do CL. A rápida diminuição do fluxo sanguíneo lúteo causa impacto no nível de resposta à $PGF2\alpha$, de modo que a administração exógena de $PGF2\alpha$ durante a fase lútea média (entre 8 e 12 dias do ciclo estral) reduz drasticamente o volume e a concentração de P4 produzidos pelo CL. Contudo, o mesmo tratamento se realizado durante a fase lútea inicial (até 5 dias após o estro), não é capaz de induzir luteólise, o que evidencia a estreita relação da rede vascular do CL e a ação da $PGF2\alpha$ para promover a regressão lútea (Miyamoto; Shirasuna, 2009).

A $PGF2\alpha$ exerce a função luteolítica mediada por receptores da via fosfolipase C-cálcio intracelular-PKC e ativação de proteínas quinases, dependente de cálcio, calmodulina, proteína quinase 2 e proteína quinase ativada por 59- adenosina monofosfato (Plewes *et al.*, 2023), as quais exercem a regulação da biossíntese de progesterona (Billhaq; Lee, 2023), por meio da inibição da via estimuladora do hormônio luteinizante (LH), das enzimas esteroidogênicas e do transporte de colesterol (Diaz; Wiltbank, 2005). Já durante a luteólise, a inibição do LH altera a produção de P4 (Billhaq; Lee, 2023). Sua máxima produção pelo CL depende da absorção de colesterol exógeno das lipoproteínas, sendo o LDL a principal lipoproteína circulante e a mais estimuladora para essa produção (Diaz; Wiltbank, 2005). Além disso, o transporte do colesterol do citoplasma para a membrana mitocondrial interna, mediado em parte pela proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR), também desempenha um papel importante nesse sistema (Lavoie *et al.*, 1997).

Neste contexto, a $PGF2\alpha$ inibe tanto a expressão do RNAm quanto a síntese da proteína StAR no CL (Davis; Lavoie, 2019). Portanto, a regulação induzida pela $PGF2\alpha$ das vias de transporte de colesterol, como o receptor de LDL e StAR, além da regulação por fatores de transcrição que controlam essas vias, podem ser aspectos mecânicos críticos no processo de aquisição da capacidade luteolítica (Lavoie *et al.*, 1997).

2.2 Mecanismos de prevenção da luteólise e reconhecimento materno da gestação

A luteostase é o processo pela qual o CL se mantém durante a prenhez, sustentando a produção de P4 para o estabelecimento e manutenção da gestação. Assim, a luteólise é

impedida de ocorrer por meio de mecanismos coletivamente conhecidos como ‘reconhecimento materno da gestação (Meidanl *et al.*, 1996; Davis; Lavoie, 2019) processo que é majoritariamente coordenado pelo conceito em desenvolvimento (Davis; Lavoie, 2019). Após o período pré-implantação, o embrião em desenvolvimento sofre uma mudança significativa na morfologia após a eclosão da zona pelúcida, cerca de 8 dias após a fertilização (Wang; Guillomot; Hue, 2009). Por volta do 12º dia após a fecundação, inicia-se a proliferação do trofoblasto (Berg *et al.*, 2010). O conceito assume uma forma ovoide antes de se alongar para uma forma tubular e depois filamentosa nos dias 16-17. O comprimento do embrião dobra a cada dia entre os dias 9 e 16, com um aumento acentuado entre os dias 13 e 14 (Wang; Guillomot; Hue, 2009; Berg *et al.*, 2010). Este aumento no tamanho do conceito coincide com o aumento do fator de reconhecimento materno da gestação, o interferon-tau (IFN-tau) (Berg *et al.*, 2010).

Mecanismo esse onde o embrião em desenvolvimento produz sinais que impedem a regressão do CL, produzindo sinais que mantêm o CL ativo e produzindo P4, mantendo seus níveis adequados para a manutenção da gestação, onde inadequados níveis de P4 contrui para a perda precoce da prenhez (Lemley; Camacho; Vonnahme, 2014). Uma vez que a secreção de P4 tem influência no ambiente uterino, inibindo a divisão mitótica do endométrio, indução da diferenciação do estroma, estímulo de secreções glandulares uterinas de nutrientes e fatores de crescimento, esses essenciais para o desenvolvimento inicial do conceito (Niswender *et al.*, 2000).

Além dos efeitos sobre o ambiente uterino, um sinal bioquímico é gerado para prevenir a luteólise, permitindo que o CL persista funcional e permaneça secretando P4, ou seja, a fêmea deve reconhecer rapidamente a presença do conceito para que a atividade do CL exceda a duração do ciclo estral (Niwesnder *et al.*, 2000). Esse reconhecimento ocorre através da secreção de interferon-tau (IFN-tau) produzido pelas células trofoblásticas embrionárias, durante os dias 15 e 17 após o estro. Uma eventual resposta inadequada do endométrio ao IFN-tau é uma das principais razões para a produção e ação indesejada de PGF2 α pelas células endometriais, levando a uma falha no estabelecimento da prenhez (Lemley; Camacho; Vonnahme, 2014). O IFN-tau é uma proteína secretada pelas células monocleares do trofoectoderma de conceitos (embriões e membranas extraembrionárias) de ruminantes. Seu efeito antiluteolítico ocorre através da do bloqueio da expressão de receptores alfa de E2, o que por sua vez impedirá o surgimento de receptores de ocitocina no epitélio uterino. Desta

forma, anula-se a liberação pulsátil de $\text{PGF2}\alpha$, impedindo a regressão do CL, prevenindo a supressão da produção de P4 (Bazer *et al.*, 2020).

2.3 Importância do corpo lúteo na gestação e desenvolvimento embrionário inicial.

O sucesso da fertilização em bovinos é tipicamente elevado (>85%); contudo, muitos dos embriões resultantes não conseguem desenvolver-se de forma adequada. Assim, uma proporção significativa de perdas gestacionais ocorre entre a fertilização e o período de reconhecimento materno da gestação (Berg *et al.*, 2010; Lonergan; Sánchez, 2020). Até o reconhecimento materno da gestação, várias etapas ocorrem e são necessárias para o estabelecimento da prenhez. Primeiramente, a ovulação de um ovócito competente, em seguida esse ovócito precisa ser fertilizado por um espermatozoide, após a fertilização no oviduto, o embrião bovino entra no útero, aproximadamente no 4º dia de desenvolvimento e no estágio de 16 células (Berg *et al.*, 2010). Por volta do 7º dia, o embrião forma um blastocisto, que consiste em uma massa celular interna, responsável pela formação do embrião, e um trofotoderma, que eventualmente formará a placenta (Pohler *et al.*, 2019).

Entre os dias 9º e 10º dia, ocorre a eclosão da zona pelúcida do blastocisto (Lonergan; Sánchez, 2020). Após isso, o blastocisto passa por mudanças morfológicas, transitando de uma forma esférica para uma forma ovoide (Pohler *et al.*, 2019). Esse período precede o alongamento do trofotoderma, que se transforma de uma forma inicialmente esférica para uma forma filamentosa, geralmente começando por volta do 12º ao 14º dia de desenvolvimento. Essas mudanças são necessárias para o desenvolvimento inicial do embrião bovino dentro do útero (Lonergan; Sánchez, 2020). Quantidade considerável de perdas gestacionais em bovinos ocorrem durante o primeiro mês de gestação (Pohler *et al.*, 2019). Contudo, o percentual mais significativo de perdas ocorre durante a fase inicial de alongamento do embrião, especialmente entre os dias 7 e 14 (Pohler *et al.*, 2019). Esse período é crítico devido à eclosão do blastocisto e ao início do desenvolvimento do embrião, representando um momento de vulnerabilidade para a gestação (Alkan *et al.*, 2020; Lonergan; Sánchez, 2020; Agarwal *et al.*, 2023).

O tamanho do CL e sua relação com a produção de P4 circulante são parâmetros frequentemente utilizados em pesquisas (Alkan *et al.*, 2020). Uma vez que existe forte associação positiva entre a concentração de P4 e o desenvolvimento embrionário em bovinos, as perdas embrionárias que ocorrem principalmente antes de 16 dias após a concepção estão

associadas a um tamanho menor do CL, com consequentes baixos níveis de P4 circulante (Nogueira *et al.*, 2012; Madoz *et al.*, 2021; Pugliesi *et al.*, 2023). Essa P4 é fundamental para o estabelecimento e manutenção da gestação, devido a fatores essenciais para estimular e sustentar as funções endometriais, que estão relacionadas a sobrevivência, implantação e crescimento embrionário (Madoz *et al.*, 2021). Concentrações reduzidas de P4 após a ovulação têm sido associadas à redução do crescimento e alongamento do concepto, consequentemente havendo redução da produção de IFN-tau, reduzindo assim a taxa de concepção em bovinos (Lonergan; Sánchez, 2020). Por sua vez, elevadas concentrações de P4 tem sido associadas ao avanço do alongamento do concepto, assim, aumentando a produção de IFN-tau, elevando a taxa de concepção (Alkan *et al.*, 2020; Lonergan; Sánchez, 2020).

Como demonstrado por Rotheneder *et al.* (2022), altas concentrações de P4 na primeira semana após a ovulação levaram à formação de conceptos mais longos e com maior produção de IFN-tau. Além disso, foi observado que as baixas concentrações de P4 no início da gestação prejudicam o desenvolvimento do concepto. Já no trabalho realizado por Alkan *et al.*, (2020), constatou-se que à medida em que o diâmetro do CL aumentava, as taxas de concepção aumentavam, havendo um efeito significativo do diâmetro do CL sobre a taxa de prenhez após a transferência de embriões em novilhas de corte.

Por fim, Choi *et al.* (2023), ao avaliar os efeitos do tamanho do CL, níveis de P4 e taxa de prenhez após a transferência de embriões (TE), observaram que as vacas receptoras com CL maior do que 1,5 cm apresentaram taxas de prenhez estatisticamente mais altas comparadas às com CL de tamanho inferior, além de apresentarem níveis plasmáticos de P4 considerados adequados, entre 2,0 e 4,0 ng/mL. Desta forma, a seleção pelo tamanho do CL no momento da transferência de embriões foi um fator importante para aumentar a taxa de prenhez.

2.4 Receptividade uterina ao embrião e perdas gestacionais

A regulação da função uterina em relação à receptividade ao embrião é principalmente regulada pelos esteróides sexuais: E2, proveniente do folículo dominante durante o estro, e P4, derivada do CL no diestro (Pohler *et al.*, 2019). A P4 é necessária para criar um ambiente intrauterino propício para suportar a implantação, placentação, crescimento e desenvolvimento embrionário e fetal (Madoz *et al.*, 2021). O hormônio P4 desempenha um

papel no processo de remodelação endometrial. Essa remodelação envolve a transformação endométrio de uma fase proliferativa para uma fase secretora (Billhaq; Lee, 2023).

Durante a fase proliferativa, estimulada principalmente pelo E2, o endométrio cresce e se prepara para receber um possível embrião, já na fase secretora as glândulas endometriais aumentam em tamanho e começam a secretar substâncias nutritivas que são essenciais para a possível implantação do embrião (Billhaq; Lee, 2023). A desregulação da comunicação entre o desenvolvimento do blastocisto e a modulação da função endometrial, através da síntese inadequada de P4 ou resposta uterina indevida, pode resultar em mortalidade embrionária precoce, com taxas variando de 25% a 30% em bovinos (Pohler *et al.*, 2019).

O blastocisto depende exclusivamente das secreções uterinas para seu desenvolvimento, o epitélio das glândulas uterinas secretam um conjunto complexo de moléculas essenciais para a sobrevivência e alongamento do blastocisto, incluindo moléculas sinalizadoras e reguladores da sobrevivência do conceito, seu desenvolvimento, implantação e placentação (Pohler *et al.*, 2019). Portanto, as glândulas uterinas são fundamentais para o desenvolvimento embrionário pré-implantacional (Gray *et al.*, 2001).

Durante a gestação inicial, o desenvolvimento do conceito é coordenado por interações complexas entre o conceito (embrião/feto) e as células uterinas, como o epitélio glandular superficial, os epitélios glandulares e as células do estroma (Bazer *et al.*, 2015). A função uterina ideal para receber o embrião consiste em proporcionar um ambiente adequado de nutrientes e fatores de crescimento no fluido luminal uterino. Esse fluido é enriquecido com secreções das células epiteliais luminais e glandulares do endométrio, as quais apoiam o desenvolvimento embrionário durante as primeiras 3 semanas de gestação (Pohler *et al.*, 2019). Essas interações são essenciais para o desenvolvimento do conceito, para o suprimento sanguíneo que garante a oxigenação e nutrição do conceito, o transporte de água e eletrólitos, o transporte seletivo de nutrientes como glicose e aminoácidos para o lúmen uterino, os quais são fundamentais para o crescimento fetal (Billhaq; Lee, 2023). Além disso, a secreção ou transporte de componentes do histotrófo para o lúmen uterino atende às demandas específicas do conceito, além de ajudar no reconhecimento materno da gestação (Bazer *et al.*, 2015).

Falhas no estabelecimento da gestação em bovinos são fatores importantes que prejudicam a lucratividade da pecuária (Pohler *et al.*, 2019). Em bovinos, a perda gestacional tem sido caracterizada como mortalidade embrionária precoce (até 28 dias de gestação) e perda embrionária tardia/mortalidade fetal (após o 28º dia de gestação) (Pohler *et al.*, 2019).

A perda precoce da gestação em bovinos apresenta incidência em torno de 25 a 30% e é influenciada por mecanismos como anormalidades genéticas, assincronia entre o útero e o embrião, o que pode resultar em falha no reconhecimento materno da gestação, além de regressão luteal prematura (Pereira; Wiltbank; Vasconcelos, 2016). Já mortalidade embrionária tardia ocorre em torno de 8% das gestações e é geralmente agrupada com a mortalidade fetal precoce para definir a perda gestacional a partir dos 28º de gestação, período que inclui mudanças fisiológicas essenciais como a placentação, organogênese e a transição de embrião para feto (Pereira; Wiltbank; Vasconcelos, 2016). Embora a incidência de mortalidade embrionária tardia seja menor do que a precoce, as consequências econômicas podem ser significativas, devido ao atraso prolongado da concepção (Pohler *et al.*, 2019).

Em bovinos, existem momentos específicos durante o ciclo estral ou prenhez que o CL pode sofrer regressão, como citado anteriormente. Ao classificar a luteólise em quatro períodos distintos, identificamos o primeiro período potencial de luteólise, que ocorre por volta do dia 7 (Wiltbank *et al.*, 2016). Durante esse período, fêmeas bovinas no seu primeiro ciclo estral pós-parto podem apresentar uma duração curta, de aproximadamente apenas 10 dias, devido a uma regressão precoce do CL. A luteólise nesse estágio não é evitada pela eventual presença de um embrião, mas existem mecanismos específicos que previnem essa regressão precoce (Wiltbank *et al.*, 2016). Já no segundo período, que ocorre aproximadamente entre os dias 18 e 25, é o momento clássico para a luteólise em vacas não gestantes. Nesse intervalo, caso a vaca esteja prenhe, ocorre a manutenção do CL, em um fenômeno chamado "reconhecimento materno da gestação" (Diaz; Wiltbank, 2005).

Já no terceiro período, que ocorre aproximadamente entre os dias 30 e 60 de gestação, uma eventual regressão do CL pode acontecer, mas é geralmente evitada por mecanismos que ainda não estão completamente definidos (Wiltbank *et al.*, 2016). Curiosamente, o CL persiste nessa fase mesmo quando os pulsos de PGF2 α induzidos por ocitocina estão em ascensão (Wiltbank *et al.*, 2023). Contudo, é provável que o IFN-tau já não desempenhe um papel significativo na manutenção do CL nesse estágio, uma vez que sua secreção pelo concepto em desenvolvimento atinge seu pico por volta do 23º dia de gestação e depois diminui drasticamente nas semanas subsequentes (Wiltbank *et al.*, 2016). A principal questão a entender é, como mecanicamente o CL da gestação é protegido desses pulsos de PGF2 α , que estão claramente presentes após o período IFN-tau em ruminantes (Wiltbank *et al.*, 2023). Desta forma, a principal causa de perda gestacional nesse período pode ser a morte embrionária precoce, ocasionadas por atrasos ou defeitos no desenvolvimento dos

placentomas corioalantóides ou do embrião em si, resultando na morte do embrião durante este período crucial, seguida de luteólise e regressão do CL, ou alternativamente, uma luteólise indevida pode resultar na perda da prenhez (Giordano *et al.*, 2012).

O quarto período de luteólise ocorre próximo ao término da gestação, quando a sinalização do feto é necessária para iniciar o parto em ruminantes, sendo identificado como principal responsável o cortisol produzido pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal fetal durante a sua maturação (Jenkin; Young, 2004). As concentrações circulantes de cortisol aumentam exponencialmente nas últimas semanas de gestação, acarretando em um aumento nos níveis circulantes de E2, queda abrupta na P4, aumento dos receptores de ocitocina no endométrio e seguido por um aumento da PGF2 α , o que leva a regressão do CL (Jenkin; Young, 2004). A regressão do CL nesse momento é essencial para a fisiologia do processo normal de parto (Wiltbank *et al.*, 2016). Em todos os mamíferos, o CL é a principal fonte de P4 no início da gestação (Nguyen *et al.*, 2012). Diferentemente dos seres humanos e ovinos, onde a placenta assume a produção de P4 como principal fonte relativamente cedo na gestação, o CL mantém esse papel por mais tempo (Nguyen *et al.*, 2012). Embora, nas fases intermediária e final da prenhez, a placenta também contribua com quantidades variáveis de P4 em vacas prenhas (Wiltbank *et al.*, 2016).

O CL em bovinos prenhes continua produzindo P4 e permanece como uma fonte importante desse hormônio durante toda a gestação, embora haja um declínio na produção ao decorrer da mesma (Nguyen *et al.*, 2012). Embora a placenta bovina apresente atividade esteroidogênica nos estágios iniciais da gestação, sua capacidade de substituir completamente o CL na produção de P4 suficiente para sustentar a gestação ocorre apenas nos estágios finais, a partir de aproximadamente 180 a 200 dias de gestação (Nguyen *et al.*, 2012).

2.5. Ultrassografia na avaliação do ciclo estral e gestação

A ultrassonografia transretal em tempo real é uma importante ferramenta para avaliar e diagnosticar o sistema reprodutivo de fêmeas bovinas. Com o auxílio da tecnologia do ultrassom é possível visualizar todo o sistema reprodutivo de forma não invasiva (Durocher, 2006). Tornando possível visualizar órgãos e tecidos em tempo-real, que antes eram apenas detectáveis no estado estático durante a necropsia ou remoção cirúrgica, proporcionando a investigação das alterações dinâmicas nas estruturas biológicas como: padrões de ondas foliculares ovarianas durante o ciclo estral, o processo de ovulação, dinâmica da fase luteínica

e as interações entre o concepto e útero (Pierson; Kastelic; Ginther, 1988). A ultrassonografia permite maior precisão em comparação a palpação transretal na avaliação e manejo reprodutivo, se tornando uma ferramenta para auxiliar na clínica e pesquisa na área da reprodução bovina. Utilizada na maioria dos estudos em que a morfologia e função são relacionadas e como ferramenta clínica para diagnosticar de forma precoce a gestação, identificar o feto, patologias ovarianas e uterinas, juntamente com a determinação do sexo fetal (Ribadu; Nakao, 1999; Matsui; Miyamoto, 2009).

A ultrassonografia na avaliação do CL tem sido realizada para prever o estágio do ciclo estral e seu estado funcional. No período do diestro, o CL apresenta uma ecotextura mais homogênea do que durante o metaestro e proestro (Torres *et al.*, 2022). Gomes *et al.* (2017), validaram o uso da ultrassonografia para avaliar a presença de um CL funcional e consideraram um método fácil e confiável para avaliação do CL em vacas.

A utilização de exames ultrassonográficos possibilita a avaliação contínua do tamanho (área), forma e consistência do corpo lúteo (CL), permitindo o monitoramento do seu desenvolvimento ao longo de sua vida útil (Siqueira *et al.*, 2009). No entanto, a ultrassonografia não conseguiu distinguir entre um CL em desenvolvimento e um em regressão (Siqueira *et al.*, 2009). Dessa forma, a avaliação funcional do CL é de difícil determinação devido as suas semelhanças morfológicas (Torres *et al.*, 2022). Portanto, para estabelecer o estado funcional do CL, é necessário realizar múltiplas análises de concentração de progesterona, associada a avaliação contínua e medição do CL no intervalo máximo de dois dias, devido a correlação existente entre a área do CL e concentração de P4 (Torres *et al.*, 2022).

Com o advento da ultrassonografia Doppler colorido tornou-se possível avaliar a intensidade do fluxo sanguíneo nos folículos ovarianos e no CL, através da visualização da movimentação dos glóbulos vermelhos dentro dos vasos sanguíneos, permitindo assim a avaliação em tempo real do aporte sanguíneo de folículos e CL em diferentes fases do ciclo estral, pois o a perfusão sanguínea está relacionada ao crescimento folicular, atresia e ovulação, desenvolvimento e manutenção do CL (Matsui; Miyamoto, 2009).

A ultrassonografia Doppler pode ser utilizada para avaliar estruturas e órgãos reprodutivos (Fontes; Oosthuizen, 2022). Esses parâmetros sanguíneos são estimados utilizando os princípios do efeito Doppler, que identifica alterações na frequência das ondas sonoras enviadas pelo transdutor e refletidas pelas hemácias em movimento, e sua constante mudança de posição em relação ao transdutor é observada (Fontes; Oosthuizen, 2022).

Quando as hemácias se movem em direção ao transdutor, a frequência das ondas ultrassônicas refletidas são maiores do que as ondas emitidas, resultando em um desvio (*shift*) positivo, já quando a frequência das ondas refletidas é menor que das ondas emitidas, ou seja quando as hemácias estão afastando do transdutor, ocorre um *shift* negativo (Ginther; Utt, 2004).

Este modo ultrassonográfico fornece imagens em tempo real que são de fácil interpretação para a perfusão sanguínea, ilustrando a vascularização do CL (Siqueira *et al.*, 2013; Pinaffi *et al.*, 2015). Os atributos morfológicos e a ecotextura foram associados à função do CL segundo Siqueira *et al.* (2009), apresentando alterações semelhantes ao longo do ciclo estral, sendo a heterogeneidade do tecido luteal, analisada por ultrassonografia, identificada como um indicador promissor do estado funcional do CL, uma vez que se correlaciona negativamente com as concentrações circulantes de P4. Para utilizar esses dados de forma eficaz, é necessário realizar uma análise comparativa que leve em conta variações ao longo do tempo, diferenças entre os animais e valores de referência (Pugliesi *et al.*, 2023). Após a avaliação visual, o fluxo sanguíneo do CL (CLBF) deve ser quantificada (Siqueira *et al.*, 2013).

Diversas abordagens foram propostas para a avaliação do CLBF, considerando a precisão, a magnitude das diferenças esperadas, a tomada de decisões em tempo real e a aplicabilidade em condições de campo (Siqueira *et al.*, 2019; Pugliesi *et al.*, 2023). O sinal Doppler no ultrassom pode ser exibido como gráficos espectrais ou imagens de fluxo colorido (Herzog; Bollwein, 2007). No modo espectral, ele mostra a velocidade do fluxo sanguíneo ao longo do tempo, útil para avaliar grandes vasos que suprem tecidos específicos, como a artéria uterina. No entanto, essa técnica requer imobilidade, o que pode ser inviável em animais grandes. Por isso, a maioria dos estudos sobre CLBF em bovinos usa a análise da área colorida na imagem de Doppler de fluxo colorido (Herzog; Bollwein, 2007).

A caracterização direta do CLBF pode ser feita por meio da análise subjetiva da extensão da área colorida nas imagens Doppler (Siqueira *et al.*, 2019). Esse método leva em conta todo o escaneamento do tecido e se baseia em uma reconstrução mental tridimensional do órgão, permitindo diagnósticos em tempo real e decisões rápidas (Siqueira *et al.*, 2013; Siqueira *et al.*, 2019). Embora a precisão dependa da experiência do avaliador e possa melhorar com o tempo, a concordância entre avaliadores com conhecimentos semelhantes é alta e há uma boa correlação com avaliações objetivas/quantitativas (Siqueira *et al.*, 2013). A área colorida ou o número de pixels coloridos em uma imagem podem ser quantificados objetivamente através do ultrassom utilizando paquímetros internos ou utilizando softwares

de análises de imagem (Herzog *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2019). Os resultados são apresentados como uma variável contínua, expressa em valores absolutos (ex., mm²) ou relativos (% do tecido). Índices que consideram o volume total do tecido em relação ao suprimento sanguíneo proporcionaram uma avaliação mais precisa do estado fisiológico do CL (Siqueira *et al.*, 2019).

De qualquer forma, a avaliação do fluxo sanguíneo está correlacionada positivamente com a angiogênese e o desenvolvimento do CL, tanto durante o seu desenvolvimento como na luteólise funcional e estrutural. O suprimento de sangue ao CL aumenta paralelamente ao seu crescimento, quando há um aumento agudo de fluxo sanguíneo no CL maduro antes da regressão luteal, fornecendo uma estimativa do estado fisiológico do CL (Siqueira *et al.*, 2019). Herzog *et al.* (2010) observaram um aumento do tamanho do CL durante a fase de crescimento, mantendo-se estável na fase estática, antes de diminuir na regressão luteal. O fluxo sanguíneo luteal também apresentou um aumento significativo, demonstrando ser um indicador confiável do *status* do CL. Com apenas 35% dos valores máximos, o fluxo sanguíneo previu níveis de progesterona superiores a 1,0 ng/mL, enquanto o tamanho do CL precisou ultrapassar 60% para indicar um CL funcional (Herzog *et al.*, 2010). Assim, o fluxo sanguíneo foi um reflexo mais preciso da função luteal, especialmente durante a regressão (Herzog *et al.*, 2010).

Sendo assim, ao determinar a perfusão sanguínea luteal, é possível estimar a função do CL em diferentes fases do ciclo estral, bem como no início da gestação e sua associação com o perfil de P4 circulante (Pugliesi *et al.*, 2023). A ultrassonografia Doppler colorida também tem sido utilizada para identificar a perda de vascularização do CL, um fator que tradicionalmente está associado à perda da função do CL. Essa avaliação do fluxo sanguíneo no CL foi um indicador mais precoce de luteólise fisiológica em bovinos do que a análise da morfologia do CL, da ecotextura ou dos testes laboratoriais para P4 (Siqueira *et al.*, 2019). Desta forma, a associação do modo B e Doppler colorido fornecem novas estratégias para avaliar o estado funcional das estruturas ovarianas e fornecem dados para o manejo reprodutivo em bovinos (Siqueira *et al.*, 2013). As alternativas atuais para avaliar a função do CL por meio de ultrassom Doppler colorido propiciam novas ferramentas que poderiam melhorar o desempenho reprodutivo e a lucratividade na pecuária leiteira e de corte (Pugliesi *et al.*, 2023).

2.6 Seleção de receptoras para transferência de embriões

O sucesso da TE depende de fatores relacionados ao embrião, à receptora, ou à interação entre eles (Thomson *et al.*, 2021), Vários aspectos do trato reprodutivo (como estruturas ovarianas, formato da cérvix, tamanho uterino, tônus e presença de fluido), condições de saúde, nutrição e sincronização do estro são considerados na seleção de receptoras para alcançar uma alta probabilidade de prenhez (Pugliesi *et al.*, 2019).

As tecnologias de embriões são técnicas avançadas utilizadas tanto na disseminação de genética de alto mérito em operações pecuárias quanto como um modelo de pesquisa valioso para investigar perdas embrionárias e fetais (Phillips; Jahnke, 2016). Fêmeas receptoras que recebem um embrião viável após indução da ovulação, mas que são diagnosticadas como não prenhes em qualquer momento até o parto, são consideradas como tendo sofrido perda gestacional (Phillips; Jahnke, 2016). A TE convencional é o processo de coleta de embriões de fêmeas doadoras após superovulação e a transferência para outras fêmeas receptoras, para que assim completem o período gestacional (Mebratu, 2020), essa técnica envolve a seleção e o manejo dos animais doadores e receptores, bem como a coleta e transferência dos embriões em uma janela curta de tempo após o cio (7 dias após o cio/ovulação) (Mebratu, 2020). Já na produção *in vitro* de embriões, o mesmo é fertilizado e cultivado em laboratório, e sua transferência se dá na receptora 7 dias após o cio/ ovulação (Mebratu, 2020).

A seleção da doadora deve ser fundamentada em três critérios principais: superioridade genética, capacidade reprodutiva e valor de mercado da progênie (Mebratu, 2020). Aspecto ainda subestimado para o sucesso de um programa TE é a seleção das receptoras. Estas devem ser saudáveis reprodutivamente, ter facilidade de parto, e produção de leite para a prole, além de ótimo instinto materno. Elas devem estar em um plano de nutrição adequado e também manter boa saúde conforme o programa do rebanho (Phillips; Jahnke, 2016). Portanto, o manejo ideal das receptoras de embriões bovinos é essencial para o sucesso de um programa de TMGE. (Thomson *et al.*, 2021).

Entre esses fatores, a presença de um CL de “boa qualidade” é o mais importante para determinar se uma receptora saudável deve ser selecionada para uso (Pugliesi *et al.*, 2019). Programas extensivos de TE geralmente tomam a simples presença de um CL palpável como o critério principal para determinar a elegibilidade de uma receptora para receber um embrião (Kanazawa *et al.*, 2016). A qualidade CL é tradicionalmente avaliada por palpação retal ou por ultrassonografia pela mensuração da área ou diâmetro do CL. Geralmente, um CL maior é

considerado de melhor qualidade do que um CL menor (Pugliesi *et al.*, 2019). Alkan *et al.* (2020) ao avaliar o diâmetro do CL no dia da TE, constatou efeitos positivos na taxa de prenhes após a TE em novilhas de corte. Assim como demonstrado por Choi *et al.* (2023), que, ao selecionar receptoras de embrião com base na mensuração do tamanho do CL, observou que a taxa de prenhez é maior em animais com CL superior a 1,5 cm.

Vários estudos têm utilizado a ultrassonografia Doppler para avaliar a atividade lútea através da visualização da perfusão sanguínea do CL no dia da TE, para melhorar a predição do sucesso gestacional (Dubuc *et al.*, 2020; Pugliesi *et al.*, 2023). Alguns estudos indicaram que fêmeas bovinas que apresentam maior perfusão sanguínea no CL no dia da TE tendem a ter concentrações séricas mais elevadas de P4 e alcançam maior sucesso reprodutivo em comparação com fêmeas que têm menor perfusão sanguínea no CL (Pugliesi *et al.*, 2023). Fisiologicamente, já foi demonstrado que é possível a identificação de padrões distintos de CLBF tão cedo quanto 16 dias após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e confirmar que a perda da função do CL ocorre devido à redução no fluxo sanguíneo, o que antecede a regressão física do CL (Siqueira *et al.*, 2019). Kanazawa *et al.* (2016), ao avaliar a área de fluxo sanguíneo das receptoras de embrião no dia 7 e as avaliações da área de fluxo sanguíneo pareadas no dia 14, demonstram que esses são dados preditores confiáveis de gestação em vacas. De acordo com Pinaffi *et al.* (2015), a classificação de vacas receptoras com base no CLBF como baixo ($\leq 40\%$) ou alto ($> 40\%$) no momento da inovulação (no dia 7) indicou uma taxa de prenhez maior nas vacas com CLBF alto em comparação com aquelas com CLBF baixo.

Contudo, também foi observado por Herzog *et al.* (2007) aumento quase idêntico nos níveis de progesterona, no tamanho do corpo lúteo e no fluxo sanguíneo lúteo. No entanto, foram observadas diferenças importantes na fase estática, onde o tamanho do corpo lúteo teve um aumento mais modesto, enquanto tanto o fluxo sanguíneo quanto as concentrações de P4 apresentaram um crescimento bastante semelhante. Assim, no D7 da TE, o CL ainda está em fase de crescimento, e seu fluxo sanguíneo não apresentou diferenças significativas em relação aos animais não gestantes, mas aumentou com o tempo nos animais gestantes. Por outro lado, Couto *et al.* (2023), ao investigarem a relação entre o diâmetro do CL e a perfusão vascular em vacas Nelore submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) no D7, não encontraram uma associação entre o fluxo sanguíneo do corpo lúteo e a probabilidade de sucesso na gestação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Investigar características morfológicas e funcionais do corpo lúteo de receptoras de embriões bovinos no dia da TE (D7) e, posteriormente, até o 6º mês de gestação.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a área, vascularização e função (P4 circulante) do CL no D7 em receptoras que eventualmente se tornarão gestantes ou não-gestantes;
- Determinar a dinâmica morfológica e vascular do CL desde o dia da TE (D7) ao segundo trimestre da gestação (D181);
- Determinar eficácia das diferentes características do CL no dia da TE (D7) para a seleção de receptoras com maiores chances de prenhez;
- Avaliar a ocorrência de perdas gestacionais após o primeiro diagnóstico de gestação (D33) até o final de segundo trimestre da gestação (6º mês).

4 HIPÓTESES

A área e percentual de vascularização do CL é maior no dia da TE em receptoras que eventualmente serão diagnosticadas como gestantes em comparação com aquelas que não se tornarão gestantes.

Em fêmeas gestantes, a área e vascularização do CL flutuam em função do tempo à medida em que a gestação avança.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82–83, p. 127–140, 2004.
- AGARWAL, S.; PRASAD, H. G., PRASAD S,K. I.; AHMAD, K.; AFROZA, F.; KHAN A. Relationship between luteal size and plasma progesterone concentration in pregnant and non-pregnant Indian crossbred dairy cows. **BioRxiv**, [S. l.], v. 7, n. 2 ,p. 1–9, 2023.
- ALKAN, H.; KARAŞAHIN, T.; DURSUN, Ş.; SATILMIŞ, F.; ERDEM, H.; GÜLER, M. Evaluation of the factors that affect the pregnancy rates during embryo transfer in beef heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 55, n. 4, p. 421–428, 2020.
- ARROWSMITH, S.; WRAY, S. Oxytocin: Its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium. **Journal of Neuroendocrinology**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 356–369, 2014.
- BARUSELLI, P, S.; FERREIRA, R. M.; COLLI, M. H. A.; ELLIFF, F. M.; SÁ FILHO, M. F.; VIEIRA, L. F, B. G. Timed artificial insemination: Current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 14, n. 3, p. 558–571, 2017.
- BAZER, F. W.; WANG, X.; JOHNSON, G.A.; WU, G. Select nutrients and their effects on conceptus development in mammals. **Animal Nutrition**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 85–95, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2015.07.005>.
- BAZER, F. W.; SEO, H.; WU, G. JOHNSON, G. A. Interferon tau: Influences on growth and development of the conceptus. **Theriogenology**, Stoneham, v. 150, p. 75–83, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.069>.
- BERG, D. K.; VAN LEEUWEN, J.; BEAUMONT, S.; BERG, M.; PFEFFER, P. L. Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. **Theriogenology**, Stoneham, v. 73, n. 2, p. 250–260, 15 jan. 2010. DOI:10.1016/j.theriogenology.2009.09.005.
- CHOI, W.; RO, Y.; CHOE, E; HONG, L.; LEE, W.; KIM, D. Evaluation of Corpus Luteum and Plasma Progesterone the Day before Embryo Transfer as an Index for Recipient Selection in Dairy Cows. **Veterinary Sciences**, [S. l.], v. 10, n. 4, 1 abr. 2023.
- CLIFF LAMB, G.; MERCANDANTE, V.; R. G.; OOSTHUIZEN, N.; FONTES, P. L.P. selection and managent of the embryo recipient herd. In: **Bovine Reproduction**. [S. l.]: John Wiley & Sons, 2021.p. 1061-1072.
- CRACKEN, J. A. M. C.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis : A Neuroendocrine-Mediated Event. **American Physiological Society**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 263–324, 1999.
- DAVIS, J. S.; LAVOIE, H. A. **Molecular regulation of progesterone production in the corpus luteum**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00015-7> 237

DIAZ, F. J.; WILTBANK, M. C. Acquisition of luteolytic capacity involves differential regulation by prostaglandin F₂ α of genes involved in progesterone biosynthesis in the porcine corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 28, n. 2, p. 172–189, 2005. DOI: doi:10.1016/j.domaniend.2004.08.002.

DUBUC, J.; HOULE, J.; ROUSSEAU, M.; ROY, J. P.; BUCZINSKI, S.L. 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**, Champaign, v. 103, n. 2, p. 2019–2023, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-17234>.

DUROCHER, J. Ultrasonography of the reproductive system of the cow: basic, principles, practical uses and economic aspects of this diagnostic tool in dairy production. In: WORD BUIATRICS CONGRESS, 2006, Nice, France. **Anais Eletrônicos** [...] Nice, France, 2006. Disponível em: <https://www.ivis.org>. Acesso em: 01 Nov. de 2024.

FONTES, P. L. P.; OOSTHUIZEN, N. Applied use of doppler ultrasonography in bovine reproduction. **Frontiers in Animal Science**, [S. l.], v. 3, n. July, p. 1–12, 2022.

GINTHER, O J; BERGFELT, D R; KULICK, L J; KOT, K. Pulsatility of systemic fsh and lh concentrations during follicular-wave development in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 50, p.507-519, 1998

GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: Principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 24, n. 12, p. 516–526, 2004.

GIORDANO, J. O.; GUENTHER, J. N.; LOPES, G.; FRICKE, P. M. 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**, Champaign, v. 95, n. 2, p. 683–697, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4609>>.

GÓMEZ-SECO, C.; ALEGRE, B.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; PRIETO, J. G.; GONZÁLEZ-MONTAÑA, J. R.; ALONSO, M. E.; DOMÍNGUEZ, J. C. Evolution of the corpus luteum volume determined ultrasonographically and its relation to the plasma progesterone concentration after artificial insemination in pregnant and non-pregnant dairy cows. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 183–188, 1 set. 2017.

GRAY, C. A.; TAYLOR, K. M.; RAMSEY, W. S.; HILL, J. R.; BAZER, F. W.; BARTOL, F. F.; SPENCER, T. E. Endometrial glands are required for pre implantation conceptus elongation and survival. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 6, p. 1608–1613, 2001.

HERZOG, K.; BROCKHAN-LÜDEMANN, M.; KASKE, M.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, Stoneham, v. 73, n. 5, p. 691–697, 2010.

IVELL, R. The physiology of ovarian oxytocin. **Reproductive Medicine Review**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 11-15, 1999.

JENKIN, G.; YOUNG, I. R. Mechanisms responsible for parturition; the use of experimental models. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82–83, p. 567–581, 2004.

KANAZAWA, T.; SEKI, M.; ISHIYAMA, K.; KUBO, T.; KANEDA, Y.; SAKAGUCHI, M.; IZAIKE, Y.; TAKAHASHI, T. Pregnancy prediction on the day of embryo transfer (Day 7) and Day 14 by measuring luteal blood flow in dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 86, n. 6, p. 1436–1444, 28 fev. 2016.

LAVOIE, H. A.; BENOIT, A. M.; GARMEY, J. C.; DAILEY, R. A.; WRIGHT, D. J.; VELDHUIS, J. D. Coordinate developmental expression of genes regulating sterol economy and cholesterol side-chain cleavage in the porcine ovary. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 57, n. 2, p. 402–407, 1997.

LEMLEY, C. O.; CAMACHO, L. E.; VONNAHME, K. A. Maternal Recognition and Physiology of Pregnancy. In: **Bovine Reproduction**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2014. p. 245–256, 2014.

LEUNG, P. C. K.; ADASHI, E. Y. The ovary. *IN*: SHRESTHA, K.; RODLER, D.; SINOWATZ, F.; MEIDAN, R. **Corpus Luteum Formation**. USA: Elsevier, 2019. cap.6, p. 255-267.

LONERGAN, P.; SÁNCHEZ, J. M. Symposium review: Progesterone effects on early embryo development in cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 103, n. 9, p. 8698–8707, 2020.

MADOZ, L. V.; RABAGLINO, M. B.; MIGLIORISI, A. L.; JAUREGUIBERRY, M.; PEREZ WALLACE, S.; LORENTI, N.; DOMÍNGUEZ, G.; GIULIODORI, M. J.; DE LA SOTA, R. L. Association between progesterone concentration and endometrial gene expression in dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 74, p. 106481, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106481>>.

MARTIN, I.; MEMBRIVE, C. M.B.; VETTORATO, L. F.; BINELLI, M.; OBA, E.; FERREIRA, J. C.P. Plasma PGFM and progesterone concentrations, luteolysis moment and estrous cycle length in Nelore cows submitted to uterine biopsies. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, n. 5, p. 1210–1216, 2015.

MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. **Veterinary Journal**, London, v. 181, n. 3, p. 232–240, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.027>>.

MEBRATU, B. Embryo Transfer in Cattle Production and Its Principle and Applications. **International Journal of Pharmacy & Biomedical Research**, Rajasthan, v. 7, n. 1, p. 40–54, 28 fev. 2020. Disponível em: <<http://www.ijpbr.net/vol7-iss1a4.html>>.

MEIDAN, R.; MILVAE, R. A.; WEISS, S.; LEVY, N.; FRIEDMAN, A. Intra ovarian regulation of luteolysis. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Oxford, v. 54, p. 217–228, 1996.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M. P.B.; WATANABE,

S.; HAYASHI, M.; YAMAMOTO, D.; MATSUI, M.; ACOSTA, T. J. Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 29, n. 2, p. 329–339, 2005.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K. Luteolysis in the cow : a novel concept of vasoactive molecules. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 6, n. 1, p. 47–59, 2009.

MONACO, C. F.; DAVIS, J. S. Mechanisms of angioregression of the corpus luteum. **Frontiers in Physiology**, v. 14, n.1, p. 1–14, 2023.

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

NOGUEIRA, E.; CARDOSO, G. S.; MARQUES JUNIOR, H. R.; DIAS, A. M.; ÍTAVO, L. C.V.; BORGES, J. C. Effect of breed and corpus luteum on pregnancy rate of bovine embryo recipients. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Bethesda, v. 41, n. 2001, p. 2129–2133, 2012.

NOGUEIRA, E.; MINGOTI, G. Z.; NICACIO, A.; SILVA, J. C. B.; FERNANDES, C.A.; RODRIGUES, W.B.; MARQUES JÚNIOR, H. R. Utilização da ultrassonografia na reprodução de fêmeas bovinas. In: **Ultrassonografia na reprodução e avaliação de carcaças em bovinos**. [S.l.] : Embrapa, 2021. p. 57, v. cap 2,

PATE, J. L.; HUGHES, C. H. K. Review: Luteal prostaglandins: mechanisms regulating luteal survival and demise in ruminants. **Animal**, [S. l.], v. 17, p. 100-739, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100739>>.

PEREIRA, M. H. C.; WILTBANK, M. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 3, p. 2237–2247, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9903>>.

PHILLIPS, P. E.; JAHNKE, M. M. Embryo Transfer (Techniques, Donors, and Recipients). **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 32, n. 2, p. 365- 385, 1 jul. 2016. .

PIERSON, R. A.; KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Basic principles and techniques for transrectal ultrasonography in cattle and horses. **Theriogenology**, Stoneham, v. 29, n. 1, p. 3–20, 1988.

PINAFFI, F.L.V.; SANTOS, E.S.; SILVA, M.G.; MATURANA FILHO, M.; MADUREIRA, E.H.; SILVA L.A. Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 5, p. 470–476, 2015.

MICHELE R PLEWES, M. R.; PRZYGRÓDZKA, E.; MONACO, C.F.; SNIDER, A. P.; KEANE, J. A.; BURNS, P. D.; WOOD, J. R.; CUPP, A. S.; DAVIS, J. S. Prostaglandin F2 α regulates mitochondrial dynamics and mitophagy in the bovine corpus luteum. **Life Science Alliance**, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 1–19, 2023.

PUGLIESI, G.; BEG, M. A.; CARVALHO, G. R.; GINTHER, O. J. Effect of dose of estradiol-17 β on prominence of an induced 13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α (PGFM) pulse and relationship of prominence to progesterone, LH, and luteal blood flow in heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 41, n. 2, p. 98–109, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2011.05.003>>.

PUGLIESI, GUILHERME.; MELO, G. D.; SILVA, J. B.; CARVALHÊDO, A. S.; LOPES, E.; SIQUEIRA FILHO, E.; SILVA, L. A.; BINELLI, M. Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 135, p. 73–79, 1 set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.006>.

PUGLIESI, G.; GUIMARÃES, A. S.; VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B. Review: Current status of corpus luteum assessment by Doppler ultrasonography to diagnose non-pregnancy and select embryo recipients in cattle. **Animal**, [s. l.], v.17, n. 1, 01 May 2023, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100752>.

RIBADU, A. Y.; NAKAO, T. Bovine reproductive ultrasonography: A review. **Journal of Reproduction and Development**, Tokio, v. 45, n. 1, p. 13–28, 1999.

ROTHENEDER, S.; GONZÁLEZ-GRAJALES, L. A.; BECK, H.; BOOTZ, F.; BOLLWEIN, H. Variability of bovine conceptus-related volumes in early pregnancy measured with transrectal 3-dimensional ultrasonography. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 105, n. 5, p. 4534–4546, 1 maio 2022. DOI: 10.3168/jds.2021-21006.

SILVA, A. .; TEIXEIRA, P. P. .; VICENTE, W. R. . Mecanismos fisiológicos e bioquímicos da luteólise: revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, São Paulo, v. 8, n. 15, p. 1-24, julho 2010.

SIQUEIRA, L. G.; ARASHIRO, E. K.; GHETTI, A. M.; SOUZA, E. D.; FERES, L. F.; PFEIFER, L. F.; FONSECA, J. F.; VIANA, J. H. Vascular and morphological features of the corpus luteum 12 to 20 days after timed artificial insemination in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 102, n. 6, p. 5612–5622, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-15853>>.

SIQUEIRA, L. G. B.; TORRES, C. A. A.; AMORIM, L. S.; SOUZA, E. D.; CAMARGO, L. S. A.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, Champaign, v. 115, n. 1–4, p. 18–28, 2009.

SIQUEIRA, L. G. B.; AREAS, V. S.; GHETTI, A. M.; FONSECA, J. F.; PALHAO, M. P.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M. Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, n. 10, p. 6461–6472, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6814>>.

SIRARD, M. A.; GRAND, F. X.; LABRECQUE, R.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P. Triennial Reproduction Symposium: The use of natural cycle's follicular dynamic to improve oocyte quality in dairy cows and heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 96, n.7, p. 2971–2976, 2018. DOI:10.1093/jas/sky050.

THOMSON, S. P.; HOLMES, R. J. ; LANDES, P. T. ; ALLWORTH, M. B. Assessment and selection of the recipient cows' corpus luteum at the time of embryo transfer, and its influence on conception rate. **Australian Veterinary Journal**, Australia, v. 99, n. 7, p. 288–292, 1 jul. 2021.

TORRES, L. M. E.; GONZÁLEZ, M. J. Ultrasonography and physiological description of essential events for reproductive management in dairy cattle. Review. **Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias**, México, v. 13, n. 2, p. 452–472, 2022.

WANG, J.; GUILLOMOT, M.; HUE, I. Cellular organization of the trophoblastic epithelium in elongating conceptuses of ruminants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 332 n.11, p. 986–997, nov. 2009. DOI:10.1016/j.crvi.2009.09.004.

WILTBANK, M. C.; MEDIAN, R.; OCHOA, J ; BAEZ, G. M.; GIORDANO, J. O.; FERREIRA, J. C.P. ; SARTORI, R. Maintenance or regression of the corpus luteum during multiple decisive periods of bovine pregnancy. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 13, n. 3, p. 217–233, 2016. DOI: 10.21451/1984-3143-AR865.

WILTBANK, M. C. et al. Review: Maintenance of the ruminant corpus luteum during pregnancy: interferon-tau and beyond. **Animal**, [*S. l.*], v. 17, p. 100827, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100827>>.

YAMADA, O.; ABE, M.; TAKEHANA, K.; IWASA, K.; HIRAGA, T.; HIRATSUKA, T. Microvascular Changes in the Bovine Corpus Luteum During Pregnancy. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Japão, v. 17, n. 11, p. 1460–1462, 1994.

YAMEI, L. multiple roles of hypoxia in bovine corpus luteum. **Journal of Reproduction and Development**, Tokio, v. 66, n. 4, p. 1–14, 2020.

CAPÍTULO 1: Características morfológicas e vasculares do corpo lúteo em receptoras de embriões bovinos

Resumo

Este estudo teve como objetivo demonstrar as características morfológicas e funcionais do corpo lúteo (CL) em bovinas submetidas à transferência de embriões (TE) e sua relação com o estabelecimento e manutenção da gestação. Foram utilizadas 113 vacas e novilhas Girolando, que receberam embriões oriundos da produção *in vitro*. As receptoras foram sincronizadas com um protocolo de estradiol e progesterona e, no dia 7 após a ovulação, um blastocisto expandido foi transferido. A concentração plasmática de progesterona foi mensurada no D7 e a área e vascularização do CL foram mensuradas do D7 ao D181. Os dados foram analisados com o software SAS (versão 9.4), verificando previamente a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Caso a normalidade não fosse alcançada, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Variáveis foram submetidos à ANOVA, com diferenças significativas analisadas pelo teste t de Student ou Tukey-Kramer. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$, e tendências estatísticas foram consideradas para $0,05 < p < 0,1$. A concentração de P4 no D7 não apresentou diferença significativa ($p=0,14$) entre vacas futuramente prenhes ($4,14 \pm 1,57$ ng/ml) ou vazias ($3,7 \pm 1,44$ ng/ml). Ao analisar a relação entre as variáveis medidas no D7 e a probabilidade de gestação, verificou-se uma diferença no escore de fluxo sanguíneo prenhas ($2,33 \pm 0,82$; escala 1 a 4) x vazias ($2,66 \pm 0,76$; $p=0,05$). A área do CL apresentou uma tendência de ser maior em receptoras prenhes em comparação com vazias ($3,25 \pm 0,85$ cm vs $3,18 \pm 1,09$ cm, respectivamente; $p=0,08$) enquanto o fluxo sanguíneo do CL (CLBF) não diferiu entre prenhes e vazias ($18,09 \pm 10,11\%$ vs $20,77 \pm 8,57\%$, respectivamente; $p=0,12$). As análises de medidas repetidas em função do tempo indicaram que alterações morfológicas e vasculares no CL ocorreram durante a gestação, com diferenças significativas na área do CL, no escore do fluxo sanguíneo e no CLBF ($p < 0,0001$). Em conclusão, alterações morfológicas e vasculares do CL no D7 não influenciaram a chance de estabelecimento da gestação. Flutuações foram observadas em características do CL durante os 6 primeiros meses de gestação em receptoras de embriões bovinos.

Palavras-chave: bovinos; corpo lúteo; receptoras de embriões; reprodução; ultrassonografia doppler.

Abstract

This study aimed to demonstrate the morphological and functional characteristics of the corpus luteum (CL) in cows subjected to embryo transfer (ET) and its relationship with the establishment and maintenance of pregnancy. A total of 113 Girolando cows and heifers were used, which received embryos from in vitro production. The recipients were synchronized with an estradiol and progesterone protocol, and on day 7 after ovulation, an expanded blastocyst was transferred. The plasma progesterone concentration was measured on D7, and the CL area and vascularization were measured from D7 to D181. The data were analyzed using SAS software (version 9.4), with the normality of the residuals checked using the Shapiro-Wilk test. If normality was not achieved, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used. Variables were submitted to ANOVA, with significant differences analyzed using the Student's t-test or Tukey-Kramer test. The significance level was set at $p \leq 0.05$, and statistical trends were considered for $0.05 < p < 0.1$. The P4 concentration on D7 did not show a significant difference ($p=0.14$) between cows that would later become pregnant (4.14 ± 1.57 ng/ml) or remain non-pregnant (3.7 ± 1.44 ng/ml). When analyzing the relationship between the variables measured on D7 and the probability of pregnancy, a difference was observed in the blood flow score between pregnant (2.33 ± 0.82 ; scale 1 to 4) and non-pregnant (2.66 ± 0.76 ; $p=0.05$) cows. The CL area showed a trend of being larger in pregnant recipients compared to non-pregnant ones (3.25 ± 0.85 cm vs 3.18 ± 1.09 cm, respectively; $p=0.08$), while the CL blood flow (CLBF) did not differ between pregnant and non-pregnant cows ($18.09 \pm 10.11\%$ vs $20.77 \pm 8.57\%$, respectively; $p=0.12$). Repeated measures analyses over time indicated that morphological and vascular changes in the CL occurred during pregnancy, with significant differences in CL area, blood flow score, and CLBF ($p < 0.0001$). In conclusion, morphological and vascular changes in the CL on D7 did not influence the chance of pregnancy establishment. Fluctuations were observed in CL characteristics during the first 6 months of pregnancy in embryo transfer recipients.

Keywords: cattle; corpus luteum; doppler ultrasonography; embryo recipients; reproduction

Introdução

A busca de descendentes de fêmeas bovinas geneticamente superiores vem sendo alcançado pelo uso das biotécnicas de reprodução para a multiplicação de animais de mérito genético superior, com destaque para tecnologias de produção de embriões, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Lima *et al.*, 2023). O Comitê de Recuperação de Dados da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) demonstrou aumento da produção de embriões bovinos ao longo dos últimos 20 anos, de 2003 a 2022. Desde 2012, o número de embriões obtidos por produção *in vitro* (PIV) tem crescido de forma consistente, contribuindo para um aumento acumulado de 76,0% no total de embriões produzidos nesse período (Viana, 2022).

O sucesso das tecnologias de embriões está ligado a fatores que envolvem a doadora, a qualidade do embrião e a receptora (Phillips; Jahnke, 2016). Após a colheita dos embriões transferíveis de uma vaca doadora superovulada ou a produção de embriões *in vitro*, é necessário realizar uma seleção cuidadosa das receptoras para otimizar as taxas de gestação (Thomson *et al.*, 2021). Isso requer atenção ao manejo, à nutrição e ao controle do ciclo estral, garantindo a presença de um corpo lúteo (CL) funcional que perdure por toda a gestação, sendo fundamental a presença de um CL de boa qualidade no dia da transferência de embriões (TE) para determinar a adequação da receptora como um dos principais fatores para se alcançar altas taxas de prenhez (Siqueira *et al.*, 2009; Pugliesi *et al.*, 2023).

O CL é uma glândula endócrina temporária que produz progesterona (P4) e desempenha um papel fundamental no preparo e na manutenção da prenhez em mamíferos domésticos (Pate; Hughes, 2023). Em bovinos, a duração da função do CL é principalmente regulada pelo hormônio luteolítico uterino prostaglandina F2 alfa (PGF2a), que influencia a duração do ciclo estral (Weems *et al.*, 2006; Siqueira *et al.*, 2009). A ultrassonografia tem sido amplamente utilizada em pesquisas sobre reprodução animal para investigar eventos fisiológicos básicos e alterações morfológicas em órgãos e tecidos (Ginther *et al.*, 2004). Utilizada como ferramenta para análise do CL, é possível avaliar o seu estado funcional por avaliações sequenciais, em tempo-real, do tamanho (área), forma e ecotextura do CL, propiciando o monitoramento do desenvolvimento ao longo de sua vida útil (Siqueira *et al.*, 2009). Por sua vez, a introdução da ultrassonografia modo Doppler colorido tornou viável avaliar a área e a intensidade do fluxo sanguíneo no CL, fornecendo imagens que mostram a vascularização do CL, tanto durante o seu desenvolvimento quanto na luteólise funcional e

morfológica, oferecendo assim uma estimativa com maior precisão do estado fisiológico desta estrutura (Pugliesi *et al.*, 2019). Este tipo de avaliação disponibilizou novas estratégias, fornecendo dados para o preparo no manejo reprodutivo das vacas receptoras de embrião (Siqueira *et al.*, 2019).

Sendo assim, este estudo objetivou investigar as características morfológicas, vasculares e funcionais do CL em receptoras submetidas a TE e sua relação com o estabelecimento da gestação, bem como a manutenção destas características até o final do segundo trimestre gestacional.

Metodologias

Animais e Manejo

Foi realizado um estudo retrospectivo utilizando dados (área e fluxo sanguíneo do CL) coletados de um único rebanho de gado de leite, localizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), no Campo Experimental José Henrique Bruschi, Coronel Pacheco – MG. Foram utilizados dados de 113 vacas e novilhas Girolando (1/2 a 7/8 HZ), secas ou em lactação, com no mínimo 45 dias em lactação, cíclicas, e com escore de condição corporal entre 2,5 a 3,5 (escala de 1 a 5, Edmonson *et al.*, 1989). As receptoras foram mantidas em um sistema semi-intensivo de produção, com alimentação à base de volumoso (silagem de milho) e pastagem de *Brachiaria sp*, acesso a água e sal mineral *ad libitum*. Os dados foram coletados no período de 22 de dezembro de 2022 a 14 de junho de 2023. O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da EMBRAPA Gado de Leite sob o número: 4161140421.

Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões (PIV) foi conduzida conforme os procedimentos padrões de um laboratório comercial (Apoyar Biotech, Alta Floresta, MT). Resumidamente, complexos cumulus-oócitos (COCs) foram obtidos de ovários de matadouro de fêmeas Nelore ou mestiças predominantemente Nelore, selecionados e submetidos a maturação *in vitro* por um período de 22 a 24 horas. Após a maturação, os COCs foram fecundados *in vitro* utilizando doses de sêmen sexado de macho de um único touro de fertilidade comprovada da raça Nelore. Após a fecundação *in vitro*, o cultivo de zigotos/embriões foi realizado em meio SOF suplementado com 3% de soro fetal bovino (SFB), em atmosfera umidificada com 5% de dióxido de carbono (CO₂) e 5,5% de oxigênio (O₂). Blastocistos grau 1 de qualidade

(IETS) foram coletados no 6º dia de cultivo e envasados em palhetas de 0,25 mL para posterior TE.

Sincronização de receptoras e transferência de embriões.

Vacas e novilhas receptoras foram sincronizadas para transferência de embriões em tempo fixo (TETF) utilizando um protocolo conforme a seguir: no dia -10, receberam uma injeção intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, Farmavet, Brasil) e a inserção de um dispositivo intravaginal contendo 1g de progesterona (Primer®, Tecnopec, Brasil). No dia -2, o dispositivo intravaginal foi removido e foram administrados 500 µg de cloprostenol sódico (Ciosin®, MSD, Brasil), 1 mg de cipionato de estradiol (SincroCP®, OuroFino, Brasil) e 300 UI de eCG (Novormon®, Zoetis, Brasil) por via intramuscular. O cio presumido ocorreu no D0 e a TE foi realizada após sete dias (D7).

No D7, todas as receptoras foram examinadas por ultrassonografia e as fêmeas elegíveis (com a presença de um CL >2 cm² de área) foram designadas para receber um blastocisto expandido de grau 1. Todos os embriões foram transferidos por apenas único técnico, por via transcervical e depositados no corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o CL. O diagnóstico de prenhez foi confirmado por ultrassonografia realizada 24±2 dias após a TE, considerando a presença de um embrião com batimento cardíaco indicou gestação em curso.

Coleta de dados / amostras

As avaliações do CL (área e fluxo sanguíneo) e o diagnóstico de prenhez foram realizados por ultrassonografia transretal, utilizando um aparelho de ultrassom Mindray Z-50 (Shenzhen, China) equipado com uma sonda linear retal ajustada para uma frequência de 7,5 MHz. A sonda linear foi inserida manualmente no reto da vaca e ambos os ovários foram escaneados para determinar a presença e localização do CL, que foi registrada para cada animal. Em seguida, foram capturados cliques de vídeo curtos nos modos B e modo Doppler (com duração de 7 segundos), que foram armazenados na memória interna do equipamento de ultrassom. Posteriormente, a área do corpo lúteo e a área da cavidade (se presente) foram calculadas em centímetro quadrado (cm²) utilizando os paquímetros internos do equipamento. Para determinar a área do tecido luteal, foi realizada a subtração da área da cavidade (se presente) da área total do corpo lúteo. As imagens geradas utilizando o modo Doppler possibilitou a avaliação subjetiva (escores de 1 a 5) e quantitativa do fluxo sanguíneo no CL.

O método subjetivo de pontuação de escore de 1 a 5 da área de fluxo sanguíneo do CL, onde o escore 1 correspondia à <10% da área colorida; o escore 2 à 11–30%; o escore 3 à 31–50%; o escore 4 à 51-75%; e o escore 5 à >75%. Para a mensuração quantitativa do fluxo sanguíneo, foi realizada a análise de cada vídeo ultrassonográfico, selecionando-se uma imagem representativa para contagem de pixels coloridos e totais, a fim de verificar a porcentagem de pixels coloridos na imagem em relação à área total do CL. Essa quantificação foi realizada pelo Software Corel Photo-paint®. Em cada vídeo ultrassonográfico, foi selecionado um único frame que demonstrasse o melhor perfil de vascularização do CL. Os resultados da contagem de pixels coloridos e totais foram obtidos por meio de histogramas confeccionados automaticamente pelo software após processamento individual de cada imagem, seguindo o padrão de processamento de imagem e contagem de pixels. Foi obtida a média da porcentagem de pixels coloridos por animal.

A coleta de amostras de sangue para dosagem de P4 foi realizada em todas as receptoras no dia da TE (D7). As concentrações plasmáticas de P4 foram determinadas utilizando kits comerciais de eletroquimioluminescência (Immulite PRG Progesterone, Siemens, Llanberis, UK) em um laboratório comercial de análises veterinárias (Évora, Brasília, DF, Brasil). A sensibilidade do kit foi de 0,2 ng/mL, com coeficientes de variação inter- e intra-ensaio de 5,8% e 4,6%, respectivamente.

Nas receptoras gestantes no DG33, as mensurações da área do CL por ultrassonografia em modo-B e a vascularização do CL por modo Doppler continuaram a ser realizadas com frequência semanal até o 112º dia de gestação e mensal no 5º e 6º, mês de gestação. Após o 6º mês os exames foram interrompidos, pois não foi possível o acesso aos ovários para as mensurações do CL.

Análise Estatística

As variáveis foram analisadas utilizando o programa *Statistical Analyses Systems* (SAS version 9.4; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Os mesmos foram previamente verificados quanto a normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro-Wilk. Aquelas que não respeitaram a normalidade foram transformados e/ou feita a retirada de outliers. Os dados que, mesmo após transformação, não respeitaram a normalidade dos resíduos foram analisados por estatística não paramétrica de ordem de Kruskal-Wallis (PROC NPAR1WAY). As variáveis normais ou transformadas foram submetidas ao teste de análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre médias, quando significantes, foram analisadas pelo teste T de Student (PROC TTEST). Os dados ao longo do tempo de gestação e as diferenças entre

médias foram analisadas pelo teste de Tukey-Kramer (PROC GLIMMIX). Os resultados são apresentados em forma de média e desvio padrão da média (média±EPM). Os gráficos do tipo *scatter plot* foram gerados por meio do comando PROC SGPLOT. A curva de sobrevivência foi realizada com base na manutenção da prenhes ao longo da gestação (PROC LIFETEST). Para todas as comparações foi utilizado o nível de significância estatística de 5% ($p \leq 0,05$) e o nível de 5 a 10% ($0,5 < p < 0,1$) foi considerado como tendência estatística.

RESULTADOS

Concentração de progesterona.

As concentrações médias de P4 no momento da TE dos embriões estão apresentadas na **Tabela 1**. Não houve diferença na concentração de P4 no momento da TE (D7) entre receptoras posteriormente diagnosticadas como prenhes ou vazias ($p=0,14$).

Tabela 1 Concentração de progesterona (P4) no D7 em receptoras posteriormente diagnosticadas prenhes ou vazias.

	Prenhes	N	Vazias	N	Valor de p
Concentração de P4 (ng/mL)	4,14 ±1,57	42	3,7 ±1,44	70	0,14

Avaliação das características do corpo lúteo no D7

As características do CL avaliadas no D7 e sua relação com o estabelecimento da gestação estão demonstradas na **Tabela 2**. Ao avaliar a relação das características do CL no D7 com a possibilidade de gestação nas receptoras selecionadas e submetidas à TE, foi observado menor escore de fluxo sanguíneo no CL em receptoras que não ficaram gestantes ($p=0,05$); uma tendência de maior área do CL em receptoras que ficaram prenhes ($p= 0,08$); e não houve diferença no CLBF entre receptoras que ficaram prenhes e vazias ($p=0,12$).

Tabela 2: Características do corpo lúteo, escore de vascularização e CLBF no D7, comparando-se receptoras posteriormente diagnosticadas prenhes ou vazias.

D7	Prenhes	Vazias	Média total	Valor de p
Área CL	3,25 ±0,85*	3,18 ±1,09	3,21 ±1,00	0,08
Escore	2,33 ±0,82 ^B	2,66 ±0,76 ^A	2,54 ±0,79	0,05
CLBF	18,09 ±10,11	20,77 ±8,57	19,77 ±9,22	0,12

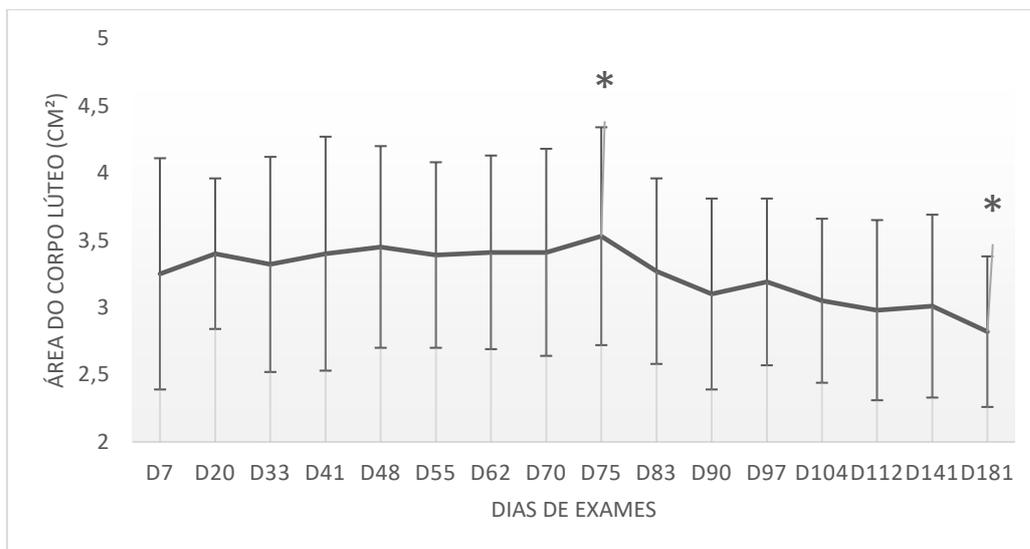
^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença estatística na linha pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

* Tendência estatística pelo teste T de Student ($0,05 < p < 0,1$).

Avaliação das características do corpo lúteo ao longo da gestação de receptoras de embrião.

Ao avaliar a dinâmica do CL, referente a sua área e fluxo sanguíneo, desde a transferência de embrião (D7) dos animais prenhes até o segundo terço da gestação (D181). Os resultados encontrados se encontram na **Figura 1 e 2**. A área e fluxo sanguíneo do CL durante a gestação variaram em função do tempo. Os maiores valores para área do CL foram observados no D48 e D75 e a menor área ocorreu no D181. Em termos absolutos, os valores médios de área do CL aumentaram do D7 ao D75, seguido de posterior decréscimo até o D181. A variação de área do CL em função do tempo de gestação está representada na **Figura 1**.

Figura 1 Área em Cm² do CL de receptoras prenhas durante o D7 ao D181



A avaliação do fluxo sanguíneo por escore visual (escala 1 a 5) demonstrou um aumento crescente do D7 (menor escore observado) aos D55 e D62, quando foram atingidos os maiores valores. A avaliação quantitativa de CLBF com auxílio de um software de análise de imagens indicou maior percentual de vascularização no D70 e menor valor no D7. O padrão de variação do CLBF, seja pela avaliação subjetiva (escore) ou objetiva (% pixels coloridos), foi de rápida ascensão da vascularização do CL entre o D7 e o D70, seguida de uma fase de plateau e posterior decréscimo discreto e retorno a valores similares aos observados no D33. Observa-se a variação do desvio padrão das médias, em um comportamento heterogêneo, com maiores variações no início da gestação. A dinâmica vascular do CL durante a gestação está representada nas **Figuras 2** (avaliação por escore visual) e **Figura 3** (avaliação objetiva por mensuração de pixels coloridos).

Figura 2 Escore do fluxo sanguíneo do CL do D7 ao D181 da gestação em receptoras de embriões.

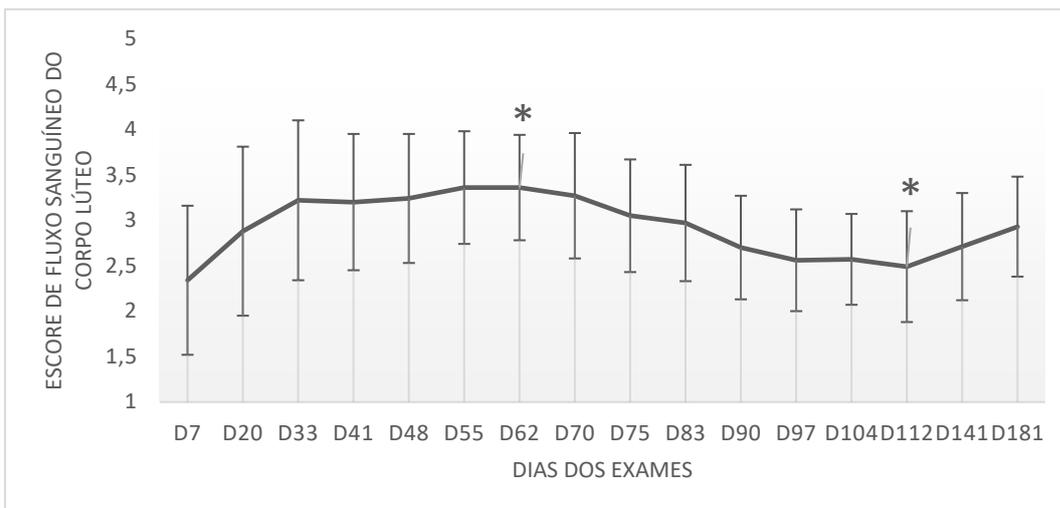
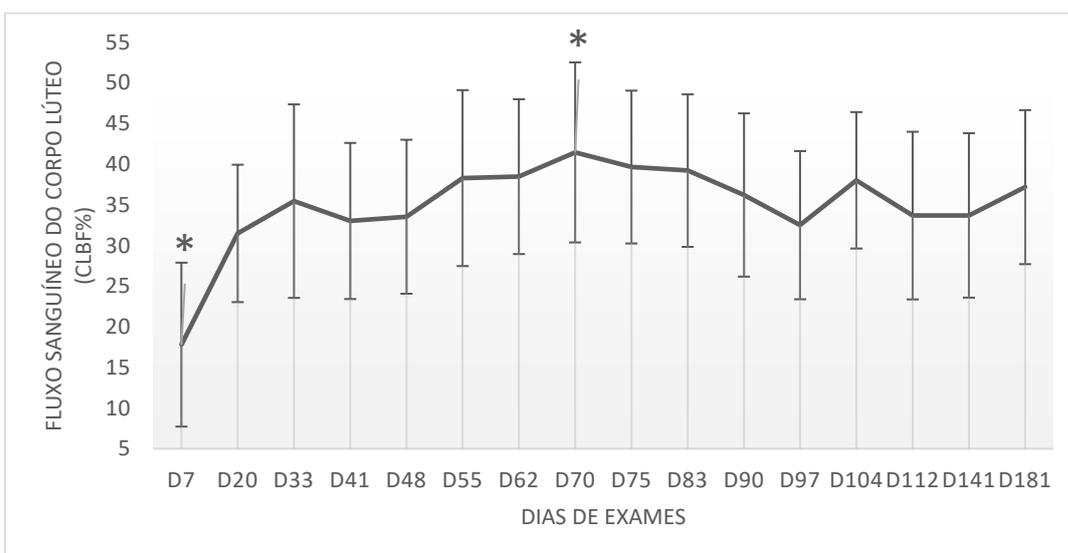


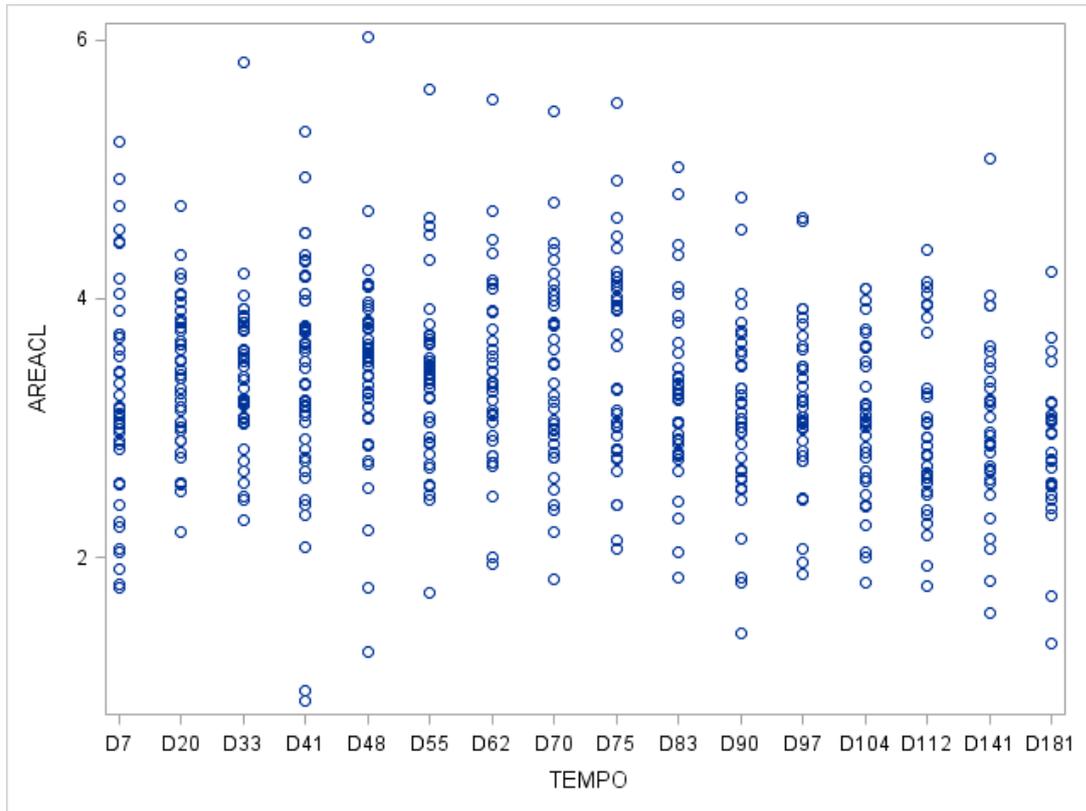
Figura 3 Fluxo sanguíneo do CL (CLBF) do D7 ao D181 de gestação em receptoras de embriões.



Conforme demonstrado nas figuras 1, 2 e 3 a área do CL, o escore e CLBF apresentaram variações temporais ao longo da gestação. Ressalta-se também a variação das médias em cada dia de exame, evidenciando a heterogeneidade destas variáveis entre indivíduos.

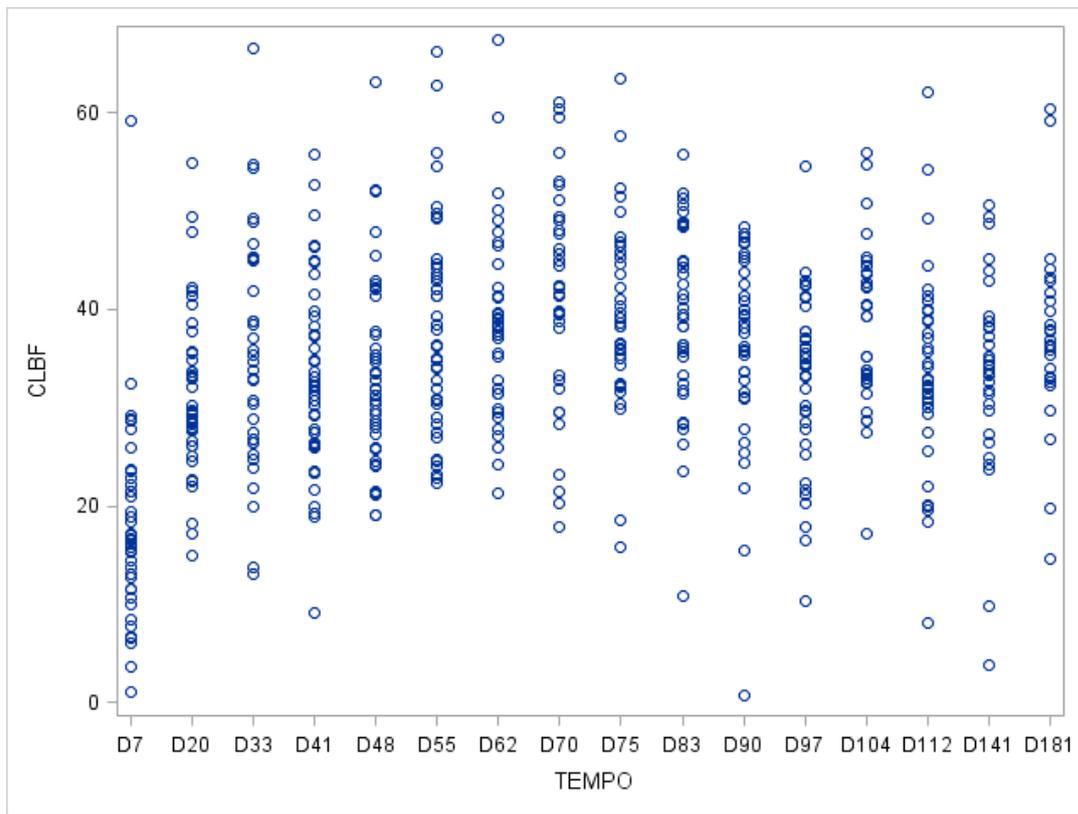
Para melhor visualização da heterogeneidade das variáveis avaliadas, foram criados gráficos do tipo *scatter plot*, onde a distribuição individual da área do CL é demonstrada na **figura 4**, e do fluxo sanguíneo (CLBF) na **figura 5**. Conforme observado na figura 4, a área do CL durante a gestação em receptoras se manteve entre 2 a 4 cm², porém em algumas receptoras teve valor mínimo <2 cm² e, em outras, valores máximos próximos de 6 cm², sem aparentes prejuízos à gestação em andamento.

Figura 4 Gráfico tipo *scatter plot* da área do CL em função do tempo de gestação.



O mesmo ocorreu com o CLBF, uma vez que as receptoras apresentaram CLBF crescente a partir do D7 (10 a 20% de CLBF), com pico de 40 a 60% (QUANDO?) e posterior decréscimo para valores próximos de 38 a 40% (QUANDO?). Porém, nota-se que ao analisar individualmente as receptoras, existem momentos em que o mínimo se encontrou abaixo de 20% e o máximo acima de 60%.

Figura 5 Gráfico do tipo *scatter plot* do CLBF em função do tempo de gestação.



Discussão

Os achados deste estudo indicam que a seleção de receptoras potencialmente mais aptas a se tornarem gestantes utilizando-se características morfológicas e vasculares do CL no dia da TE (D7) não foram eficazes em prever a chance de gestação, visto que não foram observadas diferenças na área, CLBF, e P4 plasmática entre fêmeas que eventualmente se tornaram gestantes ou não. Foi observada ainda uma grande variação entre valores mínimos e máximos, provavelmente contribuindo para a falta de diferenças significativas.

Esses resultados corroboram estudos anteriores que falharam em identificar características específicas do CL que poderiam ser utilizadas como critérios de inclusão/exclusão de receptoras, indicando que a presença de um CL evidente é suficiente para tornar uma receptora apta (Siqueira et al., 2009). Há, contudo, estudos que demonstraram que receptoras com maior CLBF no D7 tem mais chances de se tornarem gestantes (Lamb *et al.*, 2021), o que não foi confirmado no presente estudo. De qualquer maneira, é imprescindível para a seleção de receptoras que as mesmas tenham a presença do CL, como

critério principal para determinar a escolha para receber um embrião em programas de TE (Kanazawa *et al.*, 2016). A área e percentual de vascularização do CL não foram maiores no dia da TE em receptoras que eventualmente foram diagnosticadas como gestantes em comparação com aquelas que não se tornaram gestantes.

Já nas receptoras gestantes, foi possível demonstrar um aumento do CLBF entre o D7 e o primeiro DG (D33) atingindo valor máximo entre o segundo e terceiro mês de gestação, que seguiu uma fase de *plateau* e uma discreta redução no 6º mês da prenhez. Segundo Herzog *et al.* (2011), o CLBF é um indicador confiável de níveis de P4 superiores a 1,0 ng/mL quando atingiu apenas 35% dos valores máximos. Em contraste, o tamanho do CL precisou ultrapassar 60% dos valores máximos para prever de forma consistente a funcionalidade do CL. Portanto, o CLBF parece ser um reflexo mais preciso da função lútea. Esses resultados pioneiros demonstram um comportamento dinâmico da vascularização do CL durante a gestação e, de certa forma, também na área do CL, que foi crescente até o valor máximo no D70, seguida de *plateau* e discreta redução até o 6º mês. Dessa forma, confirmamos que a manutenção do CL, embora sujeita a flutuações na área e vascularização, é essencial para que a gestação transcorra normalmente e chegue a termo como demonstrado em estudos anteriores (Siqueira *et al.*, 2009; Thomson *et al.*, 2021; Choi *et al.*, 2023).

A P4 secretada pelo CL tem papel essencial nos eventos reprodutivos que garantem o estabelecimento e a manutenção da gestação, influenciando o ambiente uterino, inibindo a divisão mitótica do endométrio, indução da diferenciação do estroma, estímulo de secreções glandulares uterinas de nutrientes e fatores de crescimento, esses essenciais para o desenvolvimento inicial do concepto (Niswender *et al.*, 2000). Nesse estudo, a concentração P4 no D7 não apresentou diferença entre os animais que se tornaram gestantes ou não. Essa mensuração realizada no dia da TE corrobora estudos anteriores que não detectaram diferenças na P4 plasmática no D7 entre receptoras que se tornaram eventualmente gestantes ou não (Pugliesi *et al.*, 2019; Thomson *et al.*, 2021; Choi *et al.*, 2023). Há evidências de que a perfusão sanguínea lútea é um indicador mais confiável da atividade lútea e da probabilidade de emprenhar do que a concentração de P4 (Pugliesi *et al.*, 2019). Estudo recente observou que receptoras apresentando níveis plasmáticos de P4 entre 2,0 e 4,0 ng/ml tinham maiores chances de estabelecimento da gestação (Choi *et al.*, 2023), além da presença de um CL maior representar níveis mais altos de P4 no dia da TE, o que esteve associado a um melhor desempenho reprodutivo em vacas (Choi *et al.*, 2023).

Em bovinos, níveis elevados de P4 no período imediato após a concepção estão relacionados ao desenvolvimento avançado do concepto (Forde *et al.*, 2011). Por outro lado, baixos níveis de P4 são apontados como um fator causal das reduzidas taxas de prenhes observadas em vacas leiteiras (Forde *et al.*, 2011). Starbuck *et al.* (2001) ao suplementar vacas com P4 identificadas com níveis baixos de P4 (1–2 ng/mL) no dia 5 pós inseminação, demonstram ser eficaz em aumentar a taxa de prenhez. No entanto, os mesmos autores observaram que a suplementação de P4 em vacas com níveis inferiores a 1 ng/mL ou entre 2–3 ng/mL não teve impacto na taxa e prenhez. Altas concentrações no início da formação lútea podem até mesmo influenciar de forma negativa (Parr *et al.*, 2014).

Quando as concentrações de P4 apresentam-se reduzidas, há uma associada queda na fertilidade e seus níveis baixos após a ovulação têm sido associados à diminuição no crescimento e alongamento do concepto, uma menor produção de IFN- τ e redução nas taxas de prenhez em bovinos (Lonergan; Sánchez, 2020). Já concentrações elevadas de P4 circulante logo após a concepção estão associadas ao avanço no alongamento do concepto, aumento na produção de IFN- τ e, em alguns casos, taxas de prenhez mais elevadas (Lonergan; Sánchez, 2020), comprovando que são necessários níveis adequados de P4 circulante, mas talvez uma vez atingidos, valores médios maiores não significam necessariamente maior chance de prenhez em receptoras (Starbuck *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2023). Dessa forma, o presente estudo demonstra que ambas receptoras posteriormente prenhes ou vazias apresentavam concentrações de P4 similares no D7, não influenciando a taxa de gestação, uma vez que os níveis de P4 encontravam-se adequados (nem baixo ou nem muito alto) de forma a influenciar nos resultados.

A qualidade do CL é geralmente avaliada utilizando palpação retal ou ultrassonografia para medir sua área (Phillips e Jahnke, 2016) e os exames ultrassonográficos tornaram possível a avaliação contínua do tamanho (área), forma e consistência do CL, permitindo sua mensuração e monitoramento do seu desenvolvimento ao longo de sua vida útil (Siqueira *et al.*, 2009; Pugliesi *et al.*, 2019; Siqueira *et al.*, 2019). Tradicionalmente, um CL maior é considerado de melhor qualidade do que um CL menor (Pugliesi *et al.*, 2019). No entanto, escolher receptoras apenas com base na área do CL pode resultar em taxa de embriões transferidos reduzida para um útero não receptivo, devido à presença de um CL menos funcional (Pinaffi *et al.*, 2015). Isso ocorre porque a secreção de P4 não pode ser adequadamente avaliada por essas metodologias (Pugliesi *et al.*, 2019), corroborando os

resultados encontrados no presente estudo, uma vez que ambos os CL no D7 de fêmeas futuramente prenhas ou vazias apresentaram tamanhos similares.

Robinson *et al.* (2006) demonstrou que o tamanho do CL está altamente correlacionado com as concentrações plasmáticas de progesterona no dia 5 pós-estro. Contudo, essa correlação diminui no dia 8 e é completamente perdida no dia 16. Esses achados sugerem que a taxa de desenvolvimento luteal exerce maior influência sobre a função do que o tamanho do CL em si. Da mesma forma, Robinson *et al.* (2008) demonstraram que o início do crescimento do tecido lúteo ocorre aproximadamente 1–2 dias após o cio; portanto, o D7 pode ser tarde demais para detectar diferenças. Os resultados do presente estudo corroboram achados anteriores, uma vez que ambos os CL no D7 de fêmeas futuramente prenhas ou vazias apresentaram tamanhos similares.

Ao avaliar as características morfológicas do CL no ciclo estral, Siqueira *et al.* (2009) demonstraram que a área do tecido luteal aumentou até um valor máximo 10 dias após o estro, seguido por uma fase de plateau e, posteriormente, uma queda a partir de 14 dias após o estro nos animais não gestantes. Foi observado que a área do tecido luteal foi altamente correlacionada com as concentrações plasmáticas de P4. Outros autores observaram aumento do CL concomitante a um aumento correspondente nos níveis plasmáticos de P4 até o dia 8 do ciclo e, posteriormente, durante a fase de regressão lútea, o volume lúteo diminuiu mais lentamente em relação à concentração de progesterona. (Gómez-seco *et al.*, 2017).

Díaz *et al.* (2013) avaliaram a associação entre o diâmetro do CL e a taxa de prenhez das receptoras após a TE de embriões produzidos *in vitro*. Foi observado que maiores taxas de prenhez foram alcançadas quando os diâmetros do CL eram maiores do que 24 mm (39,7%) e 22 mm (33,7%), enquanto menores taxas de prenhez foram associadas a um CL de 14 mm (24,2%), sugerindo que a variável diâmetro do CL é importante e deve ser considerado para o sucesso de um programa de TE em bovinos.

Em rebanhos de corte a área do CL tem relação com a taxa de prenhez. Os tipos de CL (pequeno, médio e grande) resultaram em taxas de prenhez de 31,7%, 40,4% e 45,3%, respectivamente. Além disso, observou-se que à medida em que o diâmetro do CL aumentava, as taxas de prenhez também aumentavam (Alkan *et al.*, 2020). Já Pugliesi *et al.*, (2019), ao avaliar categorias de tamanho do CL, demonstraram que o mesmo não apresentou efeito significativo sobre a taxa de prenhez, independentemente de o CL ser pequeno (49%; 76 de 155), médio (59,7%; 83 de 139) ou grande (50,7%; 75 de 148). Porém, ao avaliar a área do

CL como uma variável contínua, um efeito quadrático indicou uma relação positiva com a taxa de prenhez.

Foi demonstrado nesse trabalho que o fluxo sanguíneo do CL (CLBF) foi similar no D7 em receptoras que futuramente se tornaram prenhes ou vazias. Porém, naquelas fêmeas que se tornaram gestantes, o CLBF apresentou aumento significativo entre o D7 e o D70. Essas alterações morfológicas e funcionais do CL ocorrem pois o período lúteo é dividido em três fases: fase lútea de crescimento, fase lútea estática e fase lútea de regressão (Couto *et al.*, 2023). Durante a fase de crescimento luteal, Herzog *et al.* (2007) observaram um padrão de aumento quase idêntico para a concentração de P4, o tamanho do CL e o fluxo sanguíneo luteal. No entanto, diferenças significativas foram notadas na fase estática, onde houve apenas um aumento moderado no tamanho do CL, enquanto o fluxo sanguíneo e as concentrações de P4 aumentaram de forma bastante similar. Assim, considerando que no dia da TE (D7) o CL encontra-se nessa fase de crescimento, foi possível notar que o seu fluxo sanguíneo não diferiu dos animais vazios, porém aumentou com o tempo nos animais gestantes. De forma similar, Couto *et al.* (2023) avaliaram as relações entre o diâmetro do CL e a perfusão vascular no D7 em vacas Nelore submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e não observaram uma relação entre o fluxo sanguíneo do CL com a probabilidade de estabelecimento da gestação.

É possível que as disparidades entre animais prenhes e não-prenhes se tornem evidentes especialmente durante as fases estáticas ou de regressão do CL (Herzog; Bollwein, 2007; Choi *et al.*, 2023). Isso ocorre pois, devido à sua natureza transitória, o CL necessita se desenvolver rapidamente tanto estrutural quanto funcionalmente para permitir o estabelecimento de uma gestação ou, em caso de falha na concepção, possibilitar o início de um novo ciclo estral. Essas características específicas do CL são reguladas principalmente por uma intensa angiogênese (Acosta; Miyamoto, 2004) que fornece suporte para que ocorra o desenvolvimento adequado das células luteais durante a luteogênese (fase inicial luteal) e para o fornecimento de nutrientes e precursores de esteróides que sustentam a secreção de P4 na corrente sanguínea durante a fase luteal média (Acosta; Miyamoto, 2004). Esse padrão de aumento, estabilização e redução da perfusão sanguínea durante o desenvolvimento do CL, em fêmeas prenhes, ocorre possivelmente devido à presença do conceito e à secreção de fatores luteotrópicos (Herzog *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2019).

Velho *et al.* (2022) analisaram a correlação entre os métodos de avaliação morfológica e funcional do CL no quinto dia (D5) após a IATF e observaram o impacto na

perfusão sanguínea luteal, no diâmetro do CL e na concentração sérica de P4. Foi constatado que os escores de perfusão sanguínea 2 e 3 estavam associados a CLs maiores em relação aos escores 0 e 1. Além disso, os escores 1, 2 e 3 demonstraram boa precisão na estimativa de novilhas com níveis mais elevados de P4 (precisão=0,79; 0,72 e 0,61; respectivamente). Os autores concluíram que a avaliação da perfusão sanguínea utilizando escores de 1 a 3 no D5 pós-IATF permite identificar novilhas com níveis mais altos de P4 e maior diâmetro do CL, sendo que um maior diâmetro do CL esteve positivamente associado à taxa de prenhez. No presente estudo, não foi possível identificar qualquer associação entre CLBF e chance de prenhez.

Nas receptoras gestantes, ao avaliar a área do CL, bem como seu fluxo sanguíneo durante a gestação foi demonstrado um comportamento crescente da área do CL até 60 dias de gestação (D75). E posterior decréscimo até o 7º mês de gestação aproximadamente (menor valor em D181). O fluxo sanguíneo também apresentou menor valor no início da gestação, com posterior aumento de irrigação sanguínea seguida do início de um decréscimo desse aporte sanguíneo após 3 meses de gestação aproximadamente. Esses fatos ocorrem provavelmente devido a atividade secretora do CL em vacas gestantes estar significativamente reduzida (Shemesh, 1990). Essa diminuição na secreção se deve tanto à queda no número de células lúteas viáveis quanto à redução na atividade secretora e na capacidade de resposta dessas células a agentes tróficos, uma vez que a principal fonte extra-ovariana de P4 nesse estágio da gestação parece ser a placenta, a qual produz P4 ao longo da gestação (Shemesh, 1990). Essa capacidade dos cotilédones fetais de secretar progesterona é evidente tanto no início quanto no final da gestação. No entanto, uma produção significativa de progesterona pelas carúnculas maternas ocorre apenas após 100 a 120 dias de prenhes (Shemesh, 1990; Kindahl, 2007). A maior produção de P4 pela placenta ocorre entre os 5 e 7 meses de gestação, embora não se saiba exatamente por que essa produção ocorre, já que a placenta não assume permanentemente essa função. Nos últimos meses de gestação, a produção placentária de P4 diminui e a continuidade da gestação passa a depender exclusivamente da produção de P4 pelo CL (Kindahl, 2007).

Neste contexto, observamos no presente estudo que a área e o fluxo sanguíneo do CL se alteram durante a gestação, esses parâmetros diminuem ao longo da gestação. Em bovinos, por mais que o CL permaneça presente ao longo de toda a gestação, o número de células luteais sofre uma redução significativa no terço final da gestação (Shemesh et al., 1988). Embora a placenta bovina apresente atividade esteroidogênica nos primeiros estágios

da gestação, ela só consegue substituir totalmente o CL na produção de P4 em quantidade suficiente para manter a gestação nos estágios finais, a partir de cerca de 180 a 200 dias de gestação (Nguyen et al., 2012). Há ainda uma queda acentuada da função secretora de P4 pelo CL bovino durante a gestação a partir dos dias 190 e 275 (Shemesh, 1990). Essa diminuição na secreção é atribuída à redução tanto no número de células luteais, quanto na atividade secretora e responsividade destas células (Shemesh, 1990). Resultados avaliados por ultrassonografia são escassos na literatura, porém estão relacionados com avaliações histológicas do CL. Os resultados do presente estudo corroboram os achados de Xavier *et al.* (2011) que, ao avaliar vacas Nelore gestantes, observou que o CL apresenta uma maior proporção de células endoteliais até os 90 dias de gestação. A partir do segundo terço gestacional (D181), ocorre uma redução no número de células esteroideogênicas e, no terço final, observa-se uma menor proporção de citoplasma e núcleo nas células lúteas esteroideogênicas, além de um aumento no número de células em degeneração e no percentual de tecido conjuntivo, fibroblastos e matriz extracelular. Da mesma forma, Vargas *et al.* (2015) observaram uma redução no volume do corpo lúteo ocupado por citoplasma e núcleo de células lúteas do primeiro para o segundo terço de gestação, concomitantemente a um aumento na proporção volumétrica de tecido conjuntivo. Esse resultado é compatível com o processo natural de regressão lútea na gestação, no qual se observa declínio na proporção de células esteroideogênicas e substituição dessas por tecido conjuntivo.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que as características morfológicas e vasculares do corpo lúteo no dia 7 após o estro não influenciam diretamente o estabelecimento da gestação em fêmeas submetidas a transferência de embriões. No entanto, alterações significativas na área do CL, escore de fluxo sanguíneo e CLBF foram observadas ao longo da gestação. Assim, apesar das características no D7 não impactarem o início da gestação, as mudanças contínuas no CL ao longo do período gestacional evidenciam seu papel crucial no sucesso reprodutivo em bovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: Ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82–83, p. 127–140, 2004.
- CHOI, W. RO, Y.; CHOE, E.; HONG, L.; LEE, W.; KIM, D. Evaluation of Corpus Luteum and Plasma Progesterone the Day before Embryo Transfer as an Index for Recipient Selection in Dairy Cows. **Veterinary Sciences**, [*S. l.*], v. 10, n. 4, 1 abr. 2023.
- LAMB, C. G. G.; MERCADANTE, V. R.G.; OOSTHUIZEN, N.; FONTES, P. L.P. selection and managent of the embryo recipient herd. In: **Bovine Reproduction**. [*S. l.*], John Wiley & Sons, 2021.p. 1061-1072.
- COUTO, S. R.B.; GUERSON, Y. B.; MORAIS, R.C.L.; GRILLO, G. F.; ANDRADE, J.P.N.; JACOB, J. C.F.; BARBERO, R.P. MELLO, M.R. Relationships between follicle and corpus luteum size and vascularization with ovulation, progesterone production, and pregnancy in Nellore beef cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 52, 2023.
- FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; DUFFY, G. B.; DUFFY, P.; MEHTA, J. P.; Ó'GAORA, P.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. CROWE, M. A. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: Effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 84, n. 2, p. 266–278, 2011.
- GÓMEZ-SECO, C.; ALEGRE, B.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; PRIETO, J. G.; GONZÁLEZ-MONTAÑA, J. R.; ALONSO, M. E. DOMÍNGUEZ, J. C. Evolution of the corpus luteum volume determined ultrasonographically and its relation to the plasma progesterone concentration after artificial insemination in pregnant and non-pregnant dairy cows. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 183–188, 1 set. 2017.
- GONELLA-DIAZA, A.; HOLGUIN, G.; MONTAÑA, D.; VALBUENA, D. Corpus luteum diameter and embryo developmental stage are associated with pregnancy rate: data analysis from 17, 521 embryo transfer s from a commercial in vitro bovine embryo production program. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 10, n. 2, p. 106–111, 2013.
- HANZEN, C. H.; PIETERSE, M.; SZENCI, O.; DROST, M. Relative Accuracy of the Identification of Ovarian Structures in the Cow by Ultrasonography and Palpation Per Rectum. **Veterinary Journal**, London, v. 159, n. 2, p. 161–170, 2000.
- HERZOG, K.; BROCKHAN-LÜDEMANN, M.; KASKE, M.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H.. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, Stoneham, v. 73, n. 5, p. 691–697, 2010.
- HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 42, n. SUPPL. 2, p. 51–58, 2007.

KANAZAWA, T.; SEKI, M.; ISHIYAMA, K.; KUBO, T.; KANEDA, Y.; SAKAGUCHI, M.; IZAIKE, Y.; TAKAHASHI, T. Pregnancy prediction on the day of embryo transfer (Day 7) and Day 14 by measuring luteal blood flow in dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 86, n. 6, p. 1436–1444, 28 fev. 2016.

KINDAHL, H. Placenta functions with special emphasis on endocrine changes - A comparative overview. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, 49, n. SUPPL. 1, p. 1–5, 2007.

LIMA, W. M. F.; MONIQUE MAZZAROLLO ROVANI, M.T.; MONDADORI, R. G.; VIEIRA, A. D.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B. G. Desafios e perspectivas na produção comercial de embriões in vivo e in vitro de raças taurinas e sintéticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, São Paulo, v. 47, n. 2, p. 234–237, 2023.

LONERGAN, P.; SÁNCHEZ, J. M. Symposium review: Progesterone effects on early embryo development in cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 103, n. 9, p. 8698–8707, 2020.

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

PARR, M. H.; CROWE, M. A.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C.O.; FAIR, T.; DISKIN, M. G. The concurrent and carry over effects of long term changes in energy intake before insemination on pregnancy per artificial insemination in heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 157, p. 87–94, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.03.019>>.

PATE, J. L.; HUGHES, C. H. K. Review: Luteal prostaglandins: mechanisms regulating luteal survival and demise in ruminants. **Animal**, [S. l.], v. 17, p. 100739, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100739>>.

PHILLIPS, P. E.; JAHNKE, M. M. Embryo Transfer (Techniques, Donors, and Recipients) **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 32, n. 2, p. 365-385.

PINAFFI, F. L.V.; SANTOS, É. S.; DA SILVA, M. G.; FILHO, M. M.A.; SILVA, L. A. Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 5, p. 470–476, 2015.

PUGLIESI, G.; DALMASO, G.M.; SILVA, J. B.; CARVALHÊDO, A. S.; LOPES, E.; DE SIQUEIRA FILHO, E.; SILVA, L. A.; BINELLI, M.. Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 135, p. 73–79, 1 set. 2019.

PUGLIESI, G.; GUIMARÃES, S., A.; VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B. Review: Current status of corpus luteum assessment by Doppler ultrasonography to diagnose non-pregnancy and select embryo recipients in cattle. **Animal**, [S. l.], v. 17, maio 2023.

ROBINSON, R. S.; HAMMOND, A. J.; WATHES, D. C.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E. Endocrine and cellular characteristics of corpora lutea from cows with a delayed post-ovulatory progesterone rise. **Domestic Animal Endocrinology**, [*S. l.*], v. 31, n. 2, p. 154–172, 2006.

ROBINSON, R. S.; HAMMOND, A. J.; WATHES, D. C.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E. Corpus Luteum-Endometrium-Embryo Interactions in the Dairy Cow: Underlying Mechanisms and Clinical Relevance. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, n. SUPPL.2, p. 104–112, 2008.

SHEMESH, M. Production and regulation of progesterone in bovine corpus luteum and placenta in mid and late gestation: A personal review. **Reproduction, Fertility and Development**, Australia, v. 2, n. 2, p. 129–135, 1990.

SIQUEIRA, L. G.; ARASHIRO, E. K.; GHETTI, A. M.; SOUZA, E.D.; FERES, L. F.; PFEIFER, L.F.; FONSECA, J. F.; VIANA, J. H. Vascular and morphological features of the corpus luteum 12 to 20 days after timed artificial insemination in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 102, n. 6, p. 5612–5622, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-15853>>.

SIQUEIRA, L. G. B.; TORRES, C. A.A.; AMORIM, L. S.; SOUZA, E. D.; CAMARGO, L. S. A.; FERNANDES, C. A.C.; VIANA, J. H. M. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 115, n. 1–4, p. 18–28, 2009.

STARBUCK, G R; DARWASH, A O; MANN, G E; LAMMING, G E L. The detection and treatment of post insemination progesterone insufficiency in dairy cows. **BSAP Occasional Publication**, Cambridge, v. 26, n. 2, p. 447–450, 2001.

THOMSON, S. P.; HOLMES, R. J.; LANDES, P. T.; ALLWORTH, M. B. Assessment and selection of the recipient cows' corpus luteum at the time of embryo transfer, and its influence on conception rate. **Australian Veterinary Journal**, Australia, v. 99, n. 7, p. 288–292, 1 jul. 2021.

VARGAS, L.R.; XAVIER, P.R.; REZENDE, C.A.; NEVES, M.M.; MARQUES JÚNIOR, A.P. Morfologia e grânulos citoplasmáticos do corpo lúteo de vacas aneloradas (*Bos taurus indicus*) gestantes e não gestantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, n. 2, p. 411–416, 2015.

VIANA, J. H. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Tecnology Newsletter**, Champaign, v. 40, n. 4, p. 22–40, 2022.

XAVIER, P. R.; JÚNIOR, A. P.M.; LEÃO, R. A.C.; SILVA, P. V.D. O. Proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo de vacas Nelore nos terços inicial, médio e final da gestação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 2, p. 322–325, 2011.