



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUIS BORTOLASSI JUNIOR

**INFLUÊNCIA DO TAMANHO DO CORPO LÚTEO E DA
PERFUSÃO SANGUÍNEA LUTEAL SOBRE A TAXA DE
CONCEPÇÃO E A OCORRÊNCIA DA PERDA
GESTACIONAL EM PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÃO EM TEMPO-FIXO EM BOVINOS**

Londrina

2023

LUIS BORTOLASSI JUNIOR

**INFLUÊNCIA DO TAMANHO DO CORPO LÚTEO E DA
PERFUSÃO SANGUÍNEA LUTEAL SOBRE A TAXA DE
CONCEPÇÃO E A OCORRÊNCIA DA PERDA
GESTACIONAL EM PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÃO EM TEMPO-FIXO EM BOVINOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Clínicas
Veterinárias da Universidade Estadual de
Londrina como requisito para a obtenção
do título de Mestre em Clínicas
Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Morotti

Londrina
2023

|

**Catalogação na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.
Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B739i	Bortolassi Junior, Luis Influência do tamanho do corpo lúteo e da perfusão sanguínea luteal sobre a taxa de concepção e a ocorrência da perda gestacional em programa de transferência de embrião em tempo-fixo em bovinos / Luis Bortolassi Junior. – Londrina, 2023. 45 f. : il.
	Orientador: Fábio Morotti. Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) – Universidade Estadual de Londrina, 2023. Inclui bibliografia.
	1. Corpo lúteo – Bovinos – Teses. 2. Perfusão sanguínea luteal – Bovinos – Teses. 3. Perda gestacional – Bovinos – Teses. 4. Programa de transferência de embriões – Bovinos – Teses. 5. Medicina veterinária – Teses. 2. Clínicas veterinárias – Teses. I. Morotti, Fábio. II. Universidade Estadual de Londrina. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.
	CDU 619:636.2

Elaborada pela Bibliotecária Eliane Maria da Silva Jovanovich – CRB 9/1250

LUIS BORTOLASSI JUNIOR

**INFLUÊNCIA DO TAMANHO DO CORPO LÚTEO E DA
PERFUSÃO SANGUÍNEA LUTEAL SOBRE A TAXA DE
CONCEPÇÃO E A OCORRÊNCIA DA PERDA
GESTACIONAL EM PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÃO EM TEMPO-FIXO EM BOVINOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Clínicas
Veterinárias da Universidade Estadual de
Londrina como requisito para a obtenção
do título de Mestre em Clínicas
Veterinárias.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Morotti

Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Dr. Fábio Lucas Zito de Moraes

Médico Veterinário Autônomo

Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Queiroz

Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Londrina, 18 de outubro de 2023.

Dedico este trabalho aos meus pais, Luís e Maria, pelo carinho, todos os ensinamentos e conselhos que me proporcionaram, à minha esposa, Ana Paula que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos sem me deixar esmorecer e me ajudar a melhorar a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder tantas graças e poder alcançar meus objetivos.

Agradeço a Professora Dr^a. Katia e ao Professor Dr. Fábio Morotti, por todos os ensinamentos, orientação e por toda a ajuda nessa jornada.

Ao Dr. Gustavo, por fornecer os dados de sua pesquisa.

Aos meus pais, Luís e Maria que sempre me apoiam em minhas escolhas, intervindo quando necessário, pensando no meu próprio bem. Sem eles nada disso seria possível.

A minha esposa, Ana Paula, por sempre estar ao meu lado em momentos difíceis. A minha filha Luísa por me tornar a pessoa mais completa e feliz em ter você na minha vida.

As minhas irmãs Angélica Patrícia e Alessandra, pelo companheirismo, amizade, puxões de orelhas e paciência desde sempre.

Aos professores membros da banca de qualificação (Prof. Dr. Fábio Morotti, Profa. Dra. Katia Cristina Silva Santos e Profa. Dra. Priscila Fajardo Valente Pereira) agradeço por fazerem parte deste momento da minha vida profissional, e todo conhecimento e tempo para contribuir com esse trabalho.

Aos docentes do programa de Mestrado Profissional, pelos ensinamentos e conselhos dados.

MUITO OBRIGADO!

BORTOLASSI, Luís Jr. **Influência do tamanho do corpo lúteo e da perfusão sanguínea luteal sobre a taxa de concepção e a ocorrência da perda gestacional em programa de transferência de embrião em tempo-fixo em bovinos**. 2023. 47f. Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da perfusão sanguínea e da área de corpo lúteo (CL) sobre as taxas de concepção e a ocorrência de perda gestacional de receptoras em programas de TETF em larga escala. Vacas multíparas Brangus ($n = 1.700$) com 45 dias pós-parto e escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 e 4,0 ($3,0 \pm 0,3$) foram utilizadas nesse estudo. Em um dia aleatório do ciclo estral (dia -10) as fêmeas receberam um protocolo para TETF com benzoato de estradiol (2 mg, i.m.) e um implante intravaginal P4 (1g). No dia 7, 1.465 receptoras tinham pelo menos um CL e foram avaliadas usando o ultrassom modo B para área (cm^2) do CL e color Doppler para escore de perfusão sanguínea (I/baixa vascularização < 40%; II/média vascularização > 45% e < 50%; e alta vascularização > 55%). Imediatamente depois da avaliação do CL, cada receptora recebeu um embrião *in vitro* (estágio blastocisto), produzido por um laboratório comercial, ipsilateral ao CL avaliado. O diagnóstico de gestação foi feito com 30 dias e repetido 60 dias depois para avaliar a perda gestacional (30 para 90 dias). Um único técnico fez as avaliações ultrassonográficas e as transferências de embriões. Para análise de dados, além de grupos de perfusão sanguínea, CL foram classificadas respectivamente de acordo com a área em pequeno < 3 cm^2 ($2,63 \pm 0,01$), médio > 3 e < 4 cm^2 ($3,44 \pm 0,01$) e grande > 4 cm^2 ($4,77 \pm 0,03$). Os dados foram analisados por modelo de regressão logística ($P < 0,05$). No geral, a taxa de concepção do estudo foi de 44,23% (648/1.465), sendo influenciada pelo escore de perfusão sanguínea [$P = 0,03$; alta 48,4%^a (134/277), médio 44,6%^a (427/958) e baixo 37,8%^b (87/230)], mas não pela classificação da área de CL [$P=0,37$; grande 41,8% (225/538), médio 45,2% (276/610) e pequeno 46,4% (147/317)]. Não houve interação entre escore de perfusão sanguínea luteal e tamanho/área do CL ($P=0,81$), e o ECC não afetou os resultados desse estudo ($P=0,51$). Para ocorrência de perda gestacional até 90 dias, não houve efeito na classificação da área do CL ($P=0,77$), mas o escore de fluxo sanguíneo apresentou efeito [$P=0,03$; alto 3,6%^b (5/139), médio 9,3%^a (44/471) e baixo 10,3%^a (10/97)]. A taxa de concepção e a ocorrência de perda gestacional em programas de TETF em bovinos de corte está relacionado com a perfusão sanguínea luteal, mas não com o tamanho do CL.

Palavras-chave: receptoras; fluxo sanguíneo; área do corpo lúteo.

BORTOLASSI, Luis Jr. **Conception rate and pregnancy loss in fixed-time cattle embryo transfer programs are related to the luteal blood perfusion but not to the corpus luteum size.** 2023. 47f. Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of luteal blood perfusion and corpus luteum (CL) area on the conception rate and occurrence of pregnancy loss of recipients in a large-scale fixed-time embryo transfer (FTET) program. Multiparous Brangus cows ($n = 1,700$) at 45 days postpartum and body condition scores (BCS) between 2.5 and 4.0 (3.0 ± 0.3) were used in this study. On a random day of the estrous cycle (day -10), the females received progesterone and estradiol based on the FTET protocol. On day 7, 1,465 recipients had at least one CL and were evaluated using B-mode ultrasound for the CL area (cm^2) and color Doppler for the luteal blood perfusion score (I/low-vascularization area < 40% of the CL; II/medium-vascularization > 45% to < 50%; and III/high-vascularization > 50%). Immediately after CL evaluation, each recipient received a single fresh embryo (blastocyst stage) ipsilateral to the CL, *in vitro* produced from a commercial laboratory. Pregnancy diagnosis was performed at 30 days and repeated 60 days later to evaluate pregnancy loss (30 to 90 days). Ultrasound evaluation and embryo transfer were performed by a single technician. For data analysis, in addition to luteal blood perfusion groups, recipients were retrospectively ranked according to CL area into small (< 3 cm^2 ; 2.63 ± 0.01), medium (> 3 to < 4 cm^2 ; 3.44 ± 0.01), and large (> 4 cm^2 ; 4.77 ± 0.03). Data were analyzed using a logistic regression model ($P < 0.05$). The overall conception rate was 44.2% (648/1,465), influenced by the luteal blood perfusion score [$P = 0.03$; high 48.4%^a (134/277), medium 44.6%^a (427/958), and low 37.8%^b (87/230)] but not by CL area ranking [$P = 0.37$; large 41.8% (225/538), medium 45.2% (276/610), and small 46.4% (147/317)]. There was no interaction between the luteal blood perfusion score and CL area ranking ($P = 0.81$), and the BCS did not affect the results of this study ($P = 0.51$). In terms of pregnancy loss up to 90 days, there was no effect on the CL area ranking ($P = 0.77$), but the flow score showed an effect [$P = 0.03$; high 3.6%^b (5/139), medium 9.3%^a (44/471), and low 10.3%^a (10/97)]. The conception rate and occurrence of pregnancy loss in the FTET program in beef cattle are related to luteal blood perfusion but not CL size.

Keywords: recipients; luteal blood; CL area; conception rate; pregnancy loss.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número de embriões bovinos produzidos (<i>in vivo</i> [IVD], <i>in vitro</i> [IVP] e total) registrados no período 2002-2021	13
Figura 2 – Número de embriões bovinos produzidos ou coletados no período de 2002-2021, por continente. (A) Embriões produzidos <i>in vitro</i> [IVP]; produzidos <i>in vivo</i> [IVD].....	13
Figura 3 – Ilustração esquemática do protocolo tradicional de transferência de embrião em tempo fixo (TETF) de três manejos para a sincronização das receptoras	17
Figura 4 – Imagens ultrassonográficas de ovário bovino apresentando corpo lúteo. Os painéis 0 a 4 indicam, respectivamente, os escores 0, 1, 2, 3 e 4 para perfusão sanguínea periférica e central no tecido luteal dos animais avaliados (limite de detecção: 0,05m/seg). Painéis 0 e 1: vacas não gestantes; Painéis 2, 3 e 4: vacas gestantes	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE	Benzoato de Estradiol
BEN	Balanço Energético Negativo
CE	Cipionato de Estradiol
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
CL	Corpo Lúteo
D	Dia
DG	Diagnóstico Gestacional
ECC	Escore de Condição Corporal
eCG	<i>Equine Chorionic Gonadotropin</i> - Gonadotrofina Coriônica Equina
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> - Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	<i>Gonadotrophin-releasing Hormone</i> - Hormônio Liberador de Gonadotrofina
IA	Inseminação Artificial
IEP	Intervalo Entre Partos
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> - Hormônio Luteinizante
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
OPU	Ovum pick-up
P4	Progesterona
PGF2α	Prostaglandina F2 Alfa
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de Embriões
SOB	Superovulação
TE	Transferência de Embrião
TETF	Transferência de Embrião em Tempo Fixo
US	Ultrassonografia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	CENÁRIO ATUAL DA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES	12
2.2	SUPEROVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (SOV/TE).....	14
2.2.1	Transferência de Embriões em Tempo Fixo - TETF	15
2.3	AVALIAÇÃO DE RECEPTORAS DE EMBRIÃO POR ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER	16
2.3.1	Corpo lúteo	18
2.3.2	Avaliação do grau de vascularização do Corpo Lúteo	19
2.4	FATORES QUE INTERFEREM NA PERDA GESTACIONAL DE RECEPTORAS	22
	REFERÊNCIAS	23
3	HIPÓTESE.....	28
4	OBJETIVOS	29
4.1	OBJETIVO GERAL	29
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	30
1.	INTRODUCTION	31
2.	MATERIALS AND METHODS	32
2.1.	LOCATION, ANIMALS AND MANAGEMENT	32
2.2.	FIXED-TIME EMBRYO TRANSFER (FTET) PROTOCOL	33
2.3.	ULTRASOUND EVALUATIONS	33
2.4.	STATISTICAL ANALYSES.....	34
3.	RESULTS.....	35
4.	DISCUSSION	38
5.	CONCLUSIONS	40
	REFERENCES	41
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45

1 INTRODUÇÃO

Com o intuito de manter um lugar de destaque como maior exportador mundial de carne bovina e estimular o desenvolvimento da produção leiteira, várias biotécnicas reprodutivas estão sendo empregadas no setor pecuário brasileiro. Dentre essas, a inseminação artificial (IA) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem contribuído de maneira significativa para o aumento da produção de animais em menor espaço de tempo, além de promover ganho zootécnico e agregar valor ao rebanho nacional (ARAUJO *et al.*, 2013).

A partir da década de 80 a multiplicação genética populacional dos bovinos, pelo uso de biotécnicas da reprodução, deixou de ser exclusividade dos machos, pela IA e passou a agregar a genética da fêmea pelo uso de biotécnicas envolvendo embriões. O patrimônio genético das matrizes passou a ser amplamente multiplicado com a produção de embriões, primeiramente *in vivo*, e mais recentemente, em maior escala, embriões produzidos *in vitro*, possibilitando melhorias na eficiência reprodutiva das fêmeas bovinas contribuindo para uma maior progênie durante a vida produtiva da matriz (COSTA FILHO *et al.*, 2013).

A produção nacional e mundial de embriões bovinos vem crescendo ano após ano com destaque para o Brasil, principalmente, quando se consideram os resultados obtidos pela técnica de produção *in vitro* de embriões (PIV). Em 2009 os números aproximaram-se de 300 mil embriões (VIANA *et al.*, 2010). No entanto, apenas os valores brutos não revelam a eficiência da técnica, pois é necessário analisar a taxa de recuperação de óocitos na OPU, a eficiência da PIV e a taxa de prenhez (COSTA FILHO *et al.*, 2013).

Os cuidados com as receptoras, visando aumento da taxa de prenhez, devem ser iniciados bem antes da transferência de embriões (TE) propriamente dita. O manejo das doadoras e receptoras, bem como sua saúde reprodutiva são pontos importantes para os resultados finais (FERNANDES, 1999).

Em programas de TE um dos fatores mais importantes para se determinar o uso de uma receptora é a presença e qualidade do corpo lúteo (CL). Essa qualidade é tradicionalmente avaliada para seleção de receptoras através de palpação transretal ou por ultrassonografia modo B para determinar a presença e o tamanho do CL. Por outro lado, estas estratégias garantem a transferência de embrião, mas muitas vezes o útero não está totalmente receptivo devido à presença de um CL pouco ou não-

funcional, já que a funcionalidade luteal não pode ser acessada por essas avaliações corriqueiras (PUGLIESE *et al.*, 2017).

Recentemente, foram desenvolvidos estudos que possibilitaram novas estratégias de uso da ultrassonografia color Doppler em programas reprodutivos comerciais para bovinos de corte e que visam melhorar a eficiência reprodutiva. Trata-se de uma técnica não-invasiva e em tempo real para estimar a funcionalidade do CL, seja para seleção de receptoras em programas de TETF ou para o diagnóstico precoce de gestação nos programas de IATF (PUGLIESE *et al.*, 2017).

A identificação das características de vascularização e do tamanho do CL durante sua perda de função, tem sido utilizado como base para a criação de critérios para identificar um CL funcional ou afuncional (PUGLIESE *et al.*, 2013). Observou-se que receptoras de embrião com alta taxa de vascularização luteal apresentaram maior taxa de concepção do que as com baixa vascularização (PUGLIESE *et al.*, 2017). Assim, a avaliação da vascularização do tecido luteal pode representar de forma mais precisa a função do CL visto a alta rede vascular presente nesta glândula transitória (BOLLWEIN *et al.*, 2012). Além disso, a avaliação da perfusão sanguínea no CL pode ser bastante útil pois maiores concentrações de P4 no início do diestro estão relacionadas com maior desenvolvimento do concepto (MANN; LAMMING, 2001) e associadas a maior probabilidade de gestação. Como observado nos folículos, a maior vascularização luteal também indicou uma maior chance de prenhez (PUGLIESE *et al.*, 2016).

Com o alto custo operacional e de manutenção de um grande número de receptoras para um programa de TETF se faz necessário o advento de tecnologias para melhor aproveitamento do rebanho. Com isso, nesse estudo observou que o sucesso gestacional em proporção à área do CL ainda é controverso, e que a relação da perfusão sanguínea do CL com aumento do número de prenhezes ainda necessita de mais estudos. Além disso, não há trabalhos que avaliaram a ocorrência de perda gestacional em receptoras segundo o escore de perfusão sanguíneo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

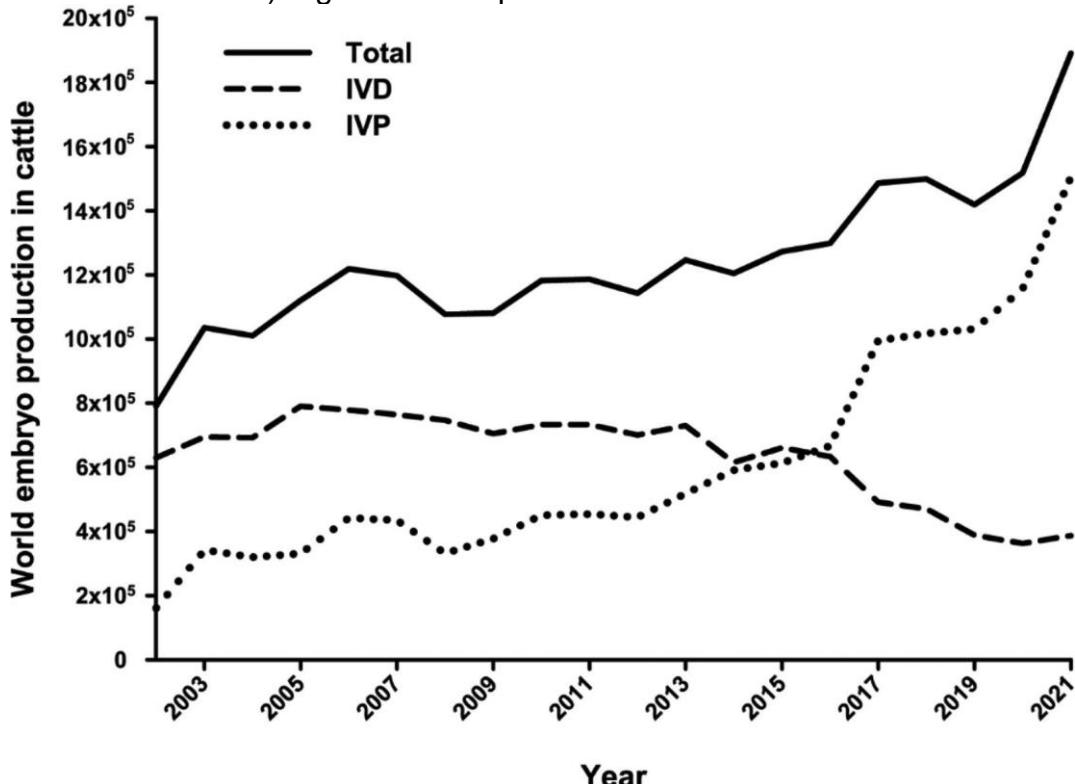
2.1 CENÁRIO ATUAL DA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES

A PIVE é uma biotecnologia reprodutiva que se iniciou para fins de produção comercial de bovinos no ano de 1998 pelo projeto de inovação tecnológica financiado pelas empresas Beabisa Agricultura LTDA e Gentec Tecnologia de Embriões (GALLI, 2003), sendo o Brasil líder mundial de PIVE, tornando-se assim referência na técnica (SOUZA *et al.*, 2018). Houve aumento de 300% na produção de embriões por fecundação *in vitro* (FIV) em um período de 15 anos, atingindo total de 666.215 em 2016, ano que a técnica superou pela primeira vez o volume de embriões produzidos *in vivo* (IETS, 2017).

A série histórica de produção de embriões bovinos nos últimos 20 anos (2002 até 2021) é mostrado na Figura 1. A tendência atual de crescimento no total mundial já foi detectada em 2020. Em 2021, porém, observamos um aumento (31,5%) no número de embriões *in vitro* em relação a 2020, o maior desde 2017. Na verdade, em números absolutos, essa foi a maior mudança em relação ao ano anterior (+363.596 embriões) em nossa série histórica. Devido à pequena mudança no número de embriões *in vivo* (6,8%), o aumento dos números *in vitro* refletiu diretamente nos números totais. A taxa de crescimento atual de embriões *in vitro* é semelhante à observada no início dos anos 2000, a que se seguiu um período de crescimento mais lento dos números entre 2007 e 2015. Por outro lado, apesar do aumento observado em 2021, o número de embriões *in vivo* diminuiu consistentemente nos últimos anos após atingir seu pico (789.972) em 2005 (VIANA, 2022).

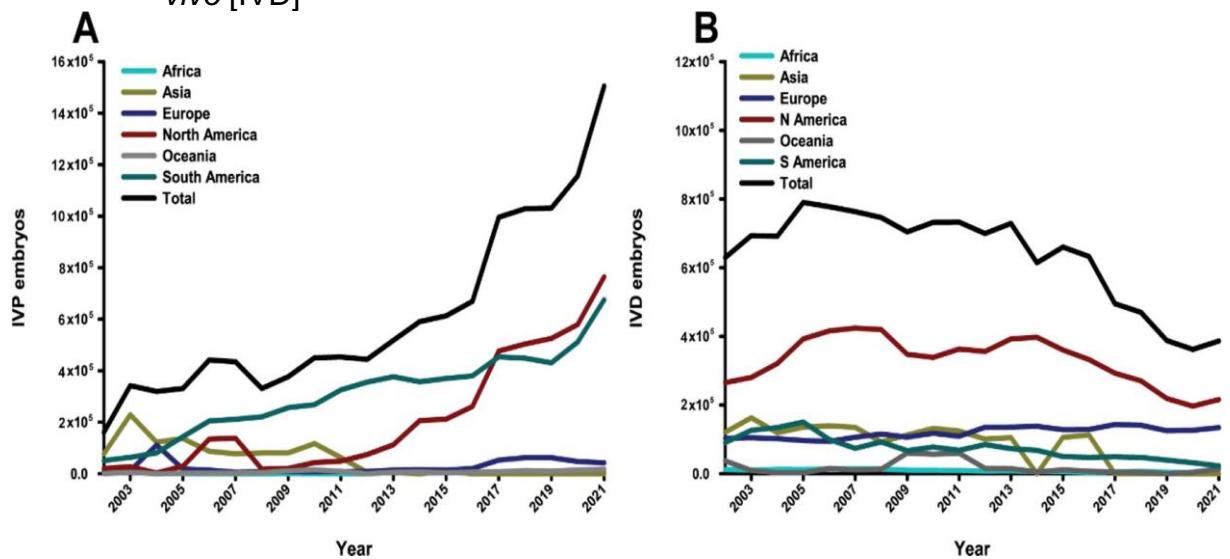
Os números de embriões *in vitro* e *in vivo* registrados por região são mostrados nas Figuras 2A e 2B, respectivamente. A tendência que favorece os embriões *in vitro* nas Américas do Norte e do Sul, responsáveis pela maior produção (32,1% e 35,3%, respectivamente) e contrastam com a Europa, onde os números diminuíram (-10,7%). Por outro lado, a recuperação no número de embriões *in vivo* foi observada no Norte (9,7%), mas não na América do Sul (-27,7%), onde a maior parte (96,8%) é embrião *in vitro* (VIANA, 2022).

Figura 1 – Número de embriões bovinos produzidos (*in vivo* [IVD], *in vitro* [IVP] e total) registrados no período 2002-2021



Fonte: Viana (2022).

Figura 2 – Número de embriões bovinos produzidos ou coletados no período de 2002-2021, por continente. (A) Embriões produzidos *in vitro* [IVP]; produzidos *in vivo* [IVD]



Fonte: Viana (2022).

Os avanços obtidos nas biotécnicas reprodutivas ao longo dos anos permitiram maior participação da fêmea bovina no processo de melhoramento genético do rebanho, visto que o número de descendentes deixados por uma única

fêmea ao longo da sua vida reprodutiva aumentou significativamente com o aperfeiçoamento das técnicas de transferência e produção *in vitro* de embrião (GONÇALVES *et al.*, 2007).

2.2 SUPEROVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (SOV/TE)

A primeira SOV/TE realizada com sucesso foi em 1951 na Universidade de Cornell, nos Estados Unidos (KANAGAWA *et al.*, 1995). Sua importância básica para produção animal consiste na possibilidade de uma fêmea produzir um número de descendente muito superior ao que seria possível fisiologicamente durante sua vida reprodutiva afirma Taneja *et al.* (2000), fazendo com que uma fêmea possa ter vários descendentes contemporâneos e padronizados. Além disso, a produção de embrião (*in vivo* ou *in vitro*) associada a criopreservação, pode proporcionar o transporte internacional de germoplasma sem o risco de transmissão de doenças, conservação de raças em perigo de extinção, dentre outros aspectos (PASA, 2008).

A biotécnica citada permite que uma fêmea bovina de valor genético superior seja estimulada pelo processo de superovulação (SOV), protocolo farmacológico para induzir ovulações múltiplas, em seguida insemina a fêmea bovina, faz-se lavagem uterina a fim de recuperar os embriões que serão avaliados e, posteriormente, inovulados a outros animais de valor genético inferior (GONÇALVES *et al.*, 2001). Assim, considerando que houve uma seleção de animais superiores geneticamente para doarem os gametas, resultará em indivíduos de alto valor genético padronizado, ganho de eficiência reprodutiva, aumento no número de descendentes da doadora durante sua vida reprodutiva e, também, possibilitar o comércio de embriões, venda de animais de grande valor genético (REICHENBACH *et al.*, 2002).

Para sucesso na transferência é necessário sincronizar o estro entre animais doadores e receptores, ou seja, na mesma fase do ciclo estral, de modo que o período de sincronia entre esses animais não ultrapasse 24 horas, obtendo-se os melhores resultados quando ela se fizer presente dentro de 12 horas (HAFEZ, 1995). Para isso, pode-se utilizar o processo de SOV na doadora e observação de sinais de estro na receptora. Dessa forma, a eficiência na prática de observação de estro se torna imprescindível para o sucesso de tal biotécnica, a fim de ser rentável e produtiva (COSTA, 2009; PASA, 2008). Já o trabalho feito pelo grupo de Randi *et al.* (2015) observou que a transferência de um embrião de 7º dia para um útero síncrono de 7º

dia resultou em uma taxa de prenhez de 47,3%. A transferência para o útero 1 dia antes (D-6, 46,6%) não afetou a taxa de prenhez. No entanto, a transferência para o útero 2 dias antes (D-5, 40,8%) ou dia 8 (41,3%) impactou moderadamente a taxa de prenhez, enquanto a transferência para um útero 2 dias depois (D-9, 24,4%) ou 3 dias antes (D-4, 27,0%) reduziu acentuadamente a taxa de prenhez em comparação com transferências síncronas.

Outro processo importante para a biotécnica em questão é a possibilidade da criopreservação do embrião já formado. Em muitos casos, a produção de embriões é maior que o número de receptoras sincronizadas para não perder o material genético, pode-se congelar os embriões excedentes, sendo assim, é possível fazer o transporte desses embriões e ainda promover a preservação de raças em perigo de extinção (NEVES *et al.*, 2010).

Um ponto de estrangulamento para a eficiência de um programa de TE é o custo fixo de manutenção de um grande número de receptoras por doadora. É necessário entender os fatores que geram variações nos resultados de TE para, então, buscar soluções e aumentar a taxa de aproveitamento e prenhez, diminuindo perdas com protocolos e, assim, reduzir custos de produção (COSTA FILHO *et al.*, 2013).

2.2.1 Transferência de Embriões em Tempo Fixo - TETF

A aplicação de um programa bem-sucedido usando embriões *in vivo* ou *in vitro* não depende apenas de um sistema de PIVE robusto, mas também da implementação de um programa de inovação/TE bem-sucedido (BO *et al.*, 2019). No entanto, fatores como nutrição, manejo e eficiência de detecção de estro afetam o uso dessa tecnologia tanto no corte quanto no leite. A alternativa mais útil para aumentar o número de receptoras utilizados na TE é aplicar protocolos que permitem a inovação sem a necessidade de detecção de estro, geralmente referido como transferência de embrião em tempo-fixo (TETF; BÓ *et al.*, 2012).

Para evitar limitações associadas à detecção de estro, tratamentos que sincronizam o tempo de ovulação em receptoras, que foram originalmente desenvolvidos para IATF, têm sido utilizados para TETF (BO *et al.*, 2002, 2012a) podendo ser baseados em GnRH (AMBROSE *et al.*, 1999) ou baseados em estradiol

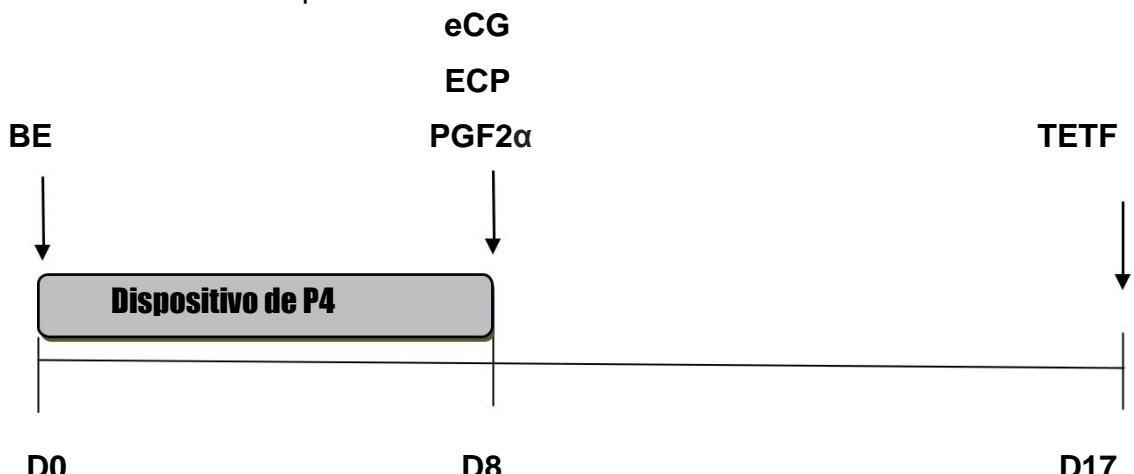
(BO *et al.*, 2002). Mesmo assim, os protocolos da receptora incluem a inserção de um dispositivo de progesterona (P4) por 7 ou 8 dias (HINSHAW, 1999).

Os tratamentos baseados em estradiol e P4 são os mais comumente usados para sincronizar a emergência da onda folicular e a ovulação de receptoras na América do Sul (BARUSELLI *et al.*, 2010). O protocolo simplificado mais comumente utilizado está representado na Figura 3 e consiste na inserção de um dispositivo de P4 e na administração intramuscular (IM) de benzoato de estradiol (BE) em um dia qualquer do ciclo estral denominado dia 0 (D0). O dispositivo de P4 é removido geralmente no dia 7 ou 8 após sua inserção e são administrados IM gonadotrofina coriônica equina (eCG), cipionato de estradiol (ECP) e cloprosteno sódico (PGF2 α). No dia da transferência de embrião (D16 a D18), avalia-se o lado e se há um ou mais CL, para prosseguir com a TE. Caso contrário, a receptora não respondeu adequadamente ao protocolo e será descartada do programa (BARUSELLI *et al.*, 2017).

2.3 AVALIAÇÃO DE RECEPTORAS DE EMBRIÃO POR ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER

A seleção das receptoras no dia da TE geralmente é realizada levando-se em consideração a presença e o tamanho do CL à palpação transretal. Este método, apesar da facilidade e praticidade de execução, apresenta limitação na avaliação, dada a sua baixa sensibilidade e especificidade (SPRECHER *et al.*, 1989). O trabalho realizado por Viana (1996) mostrou que a escolha das receptoras pela projeção do CL não é adequada. Um CL com projeção pequena pode apresentar uma grande porção inserida no estroma ovariano, enquanto um CL com projeção maior pode apresentar massa luteal total pequena. Assim, a projeção nem sempre está relacionada ao tamanho do CL. Além disso, embora haja uma tendência de priorizar a TE em receptoras com maior CL, ainda não é pleno consenso de que o sucesso gestacional dependa da área luteal.

Figura 3 – Ilustração esquemática do protocolo tradicional de transferência de embrião em tempo fixo (TETF) de três manejos para a sincronização das receptoras



Legenda: BE (benzoato de estradiol), PGF₂α (ciprostenol sódico), eCG (gonadotrofina coriônica equina), CE (cipionato de estradiol), TETF (transferência de embrião em tempo fixo), DG (diagnóstico gestacional) e P4 (progesterona).

A ultrassonografia é uma técnica que permite a completa visualização do tecido luteal, possibilitando maior precisão na identificação e na mensuração do CL (SÁ FILHO *et al.*, 2009). Nessa avaliação, a imagem do CL é uniforme, circunscrita e menos ecogênica que o estroma ovariano (VIANA *et al.*, 1999). Portanto, empregando ultrassonografia é possível avaliar tamanho e qualidade do CL, algo bem estratégico se considerarmos que o CL é responsável pela produção de progesterona que vai controlar o ambiente uterino e é essencial ao desenvolvimento embrionário e à manutenção da prenhez (ANDRADE *et al.*, 2012).

No ciclo estral, os níveis de P4 refletem o crescimento, a manutenção e regressão luteal (SPANO; SILVA, 1992) e sua avaliação permite a associação das características morfológicas do CL ao ultrassom com o seu estado funcional. A concentração de P4 circulante depende diretamente de sua produção, da liberação pelo tecido luteal e da taxa de clearance (VIANA *et al.*, 1999). Fatores como o fluxo sanguíneo, presença de agentes luteotróficos ou luteolíticos e a disponibilidade de precursores para a sua biossíntese pelas células luteais interferem na produção deste hormônio (WILTIBANK, 1994). Estes interagem determinando um padrão de secreção circadiana para os hormônios ovarianos (SPANO; SILVA, 1992).

Dentre as diversas opções, a ultrassonografia convencional no modo brilho (B; escala de cinza) é a forma mais usada e que proporciona uma imagem bidimensional dos órgãos e tecidos avaliados. Assim, o uso rotineiro da

ultrassonografia no modo B nas últimas décadas tem possibilitado melhor avaliação de matrizes para iniciarem programas de IATF e da qualidade de receptoras para receberem embriões em programas de TETF. Mais recentemente, a ultrassonografia Doppler começou a ser usada em pesquisas para avaliação do sistema reprodutivo da fêmea bovina e equina ao longo do ciclo estral e durante a gestação. Seu potencial de uso em pesquisas e na prática reprodutiva bovina se baseia na capacidade de avaliar a funcionalidade de órgãos e tecidos devido à menor ou maior perfusão sanguínea (PUGLIESE *et al.*, 2017).

Apesar do grande conhecimento adquirido em relação às mudanças fisiológicas de perfusão sanguínea em órgãos, tecidos e componentes reprodutivos, só recentemente foram desenvolvidos estudos que possibilitaram novas estratégias do uso do Doppler com potencial para incorporação em programas reprodutivos comerciais e que visam melhorar a eficiência reprodutiva. Dentre as diversas possibilidades de avaliação, a ultrassonografia Color-Doppler vem sendo mais usada como uma técnica não-invasiva e em tempo real para estimar a funcionalidade do CL para seleção de receptoras em programas de TETF e para diagnóstico precoce da gestação em programas de IATF (PUGLIESE *et al.*, 2017).

2.3.1 Corpo lúteo

A formação do CL ocorre a partir de alterações morfológicas e bioquímicas nas células da teca e da granulosa do folículo pré-ovulatório, fenômeno resultante da elevação da concentração e pulsatilidade do hormônio luteinizante (LH). A principal função do CL é a produção de P4, com vários efeitos biológicos no organismo (VIEIRA *et al.*, 2002).

Vieira *et al.* (2002) observando através da palpação transretal no dia da inovação não encontraram diferenças na taxa de prenhez quando compararam CL's, classificados como pequeno, médio e grande. A alternativa para otimizar o uso das receptoras é a ultrassonografia Doppler, por permitir uma completa visualização da estrutura do CL, mensuração objetiva das suas dimensões e avaliação da formação da rede vascular ovariana. Seu tamanho está relacionado com a produção de P4, mas esse incremento pode apresentar resultados distintos quanto à taxa de gestação.

Durante os estudos da equipe de Pugliese *et al.* (2014), criaram-se alguns critérios, mas todos se baseiam numa menor vascularização apresentada no CL já

afuncional ou em regressão nas vacas não-gestantes. Em vacas Nelore foi determinado que a vaca não-gestante seria aquela com sinais coloridos indicando fluxo sanguíneo < 25% da sua área e < 2 cm². Este valor de proporção de perfusão sanguínea luteal, o qual é obtido através de uma avaliação subjetiva, pode ser transformada para uma escala mais simples e prática através de escores de vascularização. Assim, a avaliação da vascularização pode ser compreendida mais facilmente e ser assim usada de forma mais simples por profissionais para avaliar a funcionalidade do CL. Siqueira *et al.* (2009) concluíram que a área do CL e sua aparência no US na TE foram preditores fracos do resultado da prenhez em receptoras de bovinos de corte. No estudo do grupo de Pugliese *et al.* (2019) não observaram o efeito do tamanho do CL no sucesso para prenhez positiva. Mas quando a área lútea foi avaliada como variável contínua, observou-se efeito quadrático do tamanho do CL. A interpretação da curva quadrática indica uma relação positiva entre a probabilidade de prenhez e a área do CL até o tecido lúteo atingir 4,07 cm², seguido de uma relação negativa após o ponto de inflexão, sugerindo que as receptoras tinham menor probabilidade de emprenhar se o CL fosse maior que esse tamanho. No entanto, a probabilidade de prenhez foi extremamente baixa apenas quando a área era menor que 2 cm² ou maior que 6 cm².

2.3.2 Avaliação do grau de vascularização do Corpo Lúteo

Diversos resultados indicam uma associação positiva entre a vascularização e a função folicular. Nesse sentido uma maior perfusão sanguínea é observada na parede folicular de folículos dominantes e pré-ovulatórios (MIYAMOTO *et al.*, 2006). Similarmente, tratamentos que promovem maior crescimento do folículo dominante resultam em um folículo pré-ovulatório mais vascularizado e com maior capacidade de secreção de estradiol do que folículos menores (MESQUITA *et al.*, 2014).

A avaliação ultrassonográfica do CL com consequente estimativa de seu *status* funcional é um aspecto importante para o manejo reprodutivo e foi inicialmente desenvolvida como ferramenta de diagnóstico junto com a palpação transretal nas fêmeas bovinas. Apesar da avaliação do tamanho de tecido luteal estar positivamente correlacionada com as concentrações circulantes de P4 e servir assim como um indicativo da função luteal, durante o período de regressão luteal esta correlação é menor devido as taxas de decréscimo serem mais rápidas para P4 do que para o

tamanho do CL (ASSEY *et al.*, 1993). Com isso, a avaliação da vascularização do tecido luteal pode representar de forma mais precisa a função do CL visto a alta rede vascular presente nesta glândula transitória (PUGLIESE *et al.*, 2017). Além disso, a avaliação da perfusão sanguínea no CL pode ser bastante útil pois maiores concentrações de P4 no início do diestro estão relacionadas com maior desenvolvimento do concepto (MANN; LAMMING, 2001) e associadas a maior probabilidade de gestação. Neste sentido, a vascularização do CL se inicia logo após a ovulação e é altamente correlacionada com as concentrações de P4 durante a sua fase de desenvolvimento que vai do oitavo ao décimo dia do ciclo estral (ACOSTA *et al.*, 2003).

Uma alternativa eficaz, de abordagem não invasiva, seria avaliação ultrassonográfica transretal com Doppler da função vascular do CL, permitindo observação visual do fluxo sanguíneo local do CL pelo sinal Doppler. Os níveis de P4 depende diretamente do fluxo sanguíneo do CL, dessa forma, esse fluxo sanguíneo pode ser quantificado confiavelmente por ultrassonografia Doppler transretal (ACOSTA *et al.*, 2002) (Figura 4).

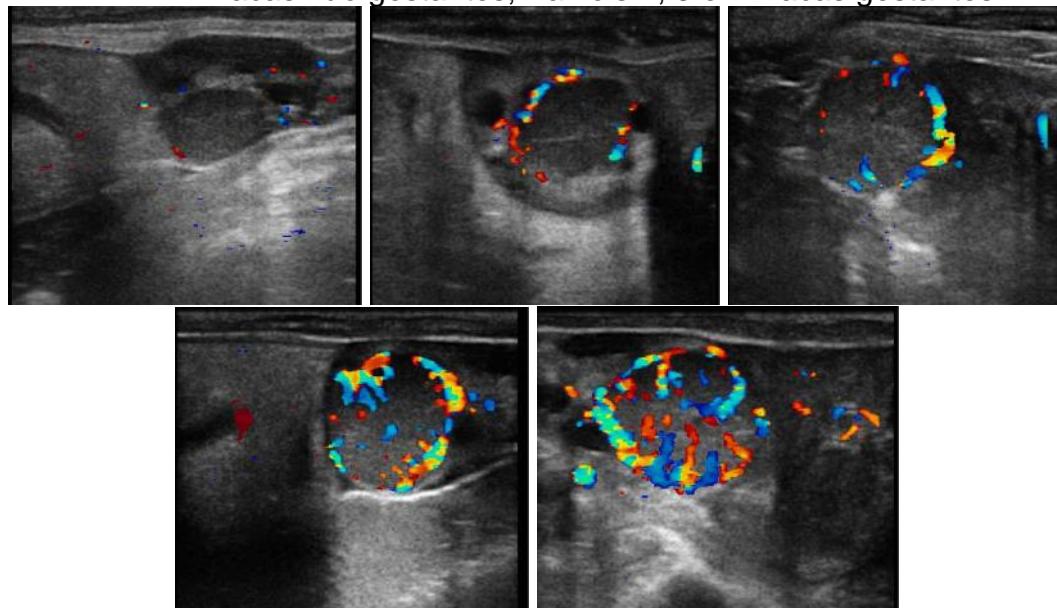
Desta forma, observa-se que a ultrassonografia Doppler pode ser utilizada para se descartar receptoras que apresentem CL afuncional e para selecionar receptoras que teriam uma melhor receptividade e assim seria uma alternativa para se direcionar embriões de maior prioridade para se obter gestações. Isto poderia promover um ganho na eficiência reprodutiva em programas de TETF visto que não se perderia embriões transferidos em receptoras com CL não-funcional, e em caso de excedente de receptoras poderia dar preferência para fêmeas com média a alta vascularização luteal (PUGLIESE *et al.*, 2017).

Após a ovulação ocorre o aumento progressivo da perfusão sanguínea do CL, sua circunferência é quase toda envolvida no sexto dia pós-ovulação. Durante este período, a P4 também aumenta de forma progressiva e do D8 ao D14, além do alto perfil sérico de P4, a perfusão vascular luteal também aumenta em valores máximos. Porém, durante a luteólise, acontece a diminuição da vascularidade do CL, acompanhado da queda da concentração de P4. Em bovinos, a luteólise é antecedida por um elevado aumento da perfusão luteal sanguínea (ACOSTA *et al.*, 2002; MIYAMOTO *et al.*, 2005).

Porém, a visualização do fluxo sanguíneo do CL pode ser usada em pesquisas de fisiologia ovariana ou dentro de manejos reprodutivos. Um CL que não apresenta

suficientes sinais de pixels na avaliação Doppler é sinal evidente de falta de suprimento de sangue, e dessa forma pode ser considerado não funcional, mesmo apresentando tamanho e forma normal no seu diâmetro e área. Sendo assim, a ultrassonografia em escala cinza é limitada em diferenciar um CL funcional de outro não funcional caso os dois tenham o mesmo tamanho. Nesse caso, a avaliação de funcionalidade só se torna possível usando Doppler. A avaliação do fluxo sanguíneo tem sido sugerida com uma confiabilidade melhor e como mais apropriado, do que avaliação por tamanho para função de CL (HERZORG *et al.*, 2010).

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



Fonte: Pugliese (2017).

Pugliesi *et al.* (2016) estudaram o impacto da perfusão sanguínea luteal avaliados por ultrassonografia color Doppler no momento da TETF em taxas de gestação de vacas receptoras. As receptoras foram divididas em dois subgrupos por tamanho do CL, <3cm² para CL pequenos e >3cm² para CL grande. Além de três subgrupos por perfusão sanguínea luteal, baixa (<40%), média (45 a 50%) ou alta (>55%). Notaram que apenas a perfusão sanguínea lútea afetou a taxa de gestação, refletindo no progressivo aumento da taxa de gestação associada ao aumento da vascularização luteal (baixa 45,1%, [37/82]; média, 55,9% [57/102] e alta, 62,3% [38/61]).

2.4 FATORES QUE INTERFEREM NA PERDA GESTACIONAL DE RECEPTORAS

Os cuidados com as receptoras devem ser iniciados bem antes da TE propriamente dita. O manejo das doadoras e receptoras, bem como sua saúde reprodutiva são pontos importantes para os resultados finais. Mas, nos programas de TE, a atenção despendida é especialmente voltada para a doadora, e muitas vezes as receptoras acabam ficando em segundo plano de manejo, o que se reflete em baixa taxa de gestação e alta taxa de mortalidade embrionária (FERNANDES, 1999).

A sobrevivência do embrião e estabelecimento da gestação envolvem a comunicação ativa e passiva entre embrião e útero. A manutenção do CL, como resultado dos sinais embrionários para a mãe, garante a produção continuada de P4, a qual é necessária para preparar o endométrio para implantação e nutrição embrionária. A presença do embrião por volta do dia 16 do ciclo inibe a síntese e liberação de PGF2 α do endométrio, prevenindo assim a luteólise e o consequente declínio na produção de P4. A maioria das perdas embrionárias em bovinos ocorre durante o período embrionário da gestação (< 45 dias) (SARTORI; DODE, 2008).

A taxa de sobrevivência embrionária após a inovação pode ser influenciada por fatores como anormalidades cromossômicas, efeito da doadora, idade e qualidade dos embriões inovulados, método e local da transferência, sincronia doadora-receptora, estado nutricional e concentração sérica de P4 na receptora, bem como estresse calórico e ocorrência de doenças reprodutivas (SCANAVEZ; CAMPOS; SANTOS, 2013).

Já sobre o tipo de embrião transferido, fresco ou após vitrificação, Pereira et al. (2019) não observaram diferença sobre a perda gestacional. Da mesma forma no experimento de Pessoa et al. (2014) as taxas de perda gestacionais foram de 9,3% (18/371) para embriões frescos e 10% (6/153) vitrificados.

Não foram encontrados estudos que avaliaram a interação entre a perda gestacional e o tamanho do CL (cm^2) ou a perfusão sanguínea luteal.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A.; Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v. 125, p. 759-767, 2003.
- ACOSTA, T. J.; YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F (2 alpha) injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 651-658, 2002.
- AMBROSE, J. D.; DROST, R. L.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; THATCHER, M. J.; KASSA, T.; BINELLI, M.; HANSEN, P.J.; CHENOWETH, P. J.; THATCHER, W. W. Eficácia da transferência programada de embriões com produtos frescos e congelados de embriões *in vitro* produzidos para aumentar as taxas de prenhezes em vacas leiteiras sob estresse térmico. **Dairy Science**, v. 82, p. 2369-2376, 1999.
- ANDRADE, G. A.; FERNANDES, M. A.; KNYCHALA, R. M.; PEREIRA JUNIOR, M. V.; OLIVEIRA, A. J.; NUNES, D. P.; BONATO, G. L.; SANTOS, R. M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p. 66-69, 2012.
- ARAUJO, M. S.; VOLPATO R.; LOPES, M. D. Produção de embriões bovinos *in vitro* com sêmen sexado. **Revista de Educação Continuada em medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP / Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP**. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 11, n. 3 (2013), p. 08-15, 2013.
- ASSEY, R. J.; PURWANTARA, B.; GREVE, T.; HYTTEL, P.; SCHMIDT, M. H. Corpus luteum size and plasma progesterone levels in cattle cloprostenol-induced luteolysis. **Theriogenology**, v. 39, p. 1321-1330, 1993.
- BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; COLLI, M. H. A.; FILHO, M. F. S.; VIEIRA, L.; FREITAS, B. G. **Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil**. Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Cabo de Santo Agostinho – PE, Brasil, 2017, p. 14.
- BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SÁ FILHO, M. F.; NASSER, L. F. T.; RODRIGUES, C.; BÓ, G. A. Transferência de embrião bovino sincronizada e gerenciamento de destinatários em ambientes tropicais. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 22, p. 67-74, 2010.
- BO, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MAPLETOFT, R. J. Aumentando gestações após sincronização de receptoras bovinas. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 312-317, 2012a.

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

BO, G. A.; CEDENO, A.; MAPLETOFT, R. J. Estratégias para incrementar a produção *in vivo* e *in vitro* e transferência de embriões bovinos. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 411-422, 2019.

BO, G. A.; PERES, L. C.; CUTAIA, L. E.; PINCINATO, D.; BARUSELLI, P. S.; MAPLETOFT, R. J. Treatments for the synchronization of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, p. 272-277, 2012b. DOI: 10.1071 / RD11918

BOLLWEIN, H.; LÜTTGENAU, J.; HERZOG, K.; Bovine luteal blood flow: basic mechanism and clinical relevance. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 25, p. 71-79, 2012.

COSTA FILHO, L. C. C. da; QUEIROZ, V. L. D.; ROSA, L. S. da; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA e SILVA, E. V. da. Fatores que interferem na eficiência reprodutiva de receptoras de embrião bovino, **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 16, n. 2, p. 201-208, jul./dez. 2013.

COSTA, M.A. **O uso das técnicas de transferência de embriões e fertilização in vitro em bovinos da raça Gir, na associação dos produtores rurais da comunidade de vista alegre-aprovista**. Cáceres - Mato Grosso: Universidade do Estado de Mato Grosso, 2009, 10:14-17.

FERNANDES, C. A. C. Inovulação não cirúrgica e taxa de gestação de receptoras de embrião. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 263-266, 1999.

GALLI, C.; DUCHI, R., CROTII, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONE, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, [s.l.], v. 59, p. 599-616, 2003.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. F.; FIGUEIREDO, J. R de; FREITAS, V. J de F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. REICHENBACH, Horst, Dieter, et al. São Paulo: Varela, Cap. 8, p.127-162. 2001.

HAFEZ, E. S. E. Tecnologia reprodutiva assistida: manipulação da ovulação, fertilização *in vitro*/transferência de embrião. In: HAFEZ, E. S. E.; **Reprodução Animal**, Manole Ltda: São Paulo, p. 469-512, 1995.

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

- HINSHAW, R. H.; Formulando protocolos de TE. “**Proceedings Annual Meeting Soc. For Theriogenology**”. Nashville, EUA. Society for Theriogenology: USA, 1999, p. 399-404.
- HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, p. 675-685, 2003.
- IETS. International embryo transfer society. Statistics and data retrieval committee report. **Embryo Transfer Newsletter**, 2017.
- JUNIOR, J. R. S.; FRANCO, M.M.; SILVA, B.D.M. **Dinâmica do fluxo sanguíneo folicular em vacas Nelore submetidas a protocolo de IATF** – Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2015.
- KANAGAWA, H.; SHIMOHIRA, I.; SAITO, N. **Manual of bovine embryo transfer**. 1º edição Japan Livestock Technology Association, 1995. 432 p.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, p. 175-180, 2001.
- MESQUITA, F. S.; PUGLIESE, G.; SCOLARI, S. C.; FRANÇA, M. R.; RAMOS, R. S.; OLIVEIRA, M.; PAPA, P. C.; BRESSAN, F. F.; MEIRELLES, F. V.; SILVA, L. A.; NOGUEIRA, G. P.; MEMBRIVE, C. M.; BINELLI, M. Manipulation of the periovulatory sex steroid mili affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. **Theriogenology**, v. 81, p. 861-869, 2014.
- MIYAMOTO, A. et al. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Domest Animal Endocrinology**, v. 29, p. 329-339, 2005.
- MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; HAYASHI, K. G.; KAMADA, D.; AWASHIMA, C.; KANEKO, E.; ACOSTA, T. J.; MATSUI, M. A potencial use of color ultrasound as a tool for reproductive management: New observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. **J. Reprod. Dev.**, v. 52, p. 153-160, 2006.
- NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1291-1301, 2001.
- NEVES, J. P.; MIRANDA; K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso Científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 414-418, 2010.
- PASA, C. **Transferência de embriões em bovinos**. Biodiversidade. FAMEV – UFMT, v. 7, n. 1, 2008, p. 66-74.
- PEREIRA, L. C. et al. Pregnancy and delivery rates after vitrification of in vitro-produced Nelore (*Bos indicus*) embryos under field conditions. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 32, n. 1, p. 4349, 27 mar. 2019. Universidad de Antioquia. <http://dx.doi.org/10.17533/udea.rccp.v32n1a05>.

PESSOA, A. B. C. M.; PEREIRA, E. T. N.; MELO, M. I. V. Influência do local de inovulação e do tamanho de corpo lúteo sobre a taxa de prenhez em programa de transferência de embriões bovinos em tempo fixo. **Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte**, v. 38, n. 4, p.237-241, 2014. Disponível em www.cbra.org.br.

PUGLIESE, G.; MELO, G. D. de; SILVA, J. B.; CARVALHEDO, A. S.; LOPES, E.; FILHO, E. de S.; SILVA, L. A.; BINELLI, M. Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. **Theriogenology**, v. 135, p. 73-79, 2019.

PUGLIESE, G.; MIAGAWA, B. T.; PAIVA, Y. N.; FRANÇA, M. R.; SILVA, L. A.; BINELLI, M. Conceptus-induced changes in the gene expression. Of blood immune cells and the ultrasound-accessed luteal function in beef cattle: How early can detect pregnancy? **Biol. Reproduction**, v. 95, p. 1-12, 2014.

PUGLIESE, G.; REZENDE, R. G.; SILVA, J. C. B. da; LOPES, E.; NISHIMURA, T. K.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. D.; BINELLI, M. Uso da ultrassonografia doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Animal., Belo Horizonte**, v. 41, p. 140-150, 2017. Disponível em www.cbra.org.br.

PUGLIESE, G.; SANTOS, F. B.; LOPES, E.; NOGUEIRA, E., MAIO J. R.; BINELLI, M. Improved fertility in suckled by beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. **Theriogenology**, v. 85, p. 1239-1248, 2016.

PUGLIESI, G.; PINAFFI, F. L. V.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Use of corpus luteum area as a predictor of ongoing functional luteolysis in dairy heifers. **Reprod., Fert. and Develop.**, v. 25, p. 235, 2013. Resumo.

RANDI, F.; FERNANDEZ-FUERTZ, B.; McDONALD, M.; FORDE, N.; KELLY, A. K.; AMORIN, H. B.; LIMA, E. M. de; MOROTTI, F.; SENEDA, M. M.; LONERGAN, P. Asynchronous embryo transfer as a tool to understand embryo-uterine interaction in cattle: is a large conceptus a good thing? **Reprod., Fert. and Develop.**, v. 28, n. 12, p. 1999-2006, 2015. <https://doi.org/10.1071/RD15195>.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. Transfer and cryopreservation of bovine embryo. In: Gonsalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, 1^aed. São Paulo, Ed. Varela, p. 153-160, 2002.

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

SANGILD, P. T.; SCHMIDT, M.; JACOBSEN, H. Blood chemistry, nutrient metabolism and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 1495-1504, 2000.

SARTORI, R.; DODE, M. A. N.; Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 3., 2008, Londrina. **Anais...** Londrina: SIRAA, p. 175-194, 2008.

SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 722-728. 2013.

SIQUEIRA, L. G. B.; TORRES, C. A. A., SOUZA, E. D.; MONTEIRO, P. L. J.; ARASHIRO, E. K. N.; CAMARGO, L. S. A. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. **Theriogenology**, v. 72, p. 949-958. 2009.

SOUZA, N. S. de; ABADE, C. C.; Produção *in vitro* de embriões bovinos: etapas de produção e histórico no Brasil. **Ciência Veterinária UniFil**, v.1, n.3, jul/set. 2018.

SPANO, A. A.; SILVA, A. A. M. R. Níveis plasmáticos de progesterona durante o ciclo estral e na fase inicial da gestação em bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*). **Ars Veterinária**, v. 8, p. 131-141, 1992.

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

TANEJA, M.; BOLS, P. E. J.; VELDE, V. Development competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal, variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology Reproduction Champaing**, v. 31, p. 67-73, 2000.

VIANA, J. H. M. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. Divergent trends for IVD and IVP embryos. **Embryo Technology Newsletter**, v. 40, n. 4, 2022.

VIANA, J. H. M. **Avaliação ultrassonográfica de estruturas ovarianas em doadoras e receptoras de embrião**. Viçosa, 1996. 120 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Zootecnia, Viçosa, MG. Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

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

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; MILLER, P. P.; CAMARGO, L. S. de A. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 2, p. 661-674, 2010.

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

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

3 HIPÓTESE

O uso da ultrassonografia Doppler permite uma melhor seleção da receptora de embrião com base na vascularização do corpo lúteo, melhorando a taxa de concepção e reduzindo a perda gestacional em programas de TETF.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do tamanho do CL e do escore de perfusão sanguínea luteal na taxa de concepção e na perda gestacional de receptoras em programas de transferência de embriões em tempo fixo (TETF).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Classificar o tamanho do CL e relacionar com a taxa de concepção e ocorrência de perda gestacional em receptoras de embrião submetidas à programa de TETF;
- Determinar o escore de perfusão sanguínea luteal e relacionar com a taxa de concepção e ocorrência de perda gestacional em receptoras de embrião submetidas à programa de TETF;
- Comparar as taxas de concepção e de perda gestacional dos 30 e 90 dias em receptoras de embrião, considerando o *ranking* de CL e de perfusão luteal.

5 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

“Conception rate and pregnancy loss in fixed-time cattle embryo transfer programs are related to the luteal blood perfusion but not to the corpus luteum size”

Theriogenology

Volume 210, 15 October 2023, Pages 251-255

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.07.039>

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of luteal blood perfusion and corpus luteum (CL) area on the conception rate and occurrence of pregnancy loss of recipients in a large-scale fixed-time embryo transfer (FTET) program. Multiparous Brangus cows ($n = 1,700$) at 45 days postpartum and body condition scores (BCS) between 2.5 and 4.0 (3.0 ± 0.3) were used in this study. On a random day of the estrous cycle (day -10), the females received progesterone and estradiol based on the FTET protocol. On day 7, 1,465 recipients had at least one CL and were evaluated using B-mode ultrasound for the CL area (cm^2) and color Doppler for the luteal blood perfusion score (I/low-vascularization area < 40% of the CL; II/medium-vascularization > 45% to < 50%; and III/high-vascularization > 50%). Immediately after CL evaluation, each recipient received a single fresh embryo (blastocyst stage) ipsilateral to the CL, *in vitro* produced from a commercial laboratory. Pregnancy diagnosis was performed at 30 days and repeated 60 days later to evaluate pregnancy loss (30 to 90 days). Ultrasound evaluation and embryo transfer were performed by a single technician. For data analysis, in addition to luteal blood perfusion groups, recipients were retrospectively ranked according to CL area into small (< 3 cm^2 ; 2.63 ± 0.01), medium (> 3 to < 4 cm^2 ; 3.44 ± 0.01), and large (> 4 cm^2 ; 4.77 ± 0.03). Data were analyzed using a logistic regression model ($P < 0.05$). The overall conception rate was 44.2% (648/1,465), influenced by the luteal blood perfusion score [$P = 0.03$; high 48.4%^a (134/277), medium 44.6%^a (427/958), and low 37.8%^b (87/230)] but not by CL area ranking [$P = 0.37$; large 41.8% (225/538), medium 45.2% (276/610), and small 46.4% (147/317)]. There was no interaction between the luteal blood perfusion score and CL area ranking ($P = 0.81$), and the BCS did not affect the results of this study ($P = 0.51$). In terms of pregnancy loss up to 90 days, there was no effect on the CL area ranking ($P = 0.77$), but the flow score showed an effect [$P = 0.03$; high 3.6%^b (5/139), medium 9.3%^a (44/471), and low 10.3%^a (10/97)]. The conception rate and occurrence of pregnancy loss in the FTET program in beef cattle are related to luteal blood perfusion but not CL size.

Keywords: recipients, luteal blood, CL area, conception rate, pregnancy loss

1. Introduction

The use of reproductive biotechniques, such as artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET), has made livestock more productive and profitable, contributing to improved genetic gain at an accessible cost [1, 2]. In both AI and ET programs, several studies have reported high efficiency in commercial application in large-scale herds [3-7], which confirms the commitment of the scientific community to contributing to the evolution of animal reproduction and also to the proposal to increase the production of both beef and dairy cattle in a responsible and sustainable manner [8].

Globally, *in vitro* embryo production (IVEP) in cattle stands out as an assisted reproduction tool with the greatest impact on the genetic improvement of herds, contributing to improved genetic potential in a short period of time [3, 4, 6, 9, 10]. Numerous studies have focused on the physiology of the estrous cycle and the pharmacological control of estrus and ovulation, making it possible to develop fixed-time programs for both AI and ET [11-13]. Fixed-time embryo transfer (FTET) has been used in large-scale embryo transfer programs to improve the efficiency of the simultaneous transfer of a large number of embryos [7, 11, 12].

Large-scale ET programs usually consider the presence of a corpus luteum (CL) as the main criterion for deciding whether a recipient is eligible to receive an embryo [4, 10]. However, the fertility of recipients of ET programs does not depend solely on the presence of CL. For instance, CL size has been considered decisive for gestational success [11, 12, 14]. Although some studies have pointed out that CL size is essential for gestational success [15-17], others have not confirmed that the CL size is a mandatory aspect of pregnancy establishment [18-20]. Therefore, the CL size remains an issue that needs to be investigated, although there is a tendency to prioritize ET in recipients with larger CL in comparison to those animals with smaller CL.

Recent studies have used color Doppler ultrasonography to assess luteal activity by CL blood perfusion during ET and improve the prediction of gestational success. The relationship between luteal blood perfusion and gestational success has been reported in several studies using the FTET program [20-24]. Cows and heifers with greater blood perfusion in the CL show higher serum concentrations of P4 and better reproductive success than females with lower blood perfusion in the CL [25-28]. Although Doppler ultrasonography

has already been indicated as a promising tool for the evaluation of embryo recipients [20, 28], this reproductive strategy is still relatively recent and needs further studies to increase the reliability of the use of Doppler ultrasonography in large-scale commercial embryo programs in cattle.

Considering the worldwide growth of IVEP, a critical aspect of this technique has been pregnancy loss. Compared with *in vivo*-produced embryos, the pregnancy rates of *in vitro* embryos are 10–40% lower, mainly due to embryonic losses, as reviewed by Ealy et al. [29] and Reese et al. [30]. To the best of our knowledge, no previous study has considered the relationship between CL size, luteal blood flow score, and pregnancy loss in a large-scale commercial ET program. Therefore, we hypothesized that the conception rate and occurrence of pregnancy loss in embryo recipients managed on a large scale can be influenced by both the blood flow score and CL size.

2. Materials and Methods

2.1. Location, animals and management

This study was carried out on a commercial beef cattle farm, located in southern Brazil, latitude 23° 18' 36" south, longitude 51° 09' 46" west. In this region, the climate is Cfa – humid subtropical climate (mesothermal) according to the Köppen–Geiger classification, characterized by a humid temperate climate with an annual temperature ranging from 13 to 30 °C, well-defined seasons, dry winter, and hot summer with temperatures above 22 °C and an average annual rainfall of 1,723 mm.

The farm specializes in the production of genetics for the Brangus breed (5/8 Aberdeen Angus and 3/8 Zebu) and evaluated 1,700 recipients enrolled in a large-scale commercial program for embryo transfers during the breeding season. The recipients were multiparous Brangus cows, with at least 45 days postpartum, ages ranging from 5 to 8 years, and body condition scores (BCS) between 2.5 and 4.0 (scale 1–5) [31]. Throughout the experimental period, the animals were maintained on *Urochloa brizantha* cv. *Marandú* with *ad libitum* access to water and mineral supplements. All animals were subjected to a strict sanitary protocol, with periodic vaccinations for the main diseases affecting animal reproduction.

2.2. Fixed-time embryo transfer (FTET) protocol

All recipients underwent the conventional FTET protocol with progesterone and estradiol. On a random day of the estrous cycle (day -10), the recipients received a progesterone (P4)-releasing intravaginal device containing 1 g of P4 (1° use; Sincrogest®, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brazil) and 2.0 mg of estradiol benzoate was administered intramuscularly (Sincrodiol®, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brazil). Eight days later (D-8), the P4 device was removed, and 0.526 mg of sodium cloprostenol (Sincrocio®, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brazil), 400 IU of equine chorionic gonadotropin (Sincro eCG®, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brazil), and 1.0 mg of estradiol cypionate (SincroCP®, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brazil) were administered intramuscularly. On day 7 (D7), each recipient was previously evaluated using palpation and transrectal ultrasound; those with at least one CL ($n = 1,465$) were considered acceptable in the FTET program and received an embryo ipsilateral to the CL. Females without CL ($n = 235$) were excluded from the study and their data were not considered in our analyses. The embryos were produced in a commercial laboratory using IVEP, had a quality of I and II [32], and were transferred fresh at the blastocyst stage (day 7) by a single technician.

2.3. Ultrasound evaluations

All ultrasound evaluations in the present study were performed using an ultrasound device (SonoScape™, Model E2V, Domed, Valinhos, Brazil) equipped with a 5–10-MHz transrectal linear transducer, and a single operator performed all evaluations. On day 7, immediately before embryo transfer, recipients considered acceptable ($n = 1,465$) were evaluated using B-mode ultrasound to measure the area of the CL and color Doppler ultrasound to determine luteal flow scores. The CL area (cm^2) was measured using a static image in the B-mode, and the largest size was measured using the ellipse function of the ultrasound. If the CL was cavitary, the area was determined by subtracting the area of the luteal cavity from the total area. Luteal perfusion of the CL was evaluated using a color Doppler configuration to detect a blood flow of 5.4 cm/s. To determine the flow scores, the presence of each colored dot in the luteal structure was considered, and the percentage of

blood flow to each CL was subjectively estimated in relation to the total area of the CL. Based on CL luteal perfusion, each recipient was ranked from 1 to 3, as proposed by Pugliesi et al. [20]. Briefly, the presence of vascularization in up to 40% of the luteal area was considered a low score/I; the presence of vascularization in > 45% and < 50% of the luteal area was considered a medium score/II; and the presence of vascularization > 55% of the luteal area was considered a high score/III. Pregnancy was diagnosed using transrectal ultrasound at 30 days of gestation (day 23 after ET) and was repeated 60 days later to evaluate pregnancy loss from 30 to 90 days. Pregnancy was considered positive based on the presence of a conceptus with compatible gestational age and heartbeat.

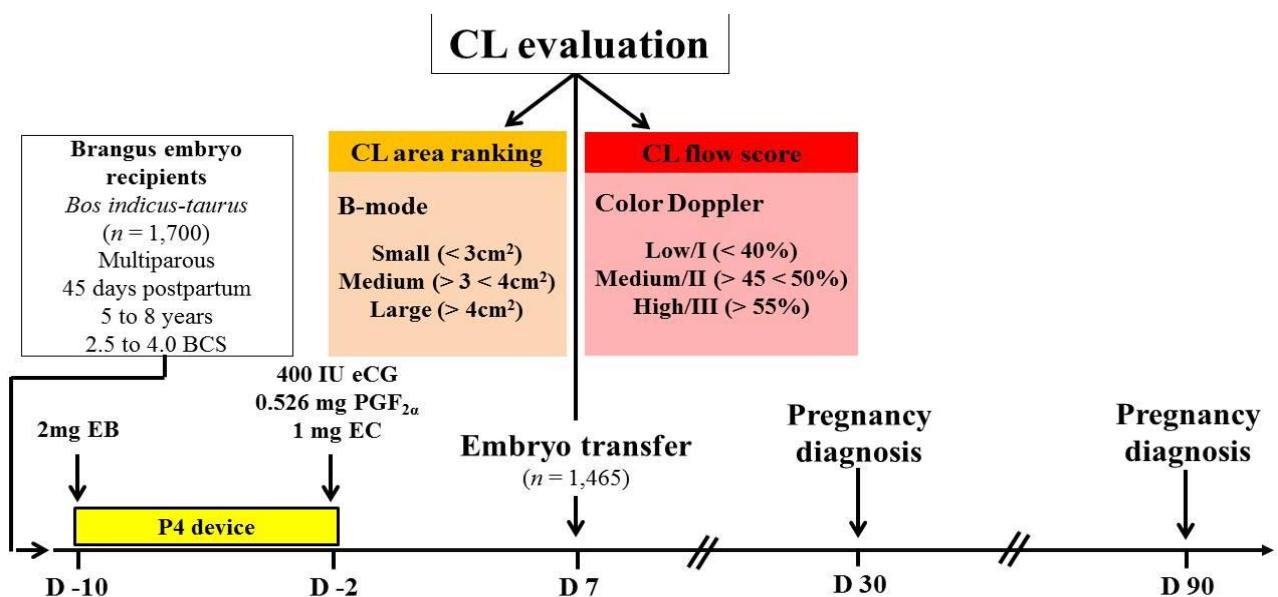


Fig. 1 - Scheme of the experimental design and fixed-time embryo transfer protocol used to evaluate the conception rate and occurrence of pregnancy loss in beef cattle according to corpus luteum (CL) area ranking and luteal blood perfusion score. Day (D), body condition score (BCS), and estradiol benzoate (EB), progesterone (P4), sodium d-cloprostetol (PGF_{2α}), equine chorionic gonadotropin (eCG), and estradiol cypionate (EC) levels.

2.4. Statistical analyses

For data analysis, the recipients were classified according to the CL area and luteal blood flow score. Considering the luteal area, CLs were ranked as small (area < 3 cm²), medium (area > 3 and < 4 cm²), and large (area > 4 cm²). Considering luteal blood flow, the CLs were ranked as low/I (perfusion area < 40% of the CL), medium/II (perfusion area >

45% and < 50% of the CL), and high/III (perfusion area > 55% of the CL). The conception rate and occurrence of pregnancy loss were analyzed using an adjusted logistic regression model in which the CL flow score and breeding season were considered categorical predictors, whereas the CL area and BCS were considered continuous predictors, in addition to all possible interactions. In the presence of a significant effect, the ranking between the groups was established using a 2×2 ratio test. For descriptive analysis, qualitative data were presented as percentages (%) and quantitative data as means and standard errors. All statistical analyses were performed using the Minitab® statistical program version 18.1. The level of significance ≤ 0.05 indicated an effect of categorical variables and their interactions, and the statistical tendency was considered when $P > 0.06$ and < 0.10 .

3. Results

At the first pregnancy diagnosis, the overall conception rate was 48.2% (707/1,465) and was not influenced by the CL area ranking ($P = 0.39$); however, a tendency ($P = 0.09$) to be influenced by the CL blood flow score was observed (Table 1). The factors controlled for in this study did not show significant interactions ($P > 0.1$) with conception at 30 days.

The final conception rate of the study was 44.2% (648/1,465) and was influenced by the luteal blood perfusion score ($P = 0.03$) but not by the CL area ranking ($P = 0.37$). Recipients with CL blood flow scores high (48.4%^a) and medium (44.6%^a) had higher conception rates/FTET scores than those with low blood perfusion scores (37.8%^b; Table 1). The CL area ranking did not differ among females with small (46.4%), medium (45.2%), or large (41.8%) CL. There was no interaction between the luteal blood flow score and CL area ranking ($P = 0.81$). BCS ($P = 0.51$), breeding season ($P = 0.34$), and possible interactions with flow score and/or CL area ranking did not affect ($P > 0.1$) the conception rate in the present study.

Considering the occurrence of pregnancy loss for up to 90 days, there was no effect on CL area ranking ($P = 0.77$); however, the luteal flow score showed a significant effect ($P = 0.04$; Figure 2). Recipients with high CL flow scores (3.6%^b) had lower pregnancy losses than those with low (10.3%^a) or medium (9.3%^a) scores. None of the factors (luteal flow score, CL area ranking, breeding season, or BCS) had a significant interaction ($P > 0.1$) in the pregnancy loss analyses.

Table 1. Influence of corpus luteum (CL) area/size (small < 3 cm²; medium > 3 and < 4 cm²; and large > 4 cm²) and blood flow score (low/I < 40% of CL; medium/II > 45% and < 50% of CL; and high/III > 55% of CL) on the conception rate in Brangus embryo recipients submitted to a fixed-time embryo transfer (FTET) program.

	Factors from CL	Animals		Conception to 30 days	Conception to 90 days
		n	Mean/score	% (n)	% (n)
Area ranking	Small	317	2.63 ± 0.01	50.5 (160)	46.4 (147)
	Medium	610	3.44 ± 0.01	49.0 (299)	45.2 (276)
	Large	538	4.77 ± 0.03	46.1 (248)	41.8 (225)
	<i>Total/P-value</i>	1,465	-	0.39	0.37
Flow score	Low	230	I	42.2 ^b (97)	37.8 ^b (87)
	Medium	958	II	49.2 ^{ab} (471)	44.6 ^a (427)
	High	277	III	50.2 ^a (139)	48.4 ^a (134)
	<i>Total/P-value</i>	1,465	-	0.09	0.03
<i>Interaction</i>		-	-	0.61	0.81

Different letters ^(a-b) for the same variable indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

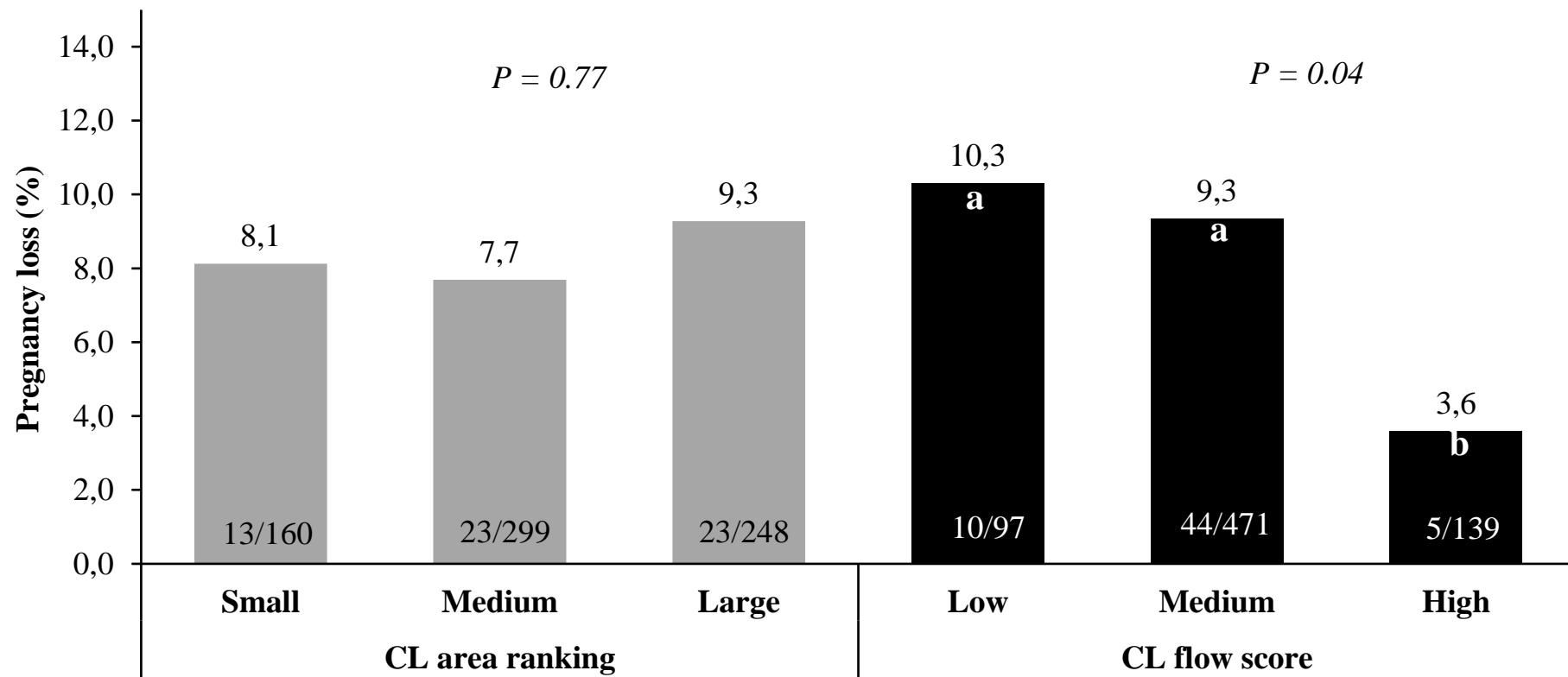


Fig. 2 - Influence of corpus luteum (CL) area/size (small $< 3 \text{ cm}^2$; medium > 3 and $< 4 \text{ cm}^2$; and large $> 4 \text{ cm}^2$) and blood flow score (low/I $< 40\%$ of CL; medium/II $> 45\%$ and $< 50\%$ of CL; and high/III $> 55\%$ of CL) on the occurrence of pregnancy loss in Brangus embryo recipients submitted to a fixed-time embryo transfer (FTET) program.
Different letters ^(a-b) indicate statistical differences ($P < 0.05$) between different blood flow scores.

4. Discussion

The present study aimed to make a practical evaluation of the use of color Doppler ultrasonography to improve gestational success, considering its accuracy in the selection of embryo recipients for a large-scale FTET program. The results of the study revealed that the conception rate and occurrence of pregnancy loss did not depend on CL area/size, wherein small, medium, and large CLs resulted in similar indexes. However, the luteal blood flow score, as assessed using color Doppler ultrasonography, was more effective in increasing the conception rate when FTET was performed in recipients with medium-to-high flow scores. Furthermore, this study revealed that ET in recipients with a high flow score reduced the occurrence of pregnancy loss up to 90 days by more than 6.5% compared with those with a low flow score. Therefore, our study reinforces the concept that luteal activity assessed using blood flow scores is more important than CL size, in addition to highlighting the importance of prioritizing embryo transfer in recipients with high luteal blood perfusion, not only to increase gestational success but also to reduce the occurrence of pregnancy losses.

Although reproductive programs in cattle have advanced substantially [2, 5, 33-35], in practice, most ET procedures in large-scale commercial programs are performed by selecting a recipient containing at least one CL at the time of embryo transfer, regardless of the size or luteal activity [4, 10, 24]. However, in addition to embryonic quality, gestational success in FTET programs is highly dependent on the quality and activity of the CL, which secretes adequate concentrations of P4 [27], essential for maintaining the uterine environment, success in maternal recognition, and embryonic development [28]. In this context, it is worth noting that recipients that did not respond to the FTET protocol (without CL) were excluded from this study. Therefore, only recipients with CL were considered in our analyzes, regardless of size or luteal activity.

In our study, the CL area (small, medium, or large) did not affect the conception rate of the recipients at either 30 or 90 days. On the other hand, luteal activity monitored during ET showed that recipients with a high blood flow score (> 55% of the CL area) had a conception rate 10% higher than those with a low blood flow score at 90 days of gestation. Therefore, our results reinforce the

hypothesis that the choice of the recipient at the time of ET is based more on the luteal activity than on the CL size.

The use of a subjective scale to assess luteal blood perfusion can be considered a limitation of this study. In practical aspects, score I (< 40% of CL) and III (> 55% of CL) hardly raises doubts in the evaluator but score II (> 45 and < 50% of CL) may be less precise. Accuracy is higher with the use of software or ultrasound resources for image editing and determination of the proportion of CL vascularization, as demonstrated by Bonato et al. [36]. However, the demand for time would be a limitation for large-scale programs as it was in this study. Furthermore, the use of this scale is reasonable since grades II and III did not differ in terms of conception rate at 30 and 90 days post ET, in addition to practicality for large-scale use, which demonstrates a certain reliability as reported [20, 22, 24, 28, 36].

The relationships among luteal flow activity, fertility, and reproductive success have been reported in several studies involving timed artificial insemination and FTET programs [20-24]. Similar results were initially reported by Pugliesi et al. [20] who evaluated 444 *Bos indicus* × *Bos taurus* crossbred recipients (cows and heifers). In this case, the authors showed that pregnancy per ET increased in recipients with a high degree of luteal perfusion compared with those with a low score [high, 58.4%^a (80/137); medium, 54.1%^{ab} (93/172); and low, 45.9%^b (62/135)]. Similarly, the CL size did not affect pregnancy per transfer [small, 49% (76/155); medium, 59.7% (83/139); and large, 50.7% (75/148); $P > 0.1$]. We found similar results for pregnancy rates with a large number of animals, also revealing that medium- and high-flow recipients had greater gestational success than low-flow recipients. Similarly, in recipients who received distinct gonadotropin stimulation during the FTET protocol, gestational success was more affected by the CL blood flow score than by CL dimensions (area, diameter, or perimeter) [24].

The most important novelty of our study is the evaluation of gestational loss from 30 to 90 days according to the CL size and blood flow. The area of the CL did not affect the occurrence of pregnancy loss, which varied slightly from 7.7 to 9.3 for medium and large CL, respectively. However, the ET in recipients with a high blood flow score reduced pregnancy loss by 6.7%, accounting for 10.3% of recipients with a low blood flow score to 3.6% of recipients with a high flow

score. This result is interesting because it reveals that we can strategically prioritize ET in recipients with high luteal activity not only to increase pregnancy/ET but also to reduce the occurrence of pregnancy loss in FTET programs.

Another important aspect of the present study is the benefits that can be achieved in FTET programs, mainly for IVEP. Currently, even with the evolution of processes involving *in vitro* production, pregnancy loss is relatively high, ranging from 10 to 40% of losses [29], with up to 80% of the gestational losses occurring up to the sixth week of gestation [29, 30]. Pregnancy loss has a multifactorial etiology, including causes related to management, nutrition, health, genetics, stress, and cellular programming [30, 37-39]. However, the methodology evaluated in this study reduced the occurrence of pregnancy loss by up to 90 days to an acceptable rate (< 5%) in most studies [29, 30, 40].

In addition, pregnancy loss achieved here is also consistent with the fact that larger CL vascularization areas are associated with greater luteal activity and higher serum P4 concentration [25, 26, 41], which have been associated with lower rates of early pregnancy loss and better reproductive performance [27, 42]. Although the present study did not evaluate P4 measurement, the conception and pregnancy loss observed here support the hypothesis that CL with superior Doppler score assessment result in higher conception rates and lower pregnancy loss, regardless of CL size.

5. Conclusions

Conception rate and the occurrence of pregnancy loss in large-scale FTET programs for beef cattle are related to the luteal blood perfusion score but not CL size. Thus, the use of color Doppler ultrasound in large-scale embryo recipient programs is a practical strategy for increasing reproductive efficiency.

Credit authorship contribution statement

Gustavo Martins Gomes dos Santos, José Henrique Ayres Dias, Ivis da Silva Dias: Conceptualization, Methodology, Investigation; **Luis Bortolassi Junior, Katia Cristina Silva-Santos:** Data Curation, Organization, First Draft,

Formal analysis, Interpretation, Writing - Review & Editing; **Marcelo Marcondes Seneda, Fábio Morotti:** Formal analysis, Interpretation, Funding Acquisition, Resources, Project Administration, Supervision, Writing - Review & Editing.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing interests.

Acknowledgments

The authors would like to thank Sheep Embryo Reprodução Animal, Brawir Genética Brangus, and Universidade Estadual de Londrina for their support in carrying out this study.

References

- [1] Smith MF, Geisert RD, Parrish JJ. Reproduction in domestic ruminants during the past 50 yr: discovery to application. *J Anim Sci* 2018;96:2952-70.
- [2] Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermilliod P, Ross PJ. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 2020;14:991-1004.
- [3] Pontes J, Nonato-Junior I, Sanches B, Ereno-Junior J, Uvo S, Barreiros T, et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 2009;71:690-7.
- [4] Pontes J, Sterza FM, Basso A, Ferreira C, Sanches B, Rubin K, et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 2011;75:1640-6.
- [5] Baruselli PS, Ferreira RM, Colli MHA, Elliff FM, Sá Filho MF, Vieira L, et al. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. *Anim Reprod* 2018;14:558-71.
- [6] Morotti F, Sanches BV, Pontes JH, Basso AC, Siqueira ER, Lisboa LA, et al. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology* 2014;81:696-701.
- [7] Bó GA, Cedeño A. Expression of estrus as a relevant factor in fixed-time embryo transfer programs using estradiol/progesterone-based protocols in cattle. *Anim Reprod* 2018;15:224-30.
- [8] Lovarelli D, Bacenetti J, Guarino M. A review on dairy cattle farming: Is precision livestock farming the compromise for an environmental, economic and social sustainable production? *J Clean Prod* 2020;262:121409.
- [9] Silva-Santos KC, Santos GM, Koetz Junior C, Morotti F, Siloto LS, Marcantonio TN, et al. Antral follicle populations and embryo production in vitro

- and in vivo of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. *Reprod Domest Anim* 2014;49:228-32.
- [10] Pellegrino CA, Morotti F, Untura RM, Pontes JH, Pellegrino MF, Campolina JP, et al. Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of in vitro-produced embryos in cattle. *Theriogenology* 2016;86:888-93.
- [11] Bó GA, Peres LC, Cutaia LE, Pincinato D, Baruselli PS, Mapletoft RJ. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *Reprod Fertil Dev* 2011;24:272-7.
- [12] Baruselli P, Ferreira R, Sales J, Gimenes L, Sá Filho M, Martins C, et al. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology* 2011;76:1583-93.
- [13] Randi F, Fernandez-Fuertes B, McDonald M, Forde N, Kelly AK, Bastos Amorin H, et al. Asynchronous embryo transfer as a tool to understand embryo-uterine interaction in cattle: is a large conceptus a good thing? *Reprod Fertil Dev* 2016;28:1999-2006.
- [14] Bényei B, Komlósi I, Pécsi A, Pollott G, Marcos CH, de Oliveira Campos A, et al. The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment. *Anim Reprod Sci* 2006;93:268-79.
- [15] Velho GDS, Rovani MT, Ferreira R, Gasperin BG, Dalto AGC. Blood perfusion and diameter of bovine corpus luteum as predictors of luteal function in early pregnancy. *Reprod Domest Anim* 2022;57:246-52.
- [16] Nogueira É, Cardoso GS, Marques Junior HR, Dias AM, Ítavo LCV, Borges JC. Effect of breed and corpus luteum on pregnancy rate of bovine embryo recipients. *Rev Bras de Zootec* 2012;41:2129-33.
- [17] Gonella-Diaza A, Holguín G, Montaña D, Valbuena D. Corpus luteum diameter and embryo developmental stage are associated with pregnancy rate: data analysis from 17,521 embryo transfers from a commercial in vitro bovine embryo production program. *Anim Reprod* 2018;10:106-11.
- [18] Thomson SP, Holmes RJ, Landes PT, Allworth MB. Assessment and selection of the recipient cows' corpus luteum at the time of embryo transfer, and its influence on conception rate. *Aust Vet J* 2021;99:288-92.
- [19] Spell AR, Beal WE, Corah LR, Lamb GC. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology* 2001;56:287-97.
- [20] Pugliesi G, de Melo GD, Silva JB, Carvalhêdo AS, Lopes E, de Siqueira Filho E, et al. Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. *Theriogenology* 2019;135:73-9.
- [21] Kanazawa T, Seki M, Ishiyama K, Kubo T, Kaneda Y, Sakaguchi M, et al. Pregnancy prediction on the day of embryo transfer (Day 7) and Day 14 by measuring luteal blood flow in dairy cows. *Theriogenology* 2016;86:1436-44.
- [22] Pugliesi G, de Melo GD, Ataíde GA, Jr., Pellegrino CAG, Silva JB, Rocha CC, et al. Use of Doppler ultrasonography in embryo transfer programs: feasibility and field results. *Anim Reprod* 2018;15:239-46.
- [23] Pinaffi FL, Santos ÉS, Silva MGd, Maturana Filho M, Madureira EH, Silva LA. Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle. *Pesq Vet Bras* 2015;35:470-6.

- [24] Rossignolo EAA, da Silva NC, Stolf RL, Cavalieri FLB, Colombo AHB, Andreatti MA, et al. Evaluation of hCG as gonadotropic support to timed embryo transfer protocol in beef cattle. *Theriogenology* 2023;195:24-30.
- [25] Gómez-Seco C, Alegre B, Martínez-Pastor F, Prieto J, González-Montaña JR, Alonso M, et al. 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. *Vet Res Commun* 2017;41:183-8.
- [26] Vrisman DP, Bastos NM, Rossi GF, Rodrigues NN, Borges LPB, Taira AR, et al. Corpus luteum dynamics after ovulation induction with or without previous exposure to progesterone in prepubertal Nellore heifers. *Theriogenology* 2018;106:60-8.
- [27] Mann GE, Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction (Cambridge, England)* 2001;121:175-80.
- [28] Fontes PL, Oosthuizen N. Applied use of Doppler ultrasonography in bovine reproduction. 2022.
- [29] Ealy AD, Wooldridge LK, McCoski SR. BOARD INVITED REVIEW: Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. *J Anim Sci* 2019;97:2555-68.
- [30] Reese ST, Franco GA, Poole RK, Hood R, Fernandez Montero L, Oliveira Filho RV, et al. Pregnancy loss in beef cattle: A meta-analysis. *Anim Reprod Sci* 2020;212:106251.
- [31] Lowman B, Scott N, Somerville S. Condition scoring of cattle, revised edition. East of Scotland College of Agriculture. Bulletin no 1976;6.
- [32] Stringfellow DA, Givens M. Manual of the international embryo transfer society (IETS). 4th ed. Champaign, IL: IETS. ed: The Society; 2010.
- [33] Stevenson J, Britt J. A 100-Year Review: Practical female reproductive management. *J Dairy Sci* 2017;100:10292-313.
- [34] Mapleton RJ, Bó GA, Baruselli PS, Menchaca A, Sartori R. Evolution of knowledge on ovarian physiology and its contribution to the widespread application of reproductive biotechnologies in South American cattle. *Anim Reprod* 2018;15:1003-14.
- [35] Mikkola M, Hasler JF, Taponen J. Factors affecting embryo production in superovulated Bos taurus cattle. *Reprod Fertil Dev* 2020;32:104-24.
- [36] Bonato DV, Ferreira EB, Gomes DN, Bonato FGC, Droher RG, Morotti F, et al. Follicular dynamics, luteal characteristics, and progesterone concentrations in synchronized lactating Holstein cows with high and low antral follicle counts. *Theriogenology* 2022;179:223-9.
- [37] Aono F, Cooke RF, Alfieri A, Vasconcelos JLM. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of beef cows submitted to fixed-timed AI in Brazilian cow-calf operations. *Theriogenology* 2013;79:242-8.
- [38] Junqueira RC, C de Freitas J, F Alfieri A, A Alfieri A. Reproductive performance evaluation of a beef cattle herd naturally infected with the BoHV-1, BVDV and Leptospira hardjo. *Semina Ci. agr.* 2006;471-80.
- [39] Diskin M, Waters S, Parr M, Kenny D. Pregnancy losses in cattle: potential for improvement. *Reprod Fertil Dev* 2016;28:83-93.

- [40] Fernandez-Novo A, Pérez-Garnelo SS, Villagrá A, Pérez-Villalobos N, Astiz S. The Effect of Stress on Reproduction and Reproductive Technologies in Beef Cattle—A Review. *Animals* 2020;10:2096.
- [41] Siqueira LG, Areas VS, Ghetti AM, Fonseca JF, Palhao MP, Fernandes CA, et al. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2013;96:6461-72.
- [42] Ledoux D, Ponsart C, Grimard B, Gatien J, Deloche MC, Fritz S, et al. Sire effect on early and late embryonic death in French Holstein cattle. *Animal* 2014;9:766-74.

6. Considerações finais

- O CL foi classificado em pequeno, médio e grande em relação à sua área (cm^2) e não houve relação com a taxa de concepção, mas houve interação em relação à menor ocorrência de perda gestacional;
- A perfusão sanguínea luteal foi classificada em baixa (< 40%), média (> 45% < 50%) e alta (> 50%) sendo os CL's de média e alta perfusão luteal com maiores taxas de concepção e menor perda gestacional;
- Não houve relação entre taxas de concepção e de perda gestacional dos 30 e 90 dias em receptoras de embrião considerando o tamanho do CL, mas em relação à perfusão sanguínea as receptoras com CL de média e alta perfusão têm maior taxa de concepção e menor perda gestacional.