



Ultrassonografia Doppler de corpos lúteos em éguas com ovulação induzida

[*Doppler ultrasonography of corpus luteum in mares with induced ovulation*]

"Artigo Científico/Scientific Article"

Victor Netto **Maia**¹, André Mariano **Batista**², Sylvio **Cunha Neto**³, Diogo Manoel Farias **Silva**⁴,
Aurea **Wischrhal**^{2*}

¹Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE), Garanhuns-PE, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil.

³Médico-veterinário autônomo.

⁴Centro Universitário Maurício de Nassau (UNINASSAU), Recife-PE, Brasil.

*Autora para correspondência/Corresponding Author: E-mail: aurea.wischrhal@gmail.com

Resumo

Neste trabalho objetivou-se avaliar o padrão de vascularização luteal em éguas com ovulação induzida com acetato de deslorelina e sua relação com concentrações séricas de progesterona. Foram utilizadas éguas (n=5), com ovulação natural (GC) e induzida com 750 µg de acetato de deslorelina (GT). Os corpos lúteos (CL) foram analisados nos dias 4, 8 e 12 após a ovulação, usando ultrassonografia com Doppler colorido. A concentração de progesterona foi analisada por ensaio imunoenzimático (ELISA), nos mesmos dias das avaliações dos CLs. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos (GC x GT), em relação ao percentual de vascularização dos CLs avaliados nos dias 4 e 8 pós-ovulação. Entretanto, foi observado menor ($P < 0,05$) padrão de vascularização dos CLs no dia 12, quando comparado aos dias 4 e 8, nas fêmeas do grupo tratado com deslorelina. As concentrações de progesterona obtidas nos grupos GC e GT não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ou entre os dias 4, 8 e 12 após a ovulação ($P > 0,05$). Além disso, nenhuma correlação foi encontrada entre o padrão de vascularização e as concentrações de progesterona nos diferentes grupos ($r = -0,067$; $P = 0,09$). Conclui-se que a indução da ovulação com acetato de deslorelina não afetou os níveis de progesterona nos dias 4, 8 e 12 após a ovulação, porém promoveu redução no padrão de vascularização no dia 12 após a ovulação. Além disso, não houve correlação entre o padrão de vascularização luteal e a concentração de progesterona nas éguas avaliadas.

Palavras-chave: equino; deslorelina; progesterona; vascularização.

Abstract

This study aimed to evaluate the pattern of luteal vascularization in mares with induced ovulation using deslorelin acetate and its relationship with serum progesterone concentrations. Mares (n = 5) were used, with natural ovulation (GC) and ovulation induced with deslorelin acetate (GT). The corpus luteum (CL) were analyzed on days 4, 8 and 12 after ovulation, using color Doppler ultrasonography. The progesterone concentration was analyzed by enzyme immunoassay, on the same days that CLs were evaluated. There were no significant differences ($P > 0.05$) between groups (CG x GT), in relation to the percentage of vascularization of the CLs evaluated on days 4, 8 and 12 post-ovulation. However, a lower ($P < 0.05$) pattern of vascularization of the CLs was observed on day 12, when compared to days 4 and 8, in the group treated with deslorelin. The progesterone concentrations obtained in the GC and GT groups did not show significant differences between the groups or between days 4, 8 and 12 after ovulation ($P > 0.05$). In addition, no correlation was found between the pattern of vascularization and the concentrations of progesterone in the different groups ($r = -0.067$; $P = 0.09$). It can be concluded that the induction of ovulation with deslorelin acetate did not affect progesterone levels on days 4, 8 and 12, after ovulation, but promoted a reduction in the vascular pattern on day 12 after ovulation. In addition, there was no correlation between the pattern of luteal vascularization and progesterone concentrations in the evaluated mares.

Keywords: equine; deslorelin; progesterone; blood flow.

Recebido 02 de junho de 2020. Aceito 25 de fevereiro de 2022.

DOI: <https://doi.org/10.26605/medvet-v16n1-3577>

Introdução

Uma vez que a utilização comercial da Inseminação Artificial (IA) e da Transferência de Embriões (TE) tem se tornado cada vez mais comum na reprodução de equinos, consideráveis esforços têm sido feitos para otimizar o manejo reprodutivo e melhorar a aplicação destas técnicas de reprodução assistida nesta espécie (Squires, 2020).

Por ter como uma de suas principais características reprodutivas um estro longo, a capacidade de induzir a ovulação, de forma confiável, é de fundamental importância para a reprodução assistida em éguas. Neste contexto, o acetato de deslorelina, agonista do hormônio liberador de gonadotrofina, tem sido utilizado como indutor de ovulação (Kwong et al., 2019). O mecanismo de ação do acetato de deslorelina é a estimulação das células da hipófise para sintetizar e liberar o hormônio luteinizante (LH), o qual subsequentemente se liga aos receptores de LH no ovário e induz a maturação folicular, ovulação e formação do corpo lúteo (CL) (Ferris et al., 2012).

O uso de técnicas que permitam a compreensão da fisiologia e morfologia do CL, formado após a ovulação, é uma importante ferramenta de apoio para avaliação e seleção de receptoras aptas e com elevada chance de levar a gestação a termo. De preferência, a adequada função do CL deve ser avaliada pela mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona P_4 ($\geq 2,0$ ng/mL). Na prática, no entanto, a P_4 é raramente mensurada devido ao custo e à demora para obter os resultados (Bollwein et al., 2002a).

Com a evolução tecnológica, o uso da ultrassonografia com Doppler colorido vem crescendo cada vez mais e elucidando questões que a ultrassonografia convencional não nos permite responder. A técnica é efetiva, prática, não invasiva e permite, em tempo real, uma avaliação da perfusão vascular do trato reprodutivo, principalmente ovários e suas estruturas (em éguas - Ginther et al., 2006; Palmer et al., 2006; em vacas - Tarso et al., 2017), dando a possibilidade de uma avaliação mais precisa e consequente aumento nos índices de sucesso reprodutivo.

A relação entre fluxo de sangue luteal e produção de P_4 durante o ciclo estral, em éguas, foi demonstrada por Ginther et al. (2007) e Bollwein et al. (2002b). Ambos os estudos mencionaram que a vascularização do CL reflete de forma confiável os níveis de P_4 . Assim, o padrão de vascularização do CL, obtido pela ultrassonografia com Doppler

colorido, pode ser uma ferramenta de avaliação e/ou escolha de receptoras em programas comerciais de transferência de embriões em éguas.

Neste trabalho objetivou-se avaliar, por meio da ultrassonografia com Doppler colorido, o padrão de vascularização luteal em éguas com ovulação induzida com acetato de deslorelina e sua relação com concentrações séricas de progesterona.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no haras Massaroca, localizado em Camaragibe, Pernambuco (08°01'18" S e 34°58'52" O), nos meses de janeiro a abril. Foram utilizadas éguas ($n = 5$), sem raça definida, múltiparas, ciclando regularmente, com idade variando entre 3 e 14 anos, e peso entre 380-450 kg.

As éguas foram mantidas em piquetes abertos com pasto composto por capim Tifton (*Cynodon* spp.), recebendo 2 Kg/dia de concentrado comercial para éguas em reprodução, além de água e sal mineral *ad libitum*. Antes do início do experimento, os animais foram submetidos à avaliação clínico-ginecológica, além de vermifugação.

Para determinar o início da apresentação dos sinais externos de estro, as éguas foram expostas diariamente a um rufião. A partir do primeiro sinal indicativo de estro (micção frequente e exposição de clitóris na presença do garanhão), foram realizados exames ultrassonográficos Modo B, diariamente pela via retal, utilizando aparelho de ultrassom (M5-VET; Mindray, China), equipado com transdutor linear de 6,5 MHz. A partir da detecção de, pelo menos, um folículo ≥ 35 mm durante o estro, as éguas do grupo GT receberam 750 μ g de acetato de deslorelina (Sincrorrelin[®], Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, SP) por via intramuscular. A partir da existência de folículos ≥ 35 mm, todas as éguas foram submetidas ao acompanhamento diário da dinâmica ovariana até a ovulação induzida (Grupo GT) ou espontânea (Grupo GC- sem receber qualquer tratamento). O experimento foi realizado com cada égua sendo utilizada duas vezes, primeiro no grupo controle e depois no tratado, seguindo um modelo experimental tipo crossover.

Tendo como base o dia da ovulação (D0), exames ultrassonográficos, com Doppler colorido, do CL foram realizados nos dias 4, 8 e 12 após a ovulação, pela via retal. O modo Doppler colorido foi utilizado para obter os sinais de fluxo sanguíneo nos vasos do CL. Após a identificação, o CL foi

escaneado lentamente em toda a sua extensão, obtendo-se a gravação do exame para análise posterior.

A análise do padrão de vascularização dos CLs foi baseada no percentual de área do parênquima luteal contendo sinais coloridos, de acordo com modelo descrito por Ginther et al. (2007). Toda a extensão do parênquima luteal foi avaliada nas imagens capturadas e o percentual de vascularização foi obtido, considerando o total da área do parênquima que apresentou vascularização. Para evitar divergência, todas as mensurações foram avaliadas pela mesma pessoa.

Foram coletadas amostras de sangue da veia jugular com agulhas descartáveis acopladas a tubos a vácuo, sem anticoagulante (Becton Dickinson, England). As amostras foram colhidas, imediatamente antes dos exames ultrassonográficos, e encaminhadas para o laboratório onde foram centrifugadas ($1.200 \times g/10$ min.) e o soro foi armazenado a -20°C , até a realização da análise. As concentrações de progesterona foram determinadas pelo método de enzimmunoensaio (ELISA), com o uso do kit comercial (DBC - Diagnostics Biochem Canadá, Ontário - Canadá), seguindo o protocolo do fabricante. A sensibilidade do teste foi de $0,1 \text{ ng/mL}$ e o coeficiente de variação intra-ensaio de $3,2\%$.

Os dados que não foram normalmente distribuídos, de acordo com o teste Kolmogorov-Smirnov, foram transformados em logaritmo natural ou raiz quadrada. Todos os dados foram analisados por one-way ANOVA, e se algum efeito de grupo ou tempo foi significativo ou próximo da significância, os dados foram examinados pelo teste de Tukey (SAS version 9.2; SAS Institute, Cary, NC, USA). A correlação entre as variáveis (progesterona e vascularização) foi determinada pelo teste de Spearman. Diferença significativa foi indicada por probabilidade de $P \leq 0,05$ e probabilidades entre $P > 0,05$ e $P \leq 0,1$ indicaram que a diferença se aproximou da significância (tendência). Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média.

Resultados e Discussão

Mediante a avaliação clínica e ginecológica dos animais utilizados neste estudo, pôde-se constatar a normalidade anatômica e da ciclicidade reprodutiva, considerando-se que todas as éguas estavam saudáveis.

Os resultados do presente experimento demonstraram que a administração de acetato de deslorelina foi capaz de induzir ovulação, no período esperado, em todas as éguas tratadas, corroborando os achados de Ferris et al. (2012), os quais afirmaram que o uso de acetato de deslorelina é efetivo na indução da ovulação em tempo fixo em éguas.

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos (GC x GT), em relação ao percentual de vascularização dos CLs avaliados nos dias 4, 8 e 12 pós-ovulação. Entretanto, foi observado menor ($P < 0,05$; Figuras 1 e 2) percentual de vascularização dos CLs no dia 12, quando comparado aos dias 4 e 8, nas fêmeas do grupo tratado com deslorelina, sugerindo que a aplicação de deslorelina tenha efeito na vascularização do CL maduro.

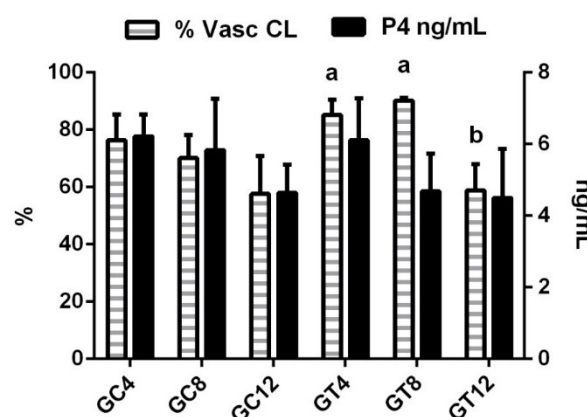


Figura 1. Média e erro padrão da média do percentual de vascularização do corpo lúteo (% Vasc. CL) e níveis de progesterona sérica (P4 ng/mL), conforme o tipo de ovulação e dia de avaliação. GC = ovulação natural; GT = ovulação induzida. Dias 4, 8 e 12 após a ovulação. a,b = letras diferentes entre colunas do mesmo grupo significa diferença estatística ($P < 0,05$).

Estudos anteriores mostraram que os CLs em éguas apresentam aumento na vascularização durante o período de sua formação, entres os dias 0 a 8 (Alonso et al., 2019), enquanto a máxima vascularização foi atingida, entre os dias 6 e 8 após a ovulação, momento em que também é observada a máxima concentração de progesterona (Bollwein et al., 2002a; Ginther et al., 2007). Estes achados reforçam os resultados deste estudo, no qual não foi observada diferença no percentual de vascularização dos CLs entre os dias 4 e 8, provavelmente porque a estrutura vascular dos CLs

analisados já estaria definida no dia 4 pós-ovulação, primeiro dia avaliado neste experimento.

Por outro lado, a redução da vascularização no D12, observada no grupo tratado com acetato de deslorelina, diferem dos achados de Alonso et al. (2019), que relataram decréscimo da

vascularização do CL a partir do dia 13, e dos relatados por Ginther et al. (2007), os quais observaram queda lenta no período luteolítico (entre os dias 15 e 17 pós ovulação), ocorrendo em paralelo com a diminuição da concentração de progesterona.

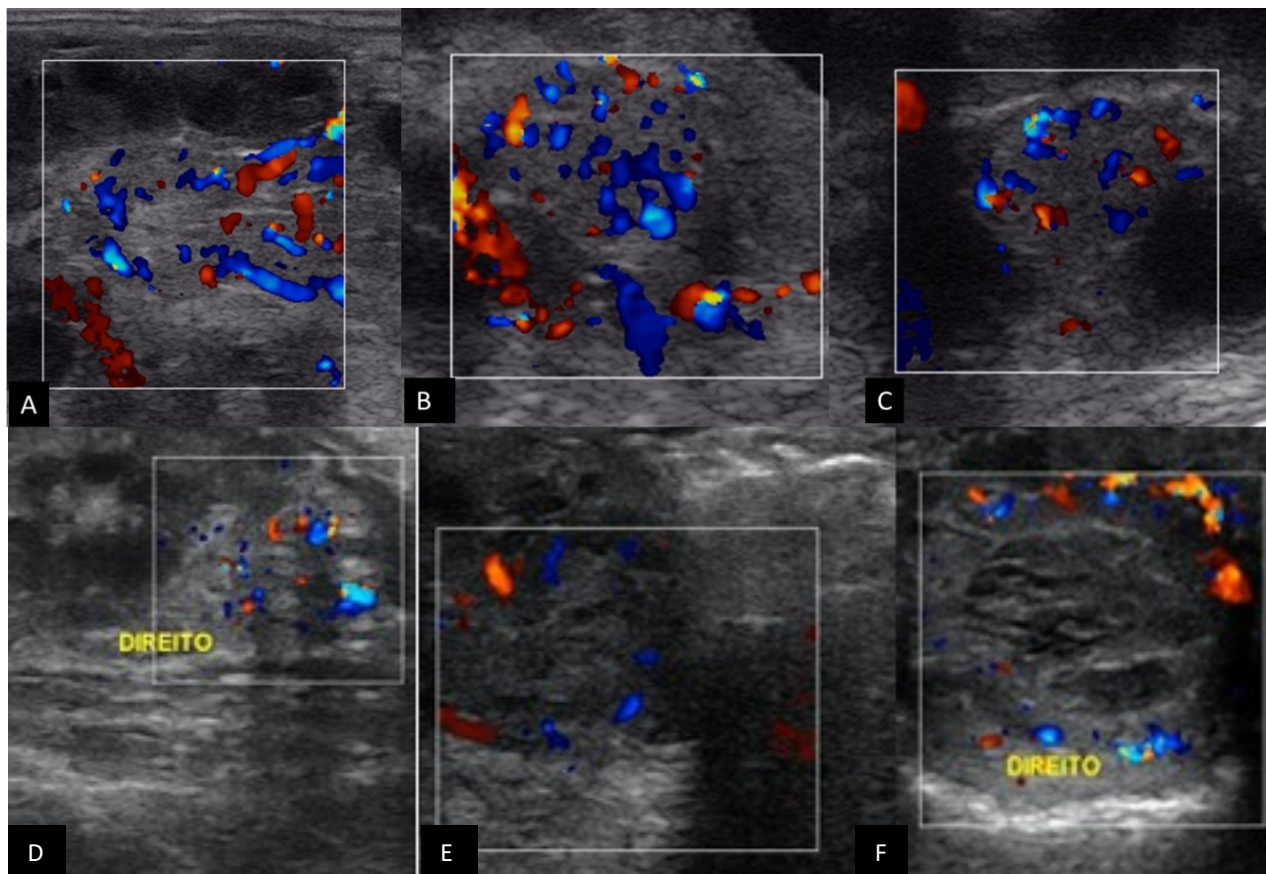


Figura 2. Imagens representativas do padrão de vascularização do corpo lúteo de éguas, avaliadas por ultrassonografia com Doppler colorido, nos dias 4 (A e D), 8 (B e E) e 12 (C e F), após a ovulação induzida pelo uso de acetato de deslorelina. (A, B, C) ou ovulação espontânea (D, E, F).

Nas condições deste experimento, não é possível inferir que aqueles CLs com menor percentual de vascularização observado no dia 12, nas fêmeas do grupo tratado, sejam funcionais por menor tempo, do que os resultantes da ovulação natural, principalmente porque não houve diferença na produção de progesterona ou nos percentuais de vascularização observados entre os grupos no período estudado.

As concentrações de progesterona obtidas nos grupos GC e GT, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ou entre os dias 4, 8 e 12 após a ovulação ($P > 0,05$; Figura 1). Tem sido demonstrado que as concentrações de progesterona aumentam gradativamente após a ovulação, atingindo níveis entre 1,5 a 2,5 ng/mL, no período de 24 horas e 2,5 a 5,0 ng/mL em 48 horas, após a ovulação, atingindo pico (8 a 20 ng/mL) entre os

dias 5 e 8 pós-ovulação. Estes níveis mantêm-se altos até o início da luteólise, ao redor dos dias 14 e 15 (LeBlanc et al., 2003). Contudo, como demonstrado no presente estudo, as concentrações de progesterona sérica não apresentaram variações significativas entre os dias 4 e 12, após a ovulação corroborando os achados de Slough et al. (2011). A determinação em apenas 3 momentos a cada 4 dias pode ter levado ao resultado diferente do que foi observado por Abdelnaby e Abo El-Maaty (2017), que encontraram níveis de progesterona maiores no dia 10 do que no dia 1 após ovulação.

A ultrassonografia com Doppler colorido tem sido considerada um método útil, não invasivo para avaliação do fluxo sanguíneo luteal (Bollwein et al., 2002a). Além disso, foi relatado que as concentrações plasmáticas de progesterona e o fluxo sanguíneo ovariano foram positivamente

correlacionados (Bollwein et al., 2002a,b). No presente estudo, nenhuma correlação foi encontrada entre o percentual de vascularização e as concentrações de progesterona nos diferentes grupos ($r = -0,067$; $P = 0,09$). Uma fraca correlação entre o fluxo sanguíneo do corpo lúteo e a concentração de progesterona, também foi observada em éguas prenhes ou não (Šichtař et al., 2013). Estas diferenças observadas nos estudos estão provavelmente relacionadas com a metodologia utilizada para a análise da vascularização luteal, bem como as variações individuais e o número de animais avaliados.

Conclusão

A indução da ovulação com acetato de deslorelina não afetou os níveis de progesterona nos dias 4, 8 e 12, após a ovulação, porém promoveu redução no percentual de vascularização no dia 12 após a ovulação. Além disso, não houve correlação entre o percentual de vascularização luteal e as concentrações de progesterona, nas éguas avaliadas.

Conflito de Interesse

Os autores declaram não existir conflito de interesse.

Comitê de Ética

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob licença nº 063/2014/CEUA.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe) pela concessão de bolsa de estudos para realização desta pesquisa.

Referências

Abdelnaby, E.A.; Abo El-Maaty, A.M. Luteal blood flow and growth in correlation to circulating angiogenic hormones after spontaneous ovulation in mares. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, 20(2): 97-109, 2017.

Alonso, M.A.; Silva, L.A.; Affonso, F.J.; Lemes, K.M.; Celeghini, C.C.C.; Lançoni, R.; Carvalho, H.F.; Arruda, R.P. Effect of hCG application at different moments of the estrous cycle on corpus luteum and uterine vascularization and serum progesterone

concentration in mares. **Animal Reproduction**, 16(2): 317-327, 2019.

- Bollwein, H.; Weber, F.; Kolberg, B.; Stolla, R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, 57(8): 2129-2138, 2002a.
- Bollwein, H.; Mayer, R.; Weber, R.; Stolla, R. Luteal blood flow during estrous cycle in mares. **Theriogenology**, 65(8): 2043-2051, 2002b.
- Ferris, R.A.; Hatzel, J.N.; Lindholm, A.R.G.; Scofield, D.B.; Mcue, P.M. Efficacy of deslorelin acetate (SucroMate) on induction of ovulation in American Quarter horse mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, 32(5): 285-288, 2012.
- Ginther, O.J.; Utt, M.D.; Bergfelt, D.R.; Beg, M.A. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. **Animal Reproduction Science**, 95(1-2): 144-150, 2006.
- Ginther, O.J.; Gastal, E.L.; Gastal, M.O.; Utt, M.; Beg, M.A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, 99(1-2): 213-220, 2007.
- Kwong, G.P.S.; Klein, C.; Adams, C. Allison, M.; Armstrong, L.; Bartier, A.; Bowal, J.; Brandt, C.; Denny, E.; Toit, L. du; Glassman, A.; Ho, T.; Kearns, K.; Kolodziej, E.; Lakhdhir, S.; Landsbergen, T.; Maloney, T.; Matejka, C.; McKay, L.; Murphy, T.; Nicholas, C.; Patterson, M.; Pierse, G.; St. Louis, M.; Stefanyshyn, C.; Steinmann, M.; Tees, R.; Wells, S.; Whitelaw, A. Deslorelin and naltrexone stimulate follicular development in mares during autumn transition and early anestrus. **Canadian Veterinary Journal**, 60(8): 855-858, 2019.
- LeBlanc, S.J.; Duffield, T.F.; Leslie, K.E.; Bateman, K.G.; Keefe, G.P.; Walton, J.S.; Johnson, W.H. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 85(9): 2223-2236, 2003.
- Palmer, E.; Chavatte-Palmer, P.; Verdonck, E. Field trial of Doppler ultrasonography of the preovulatory follicle in the mare. **Animal Reproduction Science**, 94(1): 182-185, 2006.
- Šichtař, J.; Rajmon, R.; Hořková, K.; Řehák, D.; Vostrý, L.; Härtlová, H. The luteal blood flow, area and pixel intensity of corpus luteum, levels of progesterone in pregnant and nonpregnant mares in the period of 16 days after ovulation.

Czech Journal of Animal Science, 58(11): 512-519, 2013.

Slough, T.L.; Rispoli, L.A.; Carnevale, E.M.; Niswender, G.D.; Bruemmer, J.E. Temporal gene expression in equine corpora lutea based on serial biopsies *in vivo*. **Journal of Animal Science**, 89(2): 389-396, 2011.

Squires, E. Current reproductive technologies impacting equine embryo production. **Journal**

of Equine Veterinary Science, 89: 102981, 2020.

Tarso, S.G.S.; Gastal, G.D.A.; Bashir, S.T.; Gastal, M.O.; Apgar, G.A.; Gastal, E.L. Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. **Reproduction, Fertility and Development**, 29(3): 448-457, 2017.