

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS

LEANDRO BECALETE RIZZONI

CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS DE ESTRUTURAS OVARIANAS E
DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO EM OVELHAS

Alfenas – MG

2018

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
LEANDRO BECALETE RIZZONI

CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS DE ESTRUTURAS OVARIANAS E
DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO EM OVELHAS

Tese apresentada à Universidade José do Rosário Vellano, como parte das exigências do Doutorado em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Pereira Neves

Alfenas – MG

2018

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Biblioteca Central da UNIFENAS

Rizzoni, Leandro Becatele

Características morfofuncionais de estruturas ovarianas e diagnóstico precoce de gestação em ovelhas. — Leandro Becatele Rizzoni. — Alfenas, 2018.
68 f.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Pereira Neves

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2018.

1. Fluxo sanguíneo 2. Luteogênese 3. Luteólise 4. Progesterona
5. Ovinos I. Universidade José do Rosário Vellano II. Título

CDU 591.366:636.3(043)

Samira Vidal da Silva Ramos
CRB6 3474



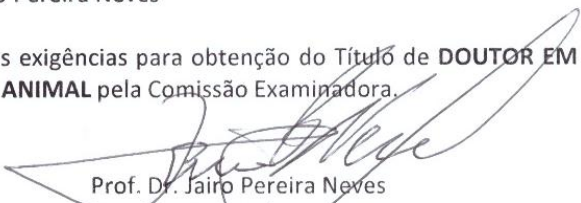
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS DE ESTRUTURAS OVARIANAS E DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO EM OVELHAS".

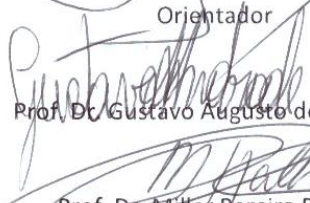
Autor: Leandro Becalete Rizzoni

Orientador: Prof. Dr. Jairo Pereira Neves

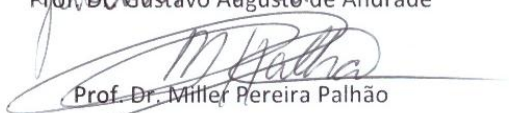
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **DOUTOR EM REPRODUÇÃO, SANIDADE E BEM-ESTAR ANIMAL** pela Comissão Examinadora.



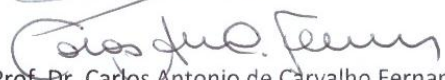
Prof. Dr. Jairo Pereira Neves
Orientador



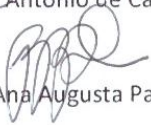
Prof. Dr. Gustavo Augusto de Andrade



Prof. Dr. Miller Pereira Palhão

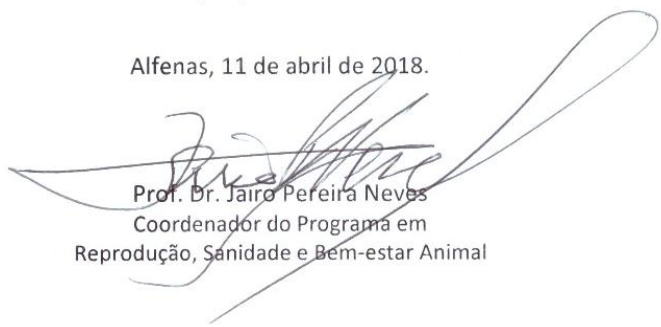


Prof. Dr. Carlos Antonio de Carvalho Fernandes



Profa. Dra. Ana Augusta Pagnano Derussi

Alfenas, 11 de abril de 2018.



Prof. Dr. Jairo Pereira Neves
Coordenador do Programa em
Reprodução, Sanidade e Bem-estar Animal

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus familiares e amigos, pelo incentivo, amor e carinho.

A Tamara Cristina Baitelo, por estar sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins, me incentivando e dando apoio para seguir em frente.

Ao Dr. Jairo Pereira Neves, pela orientação, pela paciência e pelo grande apoio na concretização deste projeto.

Ao Dr. José Antônio Dias Garcia, pelo apoio, pelo incentivo e pela inspiração.

Ao Dr. Miller Pereira Palhão, pela enorme colaboração com as análises estatísticas e com a metodologia.

Ao Dr. Lucas Alberto Teixeira de Rezende, ao Michael Cesar dos Santos e ao Dr. Rogério Rondineli Nóbrega, pelo grande auxílio do trabalho a campo.

As empresas DOMED e Biotran, pela disponibilidade do aparelho de ultrassonografia.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Câmpus Muzambinho, pela disponibilidade dos animais e do espaço físico, bem como pela colaboração com as dosagens hormonais.

A CENARGEN (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF), por auxiliar com as dosagens de progesterona.

À FAPEMIG (Fundação de apoio a pesquisa de Minas Gerais), pela disponibilização da bolsa de estudo que viabilizou a conclusão do curso.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio através da Bolsa de Produtividade do Orientador, e pelo custeio.

Aos professores e colegas do programa de Mestrado e Doutorado em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal, pelos ensinamentos e pela amizade.

À banca examinadora, pela disponibilidade e pela presença.

A todos que colaboraram para a concretização deste projeto, muito obrigado.

RESUMO

Rizzoni, Leandro Becalete. **Características morfofuncionais de estruturas ovarianas e diagnóstico precoce de gestação em ovelhas**. Orientador: Jairo Pereira Neves. Alfenas: UNIFENAS, 2018. Tese (Doutorado em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal).

A utilização de biotécnicas na reprodução animal proporciona o melhoramento do rebanho, entretanto se faz necessário o conhecimento da fisiologia reprodutiva, que vem sendo mais bem elucidado por meio da ultrassonografia e de técnicas de dosagem hormonais, possibilitando, assim, uma melhor acurácia nas técnicas de manipulação reprodutiva e de diagnóstico por imagem. O presente estudo foi dividido em dois experimentos. O experimento 1 teve como objetivo estabelecer uma relação entre o padrão vascular, morfológico e funcional do corpo lúteo (CL) de ovelhas através da ultrassonografia no modo Doppler colorido (CD). Para isso, 34 ovelhas, cruzadas Dorper com Santa Inês, foram divididas aleatoriamente em G1 (rufiadas) e G2 (acasaladas) que tiveram o estro sincronizado. As imagens ultrassonográficas dos CLs foram feitas diariamente até o dia D17, pela via transretal. As variáveis analisadas foram a área do CL e área de fluxo sanguíneo (FS). Amostras de sangue foram coletadas para dosagem de P4. A área do CL teve um crescimento progressivo até o D5 ($P < 0,0001$), sem aumento significativo nos dias subsequentes; o G1 progrediu para uma queda acentuada em sua área a partir do D13 ($P < 0,0001$). O mesmo padrão foi observado quanto à área FS, com crescimento progressivo até o D4 ($P < 0,0001$), seguido por uma queda no D13 ($P < 0,0001$) para o G1. As concentrações plasmáticas de P4 alcançaram valores fisiológicos para ovinos até o D6 ($P < 0,0001$), com uma queda pronunciada no D12 ($P < 0,0001$) para o G1. O experimento 2 objetivou determinar a confiabilidade da ultrassonografia em modo Doppler colorido, como diagnóstico preditivo de ovelhas não gestantes 17 dias após cobertura, por meio do padrão vascular do corpo lúteo. Foram utilizadas 62 ovelhas cruzadas Dorper com Santa Inês. O diagnóstico de gestação no D17 (DG17) classificou os animais como Gestantes, para os que apresentaram alguma área de fluxo sanguíneo (FS) no corpo lúteo (CL) e Não-gestantes, para aqueles que não apresentaram nenhuma área de FS no CL. No D30, o diagnóstico de gestação (DG30) foi confirmado por ultrassonografia em modo-B. O DG30 foi comparado retrospectivamente com o DG17. Os parâmetros de desempenho do diagnóstico, baseado na área de FS, tiveram sensibilidade de 100,0%; especificidade de 80,0%; valor preditivo negativo 100,0%; valor preditivo positivo de 73,3% e acurácia de 87,1%. A proporção de falso positivo foi 12,9% (8/62), causado por ciclos longos e por perdas embrionárias precoce; a de falso negativo, foi de 0,0% (0/62). Esses estudos demonstraram que a utilização da ultrassonografia em modo CD traz vantagens adicionais à ultrassonografia em modo-B e é uma potencial ferramenta para a avaliação da função luteal e para o diagnóstico precoce de gestação em ovinos, permitindo melhor acurácia na identificação e na mensuração do corpo lúteo e em sua vascularização.

Palavras-chave: fluxo sanguíneo, luteogênese, luteólise, progesterona, ovinos.

ABSTRACT

Rizzoni, Leandro Becalet. **Morphofunctional characteristics of ovarian structures and early diagnosis of gestation in sheep.** Advisor: Jairo Pereira Neves. Alfenas: UNIFENAS, 2018. Thesis (PhD in Reproduction, Health and Animal Welfare).

The use of biotechniques in animal reproduction allows to provide the improvement of the herd, however it is necessary to know the reproductive physiology, which has been better elucidated through ultrasound and hormonal dosing techniques, thus enabling a better accuracy in the techniques of reproductive manipulation and diagnostic imaging. The present study was divided into two experiments. The experiment 1, aimed to establish a relationship between the vascular, morphological and functional pattern of the corpus luteum (CL) of sheep through color Doppler (CD) ultrasonography. Therefore, 34 Dorper crossbred ewes with Santa Inês were randomly divided into G1 (ruffed) and G2 (mated) that had estrus synchronized. Ultrasonographic images of CLs were made daily up to the day D17, by the transrectal route. The analyzed variables were the CL area and the blood flow area (FS). Blood samples were collected for P4 dosing. The CL area had a progressive increase to D5 ($P < 0.0001$), without significant increase on subsequent days, G1 progressed to a marked fall in its area from D13 ($P < 0.0001$). The same pattern was observed for FS area, with progressive growth up to D4 ($P < 0.0001$) followed by a drop in D13 ($P < 0.0001$) for G1. The plasma concentrations of P4 reached physiological values for sheep up to D6 ($P < 0.0001$), with a pronounced drop in D12 ($P < 0.0001$) for G1. Experiment 2, aim to determine the reliability of Doppler ultrasonography, as a predictive diagnosis of non-pregnant sheep 17 days after coverage, through the vascular pattern of the corpus luteum. 62 Dorper crossbred sheep were used with Santa Inês. The diagnosis of pregnancy in D17 (DG17), classified the animals as Pregnant, for those who presented some area of blood flow (FS) in the corpus luteum (CL) and Non-pregnant, for those who did not present any FS area in CL. In D30 the diagnosis of gestation (DG30) was confirmed by B-mode ultrasonography. DG30 was compared retrospectively with DG17. The diagnostic performance parameters based on the FS area had a sensitivity of 100.0%; specificity of 80.0%; negative predictive value 100.0%; positive predictive value of 73.3% and accuracy of 87.1%. The proportion of false positive was 12.9% (8/62), caused by long cycles and early embryonic losses, and the false negative rate was 0.0% (0/62). These studies have demonstrated that the use of ultrasound in CD mode offers additional advantages in B-mode ultrasound and is a potential tool for the evaluation of luteal function and for the early diagnosis of gestation in sheep, allowing a better accuracy in the identification and measurement of the corpus luteum and its vascularization.

Key-words: blood flow, luteogenesis, luteolysis progesterone, sheep.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Protocolo de sincronização de estro, Capítulo 2.....	35
Figura 02	Área do corpo lúteo, Capítulo 2.....	37
Figura 03	Área do fluxo sanguíneo, Capítulo 2.....	38
Figura 04	Porcentagem de fluxo sanguíneo em relação à área do corpo lúteo, Capítulo 2.....	39
Figura 05	Concentração plasmática de progesterona, Capítulo 2.....	41
Figura 01	Protocolo de sincronização de estro, Capítulo 3.....	48
Figura 02	Diagnóstico de gestação de acordo com a área de fluxo sanguíneo no corpo lúteo, Capítulo 3.....	50
Figura 03	Área do corpo lúteo (cm ²) em modo-B entre os dias D7, D12 e D17 do ciclo estral, para os diferentes grupos de tratamento (G1 e G2), Capítulo 3.....	52
Figura 04	Área do fluxo sanguíneo (cm ²), mediante sinal Doppler nos dias D7, D12 e D17 do ciclo estral, para os diferentes grupos de tratamento (G1 e G2), Capítulo 3.....	52
Figura 05	Porcentagem de fluxo sanguíneo, dado pela razão entre a área do corpo lúteo nos dias D7, D12 e D17 do ciclo estral, para os diferentes grupos de tratamento (G1 e G2), Capítulo 3.....	53
Figura 06	Concentração plasmática de progesterona nos dias D3, D6, D9, D12 e D15 do ciclo estral, para os diferentes grupos de tratamento (G1 e G2), Capítulo 3.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Tabela de contingência Predição de Gestação (Dia 17) vs. Diagnóstico de Gestação (Dia 30), Capítulo 3.....	55
-----------	--	----

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
CAPÍTULO 1	10
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
a. Ciclo estral	12
b. Dinâmica folicular	13
c. Dinâmica luteal	14
i. Ovulação e luteogênese	15
ii. Angiogênese e vascularização	17
iii. Esteroidogênese	18
iv. Luteólise	19
d. Avaliação do corpo lúteo	20
e. Diagnóstico de gestação	22
3. OBJETIVOS	22
a. Objetivo geral	22
b. Objetivos específicos	22
4. HIPÓTESE	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 2	31
CAPÍTULO 3	45

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As características produtivas e reprodutivas dos ovinos são algumas das razões para a sua crescente expansão, por se tratar de animais de grande adaptabilidade aos diversos sistemas de criação, desde os familiares e extensivos, até outros modernos e intensivos. Os ciclos produtivos desses animais são curtos, sendo possível o abate com apenas três meses de vida, estando estes aptos à reprodução a partir dos seis meses de idade (FONSECA et al., 2007). O período de gestação dessa espécie é de cinco meses, o qual, aliado a um curto período de puerpério e a uma elevada prolificidade, faz com que esse sistema de criação seja mais dinâmico com retorno do capital investido mais rápido, quando comparado ao retorno da bovinocultura (ARASHIRO, 2008).

Com a necessidade de incrementar os indicadores produtivos, tomados como parâmetro para avaliar a eficiência do sistema de produção de rebanhos ovinos, diversas biotecnologias, especialmente as relacionadas à reprodução animal, têm sido alvo de estudos e têm apresentado expressiva evolução nos últimos anos. A utilização dessas técnicas só se tornou possível devido ao conhecimento adquirido em período anterior, por meio de técnicas de diagnóstico de imagem, como a ultrassonografia e as técnicas de dosagens hormonais (GRIFFI e GINTHER, 1992), que possibilitaram o conhecimento da fisiologia reprodutiva de fêmeas ovinas, descrevendo com maior clareza as estruturas uterinas e ovarianas, e os processos, como a dinâmica folicular e luteínica. Nesse contexto, pode-se citar o surgimento da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) e diagnóstico de gestação, o que constitui biotecnias relacionadas ao melhoramento genético e reprodutivo dos rebanhos ovinos.

O corpo lúteo é uma glândula transitória cujo desenvolvimento no ovário começa imediatamente após a ovulação. Sua principal função é sintetizar progesterona, um hormônio esteroide essencial para o estabelecimento e para manutenção da gestação em diversas espécies domésticas, inclusive nos ovinos (MILLER e MOORE, 1976; WILMUT et al., 1985; NISWENDER et al., 2000). A análise da concentração de progesterona no plasma é o padrão de referência para a avaliação da função luteal (TOM et al., 1998), porém possui inconvenientes como o custo e o intervalo de tempo entre a coleta da amostra e o resultado (HERZOG et al., 2010). Estudos anteriores em ovelhas observaram uma correlação positiva

entre a morfologia do corpo lúteo (área e diâmetro do corpo lúteo) e a concentração plasmática de progesterona (BARTLEWSKI et al., 1999; GONZALEZ-BULNES et al., 2000). Entretanto, a avaliação da função luteal por variações morfológicas apresenta algumas limitações (PIETERSE et al., 1990), especialmente durante o período de luteólise (KASTELIC et al., 1990a; BARTLEWSKI et al., 1999). Em contrapartida a ultrassonografia em modo Doppler colorido já possui comprovada eficácia na avaliação da função luteal de ruminantes (SINGH et al., 2003).

Outro procedimento importante e componente chave para os programas de manejo reprodutivo de rebanhos que visam melhorar o desempenho reprodutivo é o diagnóstico de gestação (THOMPSON et al., 1995). Este contribui para a diminuição do tempo para a resincronização de ovelhas vazias e, conseqüentemente, para a redução dos dias abertos (OLTENACU et al., 1990). Como a vascularização está diretamente associada à funcionalidade do órgão, a ultrassonografia em modo Doppler colorido pode fornecer informações sobre o estado funcional do órgão (MIYAMOTO et al., 2006). Estudos em bovinos mostraram uma estreita associação entre a vascularização do corpo lúteo e o potencial de produção de progesterona (ACOSTA et al., 2003), pois o sistema vascular fornece oxigênio, nutrientes, hormônios e substratos necessários para a esteroidogênese.

Atualmente, a ultrassonografia é o método mais utilizado para diagnóstico de gestação em condições de campo. Embora a gestação em ovinos possa ser reconhecida em torno dos 17 a 19 dias após a cobertura, utilizando o ultrassom em Modo-B, somente a partir do 25º dia os resultados são precisos e confiáveis (GARCIA et al., 1993). Como a vascularização do corpo lúteo diminui simultaneamente com a concentração plasmática de progesterona, este pode ser utilizado como indicador do início do processo de luteólise funcional (McCRACKEN et al., 1999) e, conseqüentemente, indicar a falha na fertilização ou no processo de estabelecimento da gestação. Nesse contexto, a ultrassonografia em modo Doppler colorido pode ser utilizada para o diagnóstico preditivo de animais não gestantes, por meio da avaliação da vascularização do corpo lúteo baseado no seu *status* funcional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

a. Ciclo estral

O ciclo reprodutivo dos ovinos é regulado pela tradução de um sinal luminoso em um sinal hormonal através da melatonina, que é sintetizada durante a noite na glândula pineal, e indica as mudanças de luminosidade. Em latitudes maiores que 35°, os animais apresentam estacionalidade reprodutiva, ou seja, apresentam-se aptos à reprodução em uma determinada época do ano que no Brasil se faz nos meses referentes ao final do verão e do outono, caracterizando-as como poliéstricas estacionais de dias curtos. (LEDEZMA et al., 2006).

Nas ovelhas, o ciclo estral tem uma duração média de 17 dias, podendo variar de 14 a 20 dias (CASTRO et al., 1999; MENCHACA e RUBIANES, 2002), e é dividido em quatro fases: proestro, que tem seu início logo após a regressão do CL do ciclo anterior, e compreende o desenvolvimento da onda folicular ovulatória; estro, período em que há a receptividade sexual da fêmea, com a ovulação geralmente ocorrendo no final desta fase nos ovinos; metaestro, fase em que ocorre o desenvolvimento inicial do CL (luteogênese) e diestro, período em que há a atividade de um CL maduro, culminando com a regressão deste (luteólise) (SWENSON e REECE, 1996; GONZALEZ, 2002; FONSECA e BRUSCHI, 2005).

Alguns fatores como a sazonalidade podem influenciar o período do ciclo estral, sendo comum a ocorrência de ciclos curtos durante o período de transição, compreendidos entre a estação de acasalamento e a estação de anestro e da estação de anestro para a estação de acasalamento (CAMP et al., 1983). O ciclo estral é o resultado de uma interação coordenada, envolvendo quatro órgãos diferentes: hipotálamo, hipófise, ovários e útero. A regulação do ciclo estral é endócrina, cujos principais hormônios envolvidos são: GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina), de origem hipotalâmica; as gonadotrofinas hipofisárias (hormônio folículo estimulante - FSH e hormônio luteinizante - LH), os esteroides ovarianos (estradiol - E2 e progesterona - P4) e a prostaglandina PGF2 α , de origem uterina (GONZALEZ, 2002). A regulação da secreção e da biodisponibilidade de hormônios gonadotróficos durante o ciclo estral depende de uma complexa interação entre diversos fatores internos, como a produção local de aminoácidos e de peptídeos hormonais, esteroides ovarianos e outros hormônios foliculares como a inibina, ativina e folistatina,

neurotransmissores e neuromoduladores, e produtos uterinos, além de fatores de origem externa como os sinais de fotoperíodo, de feromônios do macho, de nutrição e de estresse (BARTLEWSKI et al. 2011; CLARKE, 2011).

O estro é um complexo de sinais fisiológicos e comportamentais que antecede a ovulação. A duração do estro varia de 24 a 36 horas nas ovelhas (FONSECA et al., 2006). De modo geral, os sinais de estro incluem imobilidade da fêmea durante a monta, vulva edemaciada, mucosa vaginal hiperêmica, descarga de muco vaginal claro e elástico, inserção da cauda arrepiada, inquietude, formação de grupo, lordose e, algumas vezes, redução do consumo alimentar e da produção de leite; outros comportamentos como proximidade do macho, levantar e abanar da cauda e urinar com frequência também são observados nas ovelhas (PACHECO e QUIRINO, 2010). Segundo Simitzis et al. (2006), essa fase de reconhecimento e de cortejo é muito importante para o sucesso da cobertura, pois fêmeas cortejadas tendem a permanecer imóveis, enquanto as que não são cortejadas tendem a caminhar. Muitos desses sinais podem também estar presentes no pró-estro, por isso, se o macho tenta a cobertura, elas ficam paradas em estação e se deixam montar, confirmando, assim, o estro. Entretanto, na ausência do macho ou na presença de um macho inexperiente, o estro pode passar despercebido (MORAES et al., 2002).

Os sinais de estro são decorrentes da elevada concentração de estradiol na circulação, proveniente do folículo pré-ovulatório, que atua em centros cerebrais e medulares. Os ovinos apresentam ovulação espontânea, podendo ser única ou múltipla, que ocorrem próximo ao final do estro, podendo variar de 21 a 45 horas após o início do estro (GORDON, 1997; JAINUDEEN et al., 2004; THOMPSON, 2006). Esse período coincide aproximadamente com 14 a 26 horas após o pico de LH (MOBINI, 2002).

b. Dinâmica folicular

A dinâmica folicular consiste em um processo contínuo de crescimento e de regressão de folículos antrais, que culmina com o desenvolvimento de um folículo ovulatório. O crescimento folicular ocorre em modelo de ondas, podendo ser dividido em quatro momentos distintos. No primeiro, ocorre o recrutamento ou a emergência folicular, em que um grupo de folículos tornam-se responsivos ao estímulo hormonal e iniciam o seu crescimento. No segundo, há a seleção ou desvio, em que somente alguns dos folículos recrutados são selecionados. No terceiro momento, ocorre a dominância folicular, em que o folículo pré-

ovulatório inibe o crescimento de outros folículos, continuando o seu desenvolvimento até o quarto momento em que ocorre a ovulação ou atresia (IRELAND, 1987). Durante o ciclo estral, as ovelhas apresentam de 2 a 3 ondas foliculares (EVANS et al., 2000; EVANS, 2003).

O controle hormonal da dinâmica folicular é realizado pelas gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH). Durante a fase de recrutamento sob ação do FSH, inicia-se o desenvolvimento dos folículos que continuam a crescer até a ovulação. Na fase de seleção, um único folículo se destaca; com a ação do LH, ele alcança a dominância e a capacidade de ovular. O folículo dominante exerce um efeito negativo nos demais folículos pela ação do E2 e na liberação de FSH pela inibina, impedindo que eles se desenvolvam. Se no momento da dominância houver um CL presente e ativo, a concentração plasmática de P4 estará elevada e o folículo dominante entra em atresia. A P4 exerce um efeito negativo sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, reduzindo a amplitude e a frequência dos pulsos de LH, impossibilitando o processo de maturação e de ovulação folicular. Caso não haja a presença de CL, ou ele já tenha sofrido luteólise, e as concentrações plasmáticas de P4 estejam baixas, o folículo dominante completa sua maturação que culmina na ovulação (GINTHER et al., 1996).

A dominância folicular nos pequenos ruminantes ainda é bastante contraditória (DRIANCOURT et al., 1991; VIÑALES, 2004). Alguns autores defendem a teoria de dominância, entretanto sugerem que ela não seria tão aparente quanto ocorre nos bovinos, permitindo, assim, a seleção de dois folículos ovulatórios, criando-se o conceito de codominância, que permite a ocorrência de múltiplas ovulações (GINTHER e KOT, 1994; MEDAN et al., 2005; PALHÃO et al., 2009). Nos ovinos, foram propostos dois mecanismos para explicar a codominância. O primeiro seria a presença de um maior número de folículos responsivos, as gonadotrofinas, e o segundo seria um intervalo mais longo de ação do FSH sobre estes folículos, ou seja, ocorre um maior período de recrutamento folicular (SCARAMUZZI et al., 1993; BARTLEWSKI et al., 1999).

c. Dinâmica lútea

O CL é uma estrutura glandular transitória, que inicia seu desenvolvimento no ovário imediatamente após a ovulação sob ação de um conjunto de fatores mitogênicos, angiogênicos e de crescimento, os quais agem sobre as células remanescentes da parede folicular, determinando a luteinização. Sua principal função consiste na síntese e na liberação

da P4 (SANGHA et al., 2002; WEBB et al., 2002, TAMANINI e DE AMBROGI, 2004), além de outros produtos como o 17- β -estradiol, as prostaglandinas e os hormônios peptídeos como a relaxina, a ocitocina, a neuropressina I, a vasopressina e a inibina, produzidos em menores quantidades (SANGHA et al., 2002).

O CL desempenha um papel central na regulação do ciclo estral e na manutenção da gestação, cuja função é realizada em grande parte pela P4 (STOCCO et al., 2007). A necessidade da progesterona para a manutenção da gestação excede a duração normal do ciclo estral em muitas espécies (NISWENDER et al., 2000). A P4 lútea é necessária até 50-60 dias de gestação nas ovelhas, pois nesta espécie, diferentemente dos outros ruminantes, a placenta secreta lactogênio placentário ao invés da P4; nos demais ruminantes como as vacas, o CL secreta P4 até os 210-230 dias de gestação nas vacas e, durante todo o período de gestação, na cabra, algo em torno de 150 dias, (THIBAUT e LEVASSEUR, 2001).

As células luteínicas esteroidogênicas sintetizam e liberam P4 na circulação sistêmica, promovendo a quiescência na contratilidade do miométrio, a secreção glandular do endométrio e o ambiente uterino adequado para o desenvolvimento do conceito (SALLES e ARAÚJO, 2010). Entretanto, na ausência da fertilização ou na incapacidade do conceito em sinalizar sua presença no útero através do interferon- τ , pulsos de PGF2 α são liberados pelas células endometriais, promovendo a luteólise funcional e estrutural, o que determina o término do ciclo estral e gera um novo estro (McCRACKEN et al., 1999).

i. Ovulação e luteogênese

A ovulação é o resultado de uma interação entre o pico de LH e de determinados fatores locais como os esteroides, prostaglandinas e peptídeos, que desencadeiam mudanças estruturais e bioquímicas que levam à ruptura do folículo ovulatório, resultando na expulsão do oócito e, conseqüentemente, na formação do CL (ACOSTA e MIYAMOTO, 2004).

A ruptura do folículo ovulatório é mediada pela degradação das fibras colágenas presentes na túnica albugínea e na parede folicular e também por um aumento na perfusão sanguínea na base do folículo (ACOSTA et al., 1999). A perfusão sanguínea é mediada por peptídeos vasoativos (angiotensina II, endotelina I e peptídeo natriurético atrial), que são liberados durante o estímulo de LH, que atuam diretamente na ovulação e no desenvolvimento inicial do CL, pois regulam a secreção local de prostaglandinas e dos hormônios esteroides (ACOSTA et al., 1999).

Após a ovulação, inicia-se a luteogênese, caracterizada por um intenso crescimento tecidual e proliferação celular. Em ovelhas, o tecido do folículo ovulatório pesa em média 40 mg, e dá origem a um CL de 600 a 700 mg em apenas poucos dias (FARIN et al., 1986). O CL é composto por uma população heterogênea de células com propriedades morfológicas, endocrinológicas e bioquímicas distintas das células de origem (SMITH et al., 1994), divididas em duas classes: células não esteroidogênicas (fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas, leucócitos, macrófagos e eventualmente plasmócitos) e células esteroidogênicas (células luteais grandes e células luteais pequenas) (ALILA e HANSEL, 1984; MILVAE et al., 1996; NISWENDER et al., 2000).

A diferenciação das células da teca dá origem a células luteais pequenas, classificadas dessa forma por apresentarem um menor volume, entretanto são as de maior número quando comparadas às células luteais grandes, que são originadas a partir da diferenciação das células da granulosa. Nos ovinos, as células pequenas representam 18 a 23% do volume total do CL e 23 a 26% do total de células (FIELDS e FIELDS, 1996). As células pequenas possuem uma secreção basal de P4 reduzida, porém uma maior secreção sob o estímulo de LH, quando comparados às células luteais grandes (SANGHA et al., 2002). As células grandes apresentam alta produção de P4, independentemente de estímulos externos, e também produção de ocitocina, que ocupam cerca de 40% do volume do CL (WILTBANK e NISWENDER, 1992).

A luteogênese tem seu início logo após a ovulação, caracterizada por migrações celulares para o interior do folículo, com intensa proliferação e diferenciação celular, neovascularização e remodelamento tecidual sob a influência de fatores mitogênicos e angiogênicos, dentre estes, os fatores de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), de crescimento vascular endotelial (VEGF), de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I), de crescimento ligador da heparina, de crescimento derivado de plaquetas e metaloproteinases (SMITH et al., 1994; McCracken et al., 1999; NISWENDER et al., 2000; ACOSTA e MIYAMOTO, 2004).

Além das mudanças estruturais, o pico de LH está diretamente relacionado às mudanças tanto na expressão quanto na regulação das enzimas esteroidogênicas, evento de grande relevância dentro do processo de luteinização, o qual torna as células luteais aptas a sintetizar P4 (SMITH et al., 1994; SANGHA et al., 2002).

O CL secreta a P4, como principal hormônio esteroide, além do 17β -estradiol, das prostaglandinas e de vários hormônios peptídeos como a relaxina, ocitocina, neurofisina,

vasopressina e inibina. Durante a luteinização, a P4 eleva-se dez vezes devido ao aumento na produção das enzimas esteroidogênicas, e também devido ao grande aumento do fluxo sanguíneo para o CL, permitindo a utilização de lipoproteínas séricas como fonte de colesterol para a esteroidogênese (WILTBANK e NISWENDER, 1992).

Anatomicamente, o CL pode ser classificado como protuso e incluso, maciço ou cavitário, sendo que esta última condição pode ocorrer devido à ocupação incompleta da cavidade folicular pelas células durante a luteinização (NEVES et al., 2002). A luteinização do folículo ovulatório ocorre de fora para dentro. Quando não se completa, forma-se a cavidade lúteal, uma estrutura localizada no centro do CL preenchida por um transudado seroso límpido, que não afeta a duração do ciclo estral nem a capacidade de produção de P4 (SINGH et al., 1997; DICKIE et al., 1999; GONZALEZ-BULNES et al., 2000) o que foi da mesma forma foi observado em bovinos (KITO et al., 1986, TOM et al., 1998; PIERSON e GINTHER, 1988; Kastelic et al., 1990a). As cavidades são consideradas temporárias e não patológicas, visto que não reaparecem ao longo do ciclo estral. Entretanto, Bartlewski et al. (1999) atribuíram o reaparecimento de cavidades durante a luteólise à rápida degradação estrutural e ou ao acúmulo de fluído na regressão do CL.

ii. Angiogênese e vascularização

O desenvolvimento normal do CL e sua capacidade de produzir P4, fatores de crescimento, fatores angiogênicos e substâncias vasoativas, são dependentes da vascularização (ACOSTA e MIYAMOTO, 2004), sendo a inadequada vascularização lúteal a causa primária da disfunção lúteal (DUGGAVATHI et al., 2003a).

As estruturas ovarianas, foliculares ou luteínicas, estão sempre em alternância de fases de crescimento e de regressão, requerendo, assim, angiogênese contínua (ROBINSON et al., 2009). A angiogênese ocorre como um evento fisiológico essencial para o crescimento e para o desenvolvimento normal dos tecidos, em que a formação de novos vasos sanguíneos, por meio da migração e proliferação de células endoteliais oriundas de vasos preexistentes, garante a disponibilidade de oxigênio, de nutrientes, de hormônios e de substratos, bem como a transferência de diferentes hormônios para as células-alvo (TAMANINI e DE AMBROGI, 2004; AYRES e MINGOTI, 2012).

O pico de secreção de LH promove complexas alterações estruturais e funcionais no folículo maduro, as quais estão estreitamente associadas ao aumento do fluxo sanguíneo na

parede do folículo pré-ovulatório (ACOSTA et al., 2003). Sabe-se que o primeiro aumento detectável na concentração de estradiol plasmático coincide com o aumento da vascularização (área de fluxo sanguíneo) na parede do folículo maduro (ACOSTA e MIYAMOTO, 2004). Assim, parece haver uma íntima associação entre diâmetro folicular, concentração de estradiol no fluido folicular e área vascular (MATTIOLI et al., 2001).

Após a ovulação, o suprimento sanguíneo das células da granulosa aumenta. Essas células crescem e se dividem formando um corpo sólido que alcança seu tamanho máximo e sua completa atividade funcional por volta do sétimo dia após a ovulação. Nesse momento, o CL está altamente vascularizado, recebendo aproximadamente 97% do fluxo de sangue ovariano (ROBERTSON, 1977). Já no meio da fase luteal, as células esteroidogênicas encontram-se adjacentes a uma célula endotelial e o CL tem o maior fluxo sanguíneo por unidade de tecido, quando comparado aos demais órgãos (WILTBANK et al., 1988; REYNOLDS et al., 2000). O fluxo sanguíneo ovariano está altamente correlacionado com a taxa de secreção de P4 (ACOSTA et al., 2003; SCHAMS e BERISHA, 2004), já que o sistema de vascularização do CL serve como uma rota de entrega de substâncias biológicas, ao fornecer nutrientes para as células lúteas, substratos para produção de hormônios estimuladores e/ou reguladores, que são indispensáveis para a manutenção da secreção de P4 (AYRES e MINGOTI, 2012).

O conhecimento acerca da regulação dos eventos angiogênicos no CL ainda é parcialmente compreendido. Os principais fatores angiogênicos conhecidos incluem o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), a família dos fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), o sistema angiopoietina e a família dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), sendo que o subtipo a (VEGFa) é o mais estudado (ROBINSON et al., 2009). A regulação da angiogênese é estabelecida tanto por fatores locais, quanto por fatores sistêmicos, além dos fatores pró-angiogênicos e de uma variedade de citocinas que estão envolvidas ativamente neste processo (TAMANINI e DE AMBROGI, 2004).

iii. Esteroidogênese

A função luteínica dos ruminantes (medida pela secreção de P4) é regulada pelo LH proveniente da hipófise anterior (MORAES et al., 2002). Após a ligação de LH ao seu receptor, ocorre a ativação da adenilciclase e o subsequente aumento das concentrações de adenosina monofosfato cíclica (cAMP). A presença de cAMP estimula a esteroidogênese em

poucos minutos, facilitando o transporte de colesterol para dentro da célula e do meio intracelular para dentro da mitocôndria, que converte o colesterol em pregnelona pela ação da enzima clivadora de cadeia lateral (P450scc), localizada na membrana interna da mitocôndria (BERTAN et al., 2006).

O padrão de mudanças nas concentrações de P4 durante a fase luteal do ciclo estral em ovelhas foi um dos primeiros a ser descritos e tem sido confirmado diversas vezes desde então (ALECOZAY et al., 1988; NISWENDER et al., 2000). Concentrações de P4 de 0,2 ng/mL são provenientes do córtex da adrenal, visto que concentrações similares foram observadas em ovelhas ovariectomizadas e em anestro (ROBERTSON, 1977). A área luteal e a concentração de P4 sérica aumentam ($p < 0,05$) de 12 a 24h e 60 a 72h após a ovulação, respectivamente (DUGGAVATHI et al., 2003b). No momento da ovulação, as concentrações de P4 estão em níveis basais, alcançando aumento expressivo entre 3 e 7 dias, mantendo um platô até aproximadamente o dia 12, e subsequentemente declinam rapidamente em função da luteólise, alcançando valores basais antes do próximo estro ou da ovulação (BARTLEWSKI et al., 1999). Em ovelhas, essas concentrações ficam em torno de 3,7 ng /mL na fase lúteal (GONZALEZ, 2002).

iv. Luteólise

A luteólise é o processo de degeneração do CL, caracterizado inicialmente por uma diminuição na biossíntese e na secreção de P4 (luteólise funcional), seguida por alterações histológicas (luteólise morfológica e estrutural), resultando na formação do corpus albicans, pequena cicatriz composta por tecido conjuntivo denso (McGUIRE et al., 1994; McCracken et al., 1999).

A $\text{PGF2}\alpha$ é o fator responsável pelo início do processo de luteólise (NISWENDER et al., 2000). A $\text{PGF2}\alpha$ é o hormônio luteolítico sintetizado e liberado de forma cíclica pelo endométrio dos ovinos (SWENSON e REECE, 1996). No final do ciclo estral, com a diminuição da ação da P4 sobre o hipotálamo, ocorre um aumento nas concentrações plasmáticas de E2, que por sua vez estimula a formação de receptores para ocitocina no endométrio e, simultaneamente, estimula a liberação de ocitocina em pequenas quantidades, mas em elevada frequência (McCracken et al., 1999).

O endométrio libera pequenas quantidades de $\text{PGF2}\alpha$ (sub-luteolíticas), que são suficientes para iniciar a liberação suplementar de ocitocina pelo tecido luteal e para

desencadear uma amplificação na liberação endometrial de $\text{PGF2}\alpha$. A síntese e a liberação de $\text{PGF2}\alpha$ pelo útero passam a ser alto o suficiente para ativar os receptores de baixa sensibilidade, inibindo a secreção de P4 e promovendo a liberação suplementar de ocitocina pelo CL, formando um sistema cíclico de retroalimentação positiva (McCRACKEN et al., 1999).

A primeira alteração observada durante o processo de luteólise é a redução nas concentrações plasmáticas de P4 (ACOSTA et al., 2002), seguida por um aumento agudo no fluxo sanguíneo para o CL (ACOSTA e MIYAMOTO, 2004). Essa elevação aguda no aporte sanguíneo ocorre somente no meio do ciclo, entre 0,5 a 2 horas após a administração da $\text{PGF2}\alpha$, sendo essencial para as células endoteliais do CL sintetizarem e liberarem substâncias vasoativas (endotelina-1 e angiotensina II), que irão posteriormente causar uma vasoconstrição, reduzindo o fluxo sanguíneo para o CL (OHTANI et al., 1998; LEVY et al., 2000).

As alterações morfológicas que ocorrem com o CL durante o processo de luteólise podem ser atribuídas a diversos fatores, incluindo apoptose, fluxo sanguíneo, células do sistema imune, metaloproteinases, fator de necrose tumoral- α e inibidor 1 do ativador do plasminogênio (McCRACKEN et al., 1999).

d. Avaliação do corpo lúteo

A função luteal é responsável pela duração e pela regularidade dos ciclos estrais, pelo controle da ocorrência de ovulações e pela manutenção da gestação. A avaliação do CL fornece informações importantes sobre o estado reprodutivo da fêmea, e possibilita a adequação de procedimentos de manipulação ou de sincronização do ciclo estral (VIANA et al., 1999).

A concentração plasmática de P4 está relacionada com sua produção e liberação pelo CL e suas taxas de metabolização e eliminação, que podem ser influenciadas pelo fluxo sanguíneo, pela disponibilidade de precursores e por fatores luteotróficos (VIANA et al., 1999). A concentração plasmática de P4 apresenta variação cíclica durante o ciclo estral e reflete a funcionalidade do CL entre a fase de crescimento, de manutenção e de regressão (BORGES et al., 2003).

Análise de concentração plasmática de P4 é o padrão de referência para avaliação da função luteal (TOM et al., 1998). No dia do estro, a P4 encontra-se abaixo de 1ng/mL , e

valores máximos são encontrados ao redor do 10º dia (WISE et al., 1982, BORGES et al., 2003), e são mantidas elevadas até início da regressão do CL, caso não ocorra gestação (BORGES, 2001). Entretanto, a avaliação do CL baseada na P4 sanguínea tem dois inconvenientes: o primeiro são os custos relativamente elevados e o segundo é o intervalo de tempo entre a retirada de sangue e a disponibilidade do resultado (HERZOG et al., 2010).

O uso da ultrassonografia nos estudos da reprodução de pequenos ruminantes revolucionou o conhecimento da fisiologia reprodutiva. As pesquisas geradas com o uso das imagens de ultrassom esclareceram a complexidade do processo reprodutivo nas fêmeas ovinas, como a dinâmica do desenvolvimento folicular, a formação do CL e o desenvolvimento fetal (VASCONCELOS e SANTOS, 2006).

A ultrassonografia é uma técnica que permite a completa visualização do tecido luteal, possibilitando maior precisão na identificação e na mensuração do CL (PIERSON e GINTHER, 1987; RIBADU et al., 1994). Nessa avaliação, a imagem do CL é uniforme, circunscrita e menos ecogênica que o estroma ovariano (VIANA et al., 1999). Alterações na vascularização ocorrem nos folículos e CLs em crescimento e regressão. Assim, o Doppler colorido pode ser utilizado para caracterizar alterações na dinâmica vascular em processos fisiológicos importantes (SINGH et al., 2003).

O processo de luteinização com significativa hiperplasia das células da teca, hipertrofia das células da granulosa (NISWENDER et al., 1994) e ainda proliferação de células fibroblásticas (GONÇALVES et al., 2001), resulta, na aquisição progressiva de tamanho, de forma, de consistência e de padrão ecogênico do CL (TOM et al., 1998). Existe alta relação entre a concentração de P4 plasmática e a massa e o volume do CL (VERONESI et al., 2002). A angiogênese característica da luteinização (SMITH et al., 1994) é também responsável pelo padrão hipoecogênico do CL à ultrassonografia (TOM et al., 1998). Os níveis de P4 basicamente dependem do fluxo sanguíneo ao CL, que pode ser quantificado de forma confiável por ultrassonografia Doppler transretal. O ultrassom Doppler colorido oferece uma abordagem não invasiva para avaliar a função vascular no CL, permitindo a observação visual do sinal Doppler que se refere ao fluxo sanguíneo local dentro do CL (ACOSTA et al., 2002).

A luteólise e o subsequente retorno à atividade ovariana cíclica podem ser monitorados por vários parâmetros, dentre estes, o tamanho e o aspecto ultrassonográfico do tecido luteal (SIQUEIRA et al., 2009), o fluxo sanguíneo luteal, avaliado pelo Doppler

colorido (MIYAMOTO et al., 2006) e a concentração plasmática de P4 (BICALHO et al., 2008; MARTIN e FERREIRA, 2010). A regressão funcional do CL é caracterizada pelo decréscimo na produção de P4, e a redução estrutural se manifesta como uma degradação do tecido luteal (PATE, 1994).

e. Diagnóstico de gestação

A ultrassonografia em tempo real, apesar de não estar totalmente livre da ocorrência de erros, é o método mais eficiente por reunir praticidade e acurácia no diagnóstico precoce da gestação (SALLES et al., 1997; CHALHOUB e RIBEIRO FILHO, 2002), na quantificação fetal, na sexagem e, até mesmo, na identificação de algumas patologias reprodutivas (BUCKRELL, 1988; ISHWAR, 1996).

O diagnóstico precoce de gestação pela ultrassonografia é importante para aprimorar o manejo reprodutivo e racionalizar a produtividade de rebanhos. Fêmeas prenhes podem ser submetidas a um programa nutricional adequado, visando ao máximo aproveitamento do potencial produtivo e, ao mesmo tempo, podem suprir as exigências dos fetos em desenvolvimento (DAVEY, 1986), sobretudo no final de gestação, fase em que a nutrição tem maior influência no peso da cria ao nascer.

Os primeiros relatos sobre a observações de fetos pela ultrassonografia em ovinos foram realizadas por Tainturier et al. (1983). A partir de então, a ultrassonografia tem sido amplamente utilizada nos pequenos ruminantes (CHALHOUB, 2000) para diagnóstico precoce de gestação com uma acurácia próximo aos 100% (BRETZLAFF et al., 1993; GARCIA et al., 1993).

A visualização do embrião e dos batimentos cardíacos, fatores que determinam o diagnóstico positivo de gestação, somente é possível precisar a partir do 25º dia de gestação em modo B (AZEVEDO et al., 2001; CALAMARI et al., 2002; SANTOS et al., 2004). A diferenciação do embrião ovino em cabeça e tronco somente pode ser visualizada a partir do 26º dia de gestação através de transdutor linear de 5,0 MHz, pela via transretal (KAULFUSS et al., 1996).

3. OBJETIVOS

a. Objetivo geral

Avaliar os aspectos morfofuncionais da dinâmica luteal em ovelhas.

b. Objetivos específicos

Estabelecer uma relação entre o padrão vascular, morfológico e funcional do corpo lúteo ao longo do ciclo.

Determinar a confiabilidade do uso da ultrassonografia em modo Doppler colorido, como diagnóstico preditivo de animais não gestantes no 17º dia após cobertura através do padrão vascular do corpo lúteo.

4. HIPÓTESE

Existe uma relação entre o padrão vascular dos corpos lúteos e sua funcionalidade, sendo o Doppler colorido uma ferramenta confiável para determinar a função luteal de ovelhas, assim como, no diagnóstico preditivo de animais não gestantes, no 17º dia após a cobertura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, T.J. et al. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F₂ α injection in the cow. **Biol. Reprod.**, Oxford, v.66, n.3, p.651-658, mar. 2002.
- ACOSTA, T.J. et al. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroids hormones and prostaglandin secretion. **Biol. Reprod.**, Oxford, v.61, n.6, p.1419-1425, dez. 1999.
- ACOSTA, T.J. et al. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v.125, n.5, p.759–767, maio. 2003.
- ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, n.1, p. 127-140, jun. 2004.
- ALECOZAY, A.A. et al. Pattern of ovarian progesterone secretion during the luteal phase of the ovine estrous cycle. **Biol. Reprod.**, Oxford, v.39, n.2, p.287–294, set. 1988.
- ALILA, H.W.; HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. **Biol. Reprod.**, Oxford, v.31, n.5, p.1015-1025, dez.1984.
- ARASHIRO, E.K.N. **Função luteal em caprinos: características morfológicas, endócrinas e atributos de imagem**. 2008. 113f. Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal) – Universidade Federal Fluminense, Niterói - RJ, 2008.
- AYRES, H.; MINGOTI, G.Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.36, n.3, p.174-180, jul./set.2012.
- AZEVEDO, A. et al. Momento de detecção ultrassonográfica de algumas características do conceito ovino Santa Inês do 20º ao 46º dia de prenhez. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.25, n.2, p.147-1148, out. 2001.
- BARTLEWSKI, P.M.; BABY, T.E.; GIFFIN, J.L. Reproductive cycles in sheep. **Anim. Reprod. Sci.**, v.124, n.3-4, p. 259–268, abr. 2011.
- BARTLEWSKI, P.M. et al. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrus cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **J. Reprod. Fert.**, v.115, n.1, p.111-124, jan. 1999.
- BERTAN, C.M. et al. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.43, n.6, p.824-840, nov. 2006.
- BICALHO, R.C. et al. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, n.2, p. 199-207, jul. 2008.

BORGES, Á.M. Influência de diferentes manejos e tratamentos hormonais na dinâmica ovariana durante o ciclo estral e no anestro pós-parto de vacas Gir e nelore. 2001. 136f. Tese (Doutorado em zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

BORGES, Á.M. et al. Desenvolvimento luteal e concentrações plasmáticas de progesterona em vacas das raças Gir e Nelore. **Rev. Bras. Zootec.**, Viçosa, v.32, n.2, p.276-283, abr. 2003.

BRETZLAFF, K.N. et al. Ultrasonographic determination of pregnancy in small ruminants. **Vet. Med.**, v.88, n.1, p.12-24, fev. 1993.

BUCKRELL, B.C. Application of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. **Theriogenology**, v.29, n.1, p.71-84, out.1988.

CALAMARI, C.V. et al. Acurácia da ultrassonografia transretal para diagnóstico precoce de gestação em ovelhas. **Rev. Bras. Rep. Anim.**, Belo Horizonte, v.26, n.3, p. 258-259, jul./set. 2002.

CAMP, J.C.; WILDT, D.E.; HOWARD, P.K. et al. Ovarian activity during normal and abnormal length estrous cycles in the goat. **Biol. Reprod.**, Oxford, v.18, n.3, p.673-681, abr. 1983.

CASTRO, T. et al. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentration during the interovulatory interval in goats. **Theriogenology**, v.52, n.3, p.399-411, ago. 1999.

CHALHOUB, M. **Aspectos ultrassonográficos e aspecto hormonal da gestação ovina (Ovis Aries) nas raças Bergamácia e Ideal**. 2000. 120f. Tese (Doutorado em medicina veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu-SP, 2000.

CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. L. Diagnóstico de gestação em pequenos ruminantes por ultrassonografia de tempo real. **Rev. Bras. Rep. Anim.**, Belo Horizonte, supl.5, p.27-30, jul. 2002.

CLARKE, I. Control of GnRH secretion: one-step back. **Front. Neuroendocrin.**, v.32, n.3, p.367–375, ago. 2011.

DAVEY C.G. An evaluation of pregnancy testing in sheep using a real-time ultrasound scanner. **Aust. Vet. J.**, Australia, v. 63, n. 10, p. 347-8, out. 1986.

DICKIE, A.M. et al. Determination of corpora lutea number in Booroola-Texel ewes using transretal ultrasound. **Theriogenology**, v.51, n.7, p.1209-1224, jun. 1999.

DRIANCOURT, M.A.; WEBB, R.; FRY, R.C. Does follicular dominance occur in ewes? **J. Rep. Fert.**, v.93, n.1, p.63-70, fev. 1991.

DUGGAVATHI, R.; BARTLEWSKIB, P.M.; BARRETT, D.W. et al. Use of high-resolution trans rectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. **Theriogenology**, v.60,

n.3, p.495-510, ago. 2003a.

DUGGAVATHI, R. et al. Luteogenesis in cyclic ewes: echotextural, histological and functional correlates. **Biol. Rep.**, Oxford, v.69, n.1, p.634–639, ago. 2003b.

EVANS, A.C.O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. **Anim. Rep. Sci.**, v.78, n.3-4, p.289–306, out. 2003.

EVANS, A.C.O. et al. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v.53, n.3, p.699-715, fev. 2000.

FARIN, C.E. et al. Morphometric analysis of cell types ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biol. Rep.**, Oxford, v.35, n.1, p.1299-1308, abr. 1986.

FIELDS, M.J.; FIELDS, P.A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v.45, n.7, p.1295- 1325, maio 1996.

FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H. Reprodução assistida em pequenos ruminantes. **Rev. Ciênc. Agr.**, v.43, n.1, jun./jul. 2005.

FONSECA, J.F. et al. Superovulação de cabras utilizando a primeira onda folicular do ciclo estral. **Acta Scie. Vet.**, Porto Alegre, v.34, n.1, p.509, jan.2006.

FONSECA, J.F.; SOUZA, J.M.G.; BRUSCHI, J.H. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. In: SIMPÓSIO DE CAPRINOS E OVINOS DA EV-UFMG, 2., 2007, Belo Horizonte, **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 2007. p.167-195.

GARCIA, A. et al. Accuracy of ultrasonography in early pregnancy diagnosis in the ewe. **Theriogenology**, v.39, n.4, p.847-861, abr. 1993.

GINTHER, O.J.; KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology**, v.42, n.6, p.987-1001, nov. 1994.

GINTHER, O.J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, Oxford, v.55, n.6, p.1187-1194, dez. 1996.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2001.

GONZALEZ F.H.D. **Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária**. Apostila UFRGS, 87 p. 2002.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. **Reprod. Dom. Anim.**, v.35, n.2, p.65-68, maio 2000.

GORDON, I. **Controlled reproduction in sheep and goats**. Cambridge, UK: University Press, 1997. 450p.

GRIFFIN P.G.; GINTHER O.J. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. **J. Anim. Scie.**, Oxford, v.70, n.3, p.953–972, mar.1992.

HERZOG, K. et al. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v. 73, n.5, p.691–697, mar. 2010.

IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. **J. Reprod. Fert. Sup.**, v.34, n.1, p.39-54, mar. 1987.

ISHWAR, A.K.; MEMON, M.A. Embryo transfer in sheep and goats: a review. **Small Rum. Res.**, v.19, n.1, p. 35-43, jan. 1996.

JAINUDEEN, M.R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. Ovinos e caprinos. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. (Ed.). **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. p.173-182.

KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; GINTER, O.J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v.33, n.6, p.1269-1278, jun. 1990a.

KAULFUSS, K.H.; UHLICH, K.; BRABANT, S. Die ultrasonographische trächtigkeitsdiagnostik (B Mode) beim schaf. Teil 1: verlaufsuntersuchungen im ersten trächtigkeitsmonat. **Tierärztl. Praxis**, v.24, n.5, p.443-452, jun. 1996.

KITO, S.; OKUDA, K.; MIYAZAWA, K. et al. Study on the appearance of the cavity in the corpus luteum of cows by using ultrasonic scanning. **Theriogenology**, v. 25, n.2, p.325-333, fev. 1986.

LEDEZMA, J.A. Sistemas neurales de retroalimentación durante el ciclo reproductivo anual de la oveja: una revisión. **Interciência**, Caracas, v.31, n.1, p.8-15, jan. 2006.

LEVY, N. et al. Administration of prostaglandin F2 during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and type A receptor: a possible cause of corpus luteum refractoriness. **Biol. Reprod.**, Oxford, v.63, n.2, p.377-382, set. 2000.

MARTIN, I.; FERREIRA, J.C.P. Fisiologia da ovulação e da formação do corpo lúteo bovino. **Vet. Zootec.**, Botucatu, v. 16, n.2, p. 270-279, jun. 2009.

MATTIOLI, M. et al. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. **Biol. Reprod.**, Oxford, v.65, n.4, p.1014-1019, out. 2001.

McCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine mediated event. **Physiol. Rev.**, v.79, n.2, p.263-304, abr. 1999.

McGUIRE, W.J.; JUENGEL, J.L.; NISWENDER, G.D. Protein kinase C second messenger system mediates the antiestrogenic effects of prostaglandins F2 α in the ovine corpus

luteum in vivo. **Biol. Rep.**, Oxford, v.51, n.3, p.800-806, out. 1994.

MEDAN, M.S. et al. Follicular and hormonal dynamics during the estrous cycle in goats. **J. Rep. Develop.**, v.51, n.4, p.455-463, ago. 2005.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. Relation between progesterone concentrations during early luteal phase and follicular dynamics in goats. **Theriogenology**, v.57, n.5, p.1411-1419, mar. 2002.

MILLER, B.G.; MOORE, N.W. Effects of progesterone and oestradiol on RNA and protein metabolism in the genital tract and on survival of embryos in the ovariectomized ewe. **Aust. J. Biol. Scie.**, v.29, n.5-6, p.565-573, dez.1976.

MILVAE, R.A.; HINCKLEY, S.T.; CARLSON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 45, n.7, p.1327-1350, maio 1996.

MIYAMOTO, A. et al. Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Dom. Anim. Endocrin.**, v.29, n.2, p.329-339, set. 2006.

MOBINI S.; HEATH A.M.; PUGH D.G. Theriogenology of Sheep and Goats In: _____. **Sheep and goat medicine Pennsylvania**. Estados Unidos: W.B. Saunders Company, 2002. cap.6, p.129-196.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; GONÇALVES, P.B.D. Controle do Estro e da Ovulação em Bovinos e Ovinos In: _____. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. cap.3, p.25-55.

NEVES, M.M.; MARQUES JUNIOR, A.P.; SANTANA, C.V. et al. Características de ovários de fêmeas zebu (*Bos taurus indicus*), colhidos em abatedouros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p.651-654. set. 2002.

NISWENDER, G.D. et al. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. **Biol. Rep.**, Oxford, v.50, n.2, p.239-247, fev. 1994.

NISWENDER, G.D. et al. Mechanism controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiol. Rev.**, v.80, n.1, p.1-29, jan. 2000.

OHTANI, M. et al. Real-time relationship between intraluteal and plasma concentrations of endothelin, oxytocin, and progesterone during prostaglandin F_{2α} induced luteolysis in the cow. **Biol. Rep.**, Oxford, v.58, n.1, p.103-108, set. 1998.

OLTENACU, P.A. Economic evaluation of pregnancy diagnosis in dairy cattle: a decision analysis approach. **J. Dairy Scie.**, v.73, n.10, p.2826-2831, out. 1990.

PACHECO, A.; QUIRINO, C.R. Comportamento sexual em ovinos. **Rev. Bras. Rep. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.87-97, abr./jun. 2010.

PATE, J.L. Cellular components involved in luteolysis. **J. Anim. Sci.**, Oxford, v.72, n.7, p.1884-1890, jul. 1994.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**, v.28, n.6, p.929-936, dez. 1987.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v.29, n.1, p.21-37, jan. 1988.

PIETERSE, M. C. et al. Detection of corpora lutea and follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. **Vet. Record**, v.126, n.22, p.552-554, jun. 1990.

REYNOLDS, L.P.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the corpus luteum. **Endocrine**, v.12, n.1, p.1-9, fev. 2000.

RIBADU, A.Y.; WARD, W.R.; DOBSON, H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. **Vet. Record**, v.135, n.19, p.452-457, nov. 1994.

ROBERTSON, H.A. **Reproduction in domestic animals**. 3.ed., 1977. 665p. Cap.18 Reproduction in the ewe and the goat, p.475-498.

ROBINSON, R.S. et al. Angiogenesis and vascular function in the ovary. **Reproduction**, v.138, n.6, p.869-881, dez. 2009.

SALLES, H.O. et al. Diagnóstico precoce de prenhez em caprinos através da ultrassonografia. **Rev. Bras. Rep. Anim.**, Belo Horizonte, v.21, n.2, p.19-20, ago. 1997.

SALLES, M.G.F.; ARAÚJO, A.A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Rev. Bras. Rep. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.185-194, jul./ set. 2010.

SANGHA, G.K.; SHARMA, R.K.; GURAYA, S.S. Biology of corpus luteum in small ruminants. **Small Rum. Res.**, v.43, n.1, p.53-64, jan. 2002.

SANTOS, M.H.B. et al. Medidas do conceito utilizadas na prática ultrassonográfica de pequenos ruminantes. In: OLIVEIRA, J.F. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004. p.137-148.

SCARAMUZZI, R.J. et al. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reprod. Fert. Develop.**, v.5, n.5, p.459-478, jan. 1993.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum functions in cattle: overview. **Reprod. Dom. Anim.**, v.39, n.4, p.241-251, ago. 2004.

SIMITZIS, P.E.; DELIGEORGIS, S.G.; BIZELLIS, J.A. Effect of breed and age on sexual behavior of rams. **Theriogenology**, v.65, n.8, p.1480-1491, out. 2006.

SINGH, J.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; Promise of new image technologies for assessing ovarian function. **Anim. Reprod. Scie.**, v.78, n.3-4, p.371-399, out. 2003.

SINGH, J.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. **J. Rep. Fert.**, v.109, n.1, p.35-44, jan. 1997.

SIQUEIRA, A.P. et al. Reproductive parameters of toggenburg goats inseminated with cooled semen diluted in egg yolk extender. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, Belo Horizonte, v.61, n.2, p.299-305, abr. 2009.

SMITH, M.F.; McINTUSHI, E.W.; SMITH, G.W. Mechanism associated with corpus luteum development. **J. Anim. Scie.**, v.72, n.1, p.1857-1872, mar. 1994.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endoc. Rev.**, Oxford, v.28, n.1, p.117-149, fev. 2007.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856p.

TAINTURIER, D.L. et al. Intérêt de l'échotomographie pour le contrôle de la reproduction d'un grand troupeau de vaches laitières.. **Rev. Med. Vet.**, v.134, n.7, p.523-526, fev. 1983.

TAMANINI, C.; De AMBROGI, M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. **Rep. Dom. Anim.**, v.39, n.4, p.206-216, ago. 2004.

THIBAULT, C.; LEVASSEUR, M.C. **La reproduction chez les mammifères et l'homme**. [S.l.]: Ellipses, 2001. 936p.

THOMPSON, F.N. Reprodução em mamíferos do sexo feminino. In: REECE, W.O. Dukes, **Fisiologia dos animais domésticos**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.644-669.

THOMPSON, J. A. et al. Evaluation of the benefits of the timing of pregnancy testing by transrectal palpation in dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Associat.**, v.207, n.1, p.1462-1465, ago. 1995.

TOM, J.W.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Quantitative echotexture analysis of bovine corporea lutea. **Theriogenology**, v.49, n.7, p.1345-1352, maio 1998.

VASCONCELOS, J. L. M. ; SANTOS, R. M. **Aplicações práticas da ultrassonografia no manejo reprodutivo de rebanho leiteiro**. Milkpoint, São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/reproducao/aplicacoespraticas-da-ultrasonografia-no-manejo-reprodutivo-do-rebanho-leiteiro-27247n.aspx>>. Acesso em: dez. 2017.

VERONESI, M.C. et al. Ultrasonographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows. **Theriogenology**, v.58, n.1, p.64-68,

jul.. 2002.

VIANA, J.H.M. et al. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, Belo Horizonte, v. 51, n. 3, p. 251-256, jun. 1999.

VIÑALES, C. et al.. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, v.55, n.4, p.993-1004, mar. 2001.

WEBB, R.; WOAD, K.J.; ARMSTRONG, D.J. Corpus luteum function: local control mechanisms. **Dom. Anim. Endocrinol.**, v.23, n.1-2, p.277-285, jul. 2002.

WILMUT, I.; SALES, D.I.; ASHWORTH, C.J. The influence of variation in embryo stage and maternal hormone profiles on embryo. **Theriogenology**, v.23, n.1, p.107-119, jan. 1985.

WILTBANK, M.C. et al. Relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit corpus luteum. **J. Rep. Fert.**, v.84, n.2, p.513-520, nov. 1988.

WILTBANK, M.C.; NISWENDER, G.D. Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. **Anim. Rep. Scie.**, v.28, n.1-4, p.103-110, jul. 1992.

WISE, T.H. et al. Ovarian function during the estrous cycle of the cow: ovarian blood flow and progesterone release rate. **J. Anim. Scie.**, v.2, n.3, p.627-637, set. 1982.

CAPÍTULO 2

Características morfofuncionais do corpo lúteo

[Morphofunctional characteristics of the corpus luteum]

L. B. Rizzoni¹, J.P. Neves¹

¹Unifenas – Universidade José Rosário Vellano

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estabelecer uma relação entre o padrão vascular, morfológico e funcional do corpo lúteo (CL) de ovelhas através da ultrassonografia no modo Doppler colorido (CD). Foram utilizadas ovelhas cruzadas Dorper com Santa Inês (n=34), divididas aleatoriamente em G1 (rufiadas) e G2 (acasaladas) que tiveram o estro sincronizado. As imagens ultrassonográficas dos CLs foram feitas diariamente até o dia D17, pela via transretal. As variáveis analisadas foram a área do CL e de fluxo sanguíneo (FS). Amostras de sangue foram coletadas para dosagem de P4. A área do CL teve um crescimento progressivo até o D5 ($P<0,0001$), sem aumento significativo nos dias subsequentes; o G1 progrediu para uma queda acentuada em sua área a partir do D13 ($P<0,0001$). O mesmo padrão foi observado quanto à área FS, com crescimento progressivo até o D4 ($P<0,0001$), seguido por uma queda no D13 ($P<0,0001$) para o G1. As concentrações plasmáticas de P4 alcançaram valores fisiológicos para ovinos até o D6 ($P<0,0001$), com uma queda pronunciada no D12 ($P<0,0001$) para o G1. O presente estudo demonstrou que a utilização da ultrassonografia em modo CD traz vantagens adicionais à ultrassonografia em modo-B e é uma potencial ferramenta de avaliação da função luteal em ovinos, permitindo melhor acurácia na identificação e na mensuração do corpo lúteo e em sua vascularização no acompanhamento da dinâmica luteal. Os dados sugerem também que há uma íntima associação entre a vascularização luteal e o potencial de produção de progesterona, uma vez que a rede vascular disponibiliza oxigênio, nutrientes, hormônios e substratos necessários à esteroidogênese.

Palavras-chave: luteogênese; luteólise; progesterona; ovinos.

ABSTRACT

The objective of this study was to establish a relationship between the vascular, morphological and functional pattern of the corpus luteum (CL) of sheep through color Doppler ultrasonography (CD). Dorper crossbred ewes were used with Santa Inês (n=34), randomly divided into G1 (ruffed) and G2 (mated) that had estrus synchronized. Ultrasonographic images of the CLs were made daily up to the D17 day, by the transrectal route. The analyzed variables were the CL area and blood flow (FS). Blood samples were collected for P4 dosing. The CL area had a progressive increase to D5 ($P<0.0001$), without significant increase on subsequent days, G1 progressed to a marked fall in its area from D13 ($P<0.0001$). The same pattern was observed for FS area, with progressive growth up to D4 ($P<0.0001$) followed by a drop in D13 ($P<0.0001$) for G1. Plasma concentrations of P4 reached physiological values for sheep up to D6 ($P<0.0001$), with a pronounced drop in D12 ($P<0.0001$) for G1. The present study demonstrated that the use of ultrasonography in CD mode offers additional advantages in B-mode ultrasonography and is a potential tool for evaluation of luteal function in sheep, allowing a better accuracy in the identification and measurement of the corpus luteum and its vascularization in the follow-up of the luteal dynamics. The data also suggest that there is an intimate association between luteal vascularization and progesterone production potential, since the vascular network provides oxygen, nutrients, hormones and substrates necessary for steroidogenesis.

Keywords: luteogenesis, luteolysis, progesterone, sheep.

INTRODUÇÃO

O corpo lúteo é uma glândula transitória cujo desenvolvimento no ovário começa imediatamente após a ovulação. Sua principal função é sintetizar progesterona, um hormônio esteroide essencial para o estabelecimento e para a manutenção da gestação em diversas espécies domésticas (Niswender *et al.*, 2000). Em ovinos, a progesterona é de extrema importância para o estabelecimento e para a manutenção da gestação desde os primeiros dias após o acasalamento (Miller e Moore, 1976; Wilmut *et al.*, 1985). Portanto, a presença de um corpo lúteo funcional em ovelhas é um requisito básico em múltiplos programas de reprodução assistida, como a transferência de embriões (Bertan, 2006).

A associação entre as técnicas de ultrassonografia em modo-B e a dosagem hormonais aumentou acentuadamente o conhecimento sobre a fisiologia da reprodução, demonstrando que as mudanças morfológicas estão diretamente relacionadas com as variações hormonais e funcionais do corpo lúteo (Griffi e Ginther, 1992). Estudos anteriores em ovelhas observaram uma correlação positiva entre a morfologia do corpo lúteo (área e diâmetro do corpo lúteo) e a concentração plasmática de progesterona (Bartlewski *et al.*, 1999; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2000). Entretanto, a avaliação da função lúteal por variações morfológicas apresenta algumas limitações (Pieterse *et al.*, 1990), especialmente durante o período de luteólise (Kastelic *et al.*, 1990; Bartlewski *et al.*, 1999). Em contrapartida, a ultrassonografia em modo Doppler colorido está se demonstrando eficaz na avaliação da função lúteal de ruminantes (Singh *et al.*, 2003).

O potencial da ultrassonografia em modo Doppler colorido para o manejo reprodutivo em animais de produção foi inicialmente utilizado no início dos anos 2000 (Bollwein *et al.*, 2000; Miyamoto *et al.*, 2006). Desde então, vários estudos foram realizados demonstrando que a técnica pode ser usada com sucesso para avaliar a vascularização de vários órgãos e estruturas reprodutivas (Oliveira *et al.*, 2014; Beltrame *et al.*, 2017), incluindo o corpo lúteo (Acosta e Miyamoto, 2004). Como a vascularização está diretamente associada à funcionalidade do órgão, a ultrassonografia em modo Doppler colorido pode fornecer informações sobre o estado funcional deste (Miyamoto *et al.*, 2006). Estudos anteriores em bovinos mostraram uma estreita associação entre a vascularização do corpo lúteo e o potencial de produção de progesterona (Acosta *et al.*, 2003). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo estabelecer uma relação entre o padrão vascular, morfológico e funcional do corpo lúteo de

ovelhas ao longo do ciclo estral.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos do experimento foram conduzidos seguindo os preceitos de bem-estar animal e submetidos ao Comitê de Ética (CEUA) sob o número 24A/2016. O experimento foi conduzido no Departamento de Ovinocultura do Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Câmpus Muzambinho – MG, no período de novembro de 2015 a fevereiro de 2016. O clima da região é temperado úmido com inverno seco e verão moderadamente quente (Cwb), segundo a classificação de Köppen (Sá Júnior, 2012), com temperatura média anual de 18°C, precipitação média anual de 1.605 milímetros (Aparecido e Souza, 2013) e altitude média de 1.013 metros.

Foram utilizadas 34 ovelhas cruzadas Dorper com Santa Inês, com idades entre 10 e 48 meses, peso médio de $48,6 \pm 6,8$ kg e escore de condição corporal médio de $4,02 \pm 0,042$ (escala de 1 a 5 segundo Ribeiro, 1997); 1 reprodutor Santa Inês PO de 16 meses e 58 kg de peso vivo; 1 reprodutor Dorper PO de 36 meses e 52 kg de peso vivo e 1 reprodutor White Dorper PO de 36 meses e 48 kg de peso vivo; o escore de condição corporal dos reprodutores foi de $4,25 \pm 0,25$ (1 a 5, Ribeiro, 1997). Os animais foram alocados em um sistema de manejo semi-intensivo com acesso ao pasto de capim Mombaça (*Panicum maximum* cv. Mombaça), diariamente, das 8 às 17 horas, e suplementação média por animal com 1 kg de silagem de milho e 400 g concentrado comercial específico para ovelhas (Algomix Ovinos e Caprinos® – Algomix. Brasil) no período da tarde. Água e sal mineral foram fornecidos à vontade.

Todos os animais passaram por inspeção dos cascos e das mucosas; as avaliações parasitárias foram realizadas semanalmente pelo método FAMACHA (Molento *et al.*, 2004) e mensalmente pelo OPG (ovos por grama de fezes) e OOPG (oocistos por grama de fezes). Previamente, o útero e ovários foram avaliados com o auxílio de um ultrassom (DP-2200Vet®, Mindray. China) e foram descartados os que apresentavam patologias. O aparelho foi equipado com um transdutor linear de 5,0 MHz, acoplado a uma haste plástica para permitir o acesso pela via transretal; todos os exames foram realizados pelo mesmo técnico.

Os animais foram submetidos à sincronização de estro através da utilização esponjas intravaginais impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP)

(Progespon® - Zoetis. Brasil) introduzidas no dia 0 (D0) e retiradas no D9. No D7, os animais receberam 400 UI de eCG/animal (Novormon® - Zoetis. Brasil) e 0,133 mg de cloprostenol sódico/ animal (Ciosin® - MSD Saúde Animal. Brasil) via intramuscular (protocolo descrito na Figura 1). Quatro horas após o final do protocolo, as ovelhas foram colocadas com dois reprodutores portando aventais na região abdominal ventral para evitar a cópula e, dessa forma, atuarem como rufiões para a detecção do estro durante duas horas, duas vezes ao dia, por três dias. O estro foi definido como o momento em que a fêmea aceitou a monta. Foram observadas as seguintes variáveis: taxa de concepção (%), taxa de repetição de estro (%), duração do estro (horas) e intervalo entre o fim do protocolo e o início do estro (horas).

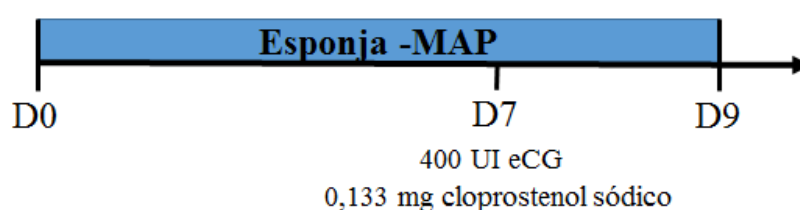


Figura 01. Protocolo de sincronização de estro.

Após a sincronização, as ovelhas foram divididas aleatoriamente em 2 grupos: G1 (n=20) mantidos somente com rufiões e G2 (n=14), que foram acasaladas por dois machos sexualmente maduros e aptos para a reprodução (reprodutor Santa Inês e Dorper). A avaliação ovariana foi realizada através de um aparelho de ultrassonografia portátil com a função Doppler colorido (Sonoscape S2V®, SonoScape, Shenzhen, China), equipado com um transdutor linear de 7,5 MHz, acoplado a uma haste plástica para permitir acesso pela via transretal. As avaliações dos ovários foram feitas diariamente a partir da detecção do estro durante 17 dias (D17) com intervalo de 24 horas. O D0 foi considerado o dia em que houve a ovulação determinada pela ausência do folículo dominante. A última medida do folículo dominante em seu maior diâmetro foi considerada como diâmetro ovulatório. As avaliações subsequentes tiveram como objetivo acompanhar o período de luteogênese e posterior luteólise no caso de fêmeas não gestantes. A ultrassonografia em modo-B foi utilizada para localizar o CL e mensurar a área do tecido lúteal (cm²) em seu maior diâmetro, considerada como diferença entre a área lúteal total, menos a área da cavidade, quando presente. Animais com múltiplas ovulações tiveram as áreas dos CLs somados. O modo Doppler colorido foi utilizado para a determinação do fluxo sanguíneo lúteal através da área de vascularização. Todas as medidas foram calculadas por recursos do próprio aparelho. O percentual de

vascularização foi dado pela razão da área do CL pela área de vascularização do CL.

Amostras de sangue foram coletadas para a dosagem de progesterona, nos dias D3, D6, D9, D12 e D15, por meio da venopunção da jugular, em tubos vacuolizados de 5 mL (Vacutainer® - BD. Brasil) sem anticoagulantes; estes, após a coleta, foram acondicionados a 5° C até a dessoragem; logo após, o soro foi aspirado e estocado em tubetes plásticos a temperatura de 20 °C negativos até a análise. As concentrações plasmáticas de progesterona foram determinadas pela técnica de radioimunoensaio (RIA), utilizando-se kits comerciais (Coat-a-count kit, DPC, Diagnostic Products Co. Los Angeles, CA, USA) no Laboratório de Reprodução Animal do CENARGEN (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF).

Os dados foram analisados pelo PROC MIXED multivariável do SAS 9.3 (SAS Institute Ind., Cary, NC 27512-8000, EUA), utilizando teste T para efeito de grupo e teste LSD para efeito de dia e de interação de grupo x dia. O nível de significância foi considerado $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O intervalo entre a retirada da esponja até a manifestação de estro foi de $34,59 \pm 10,55$ horas. Esse intervalo foi inferior ao observado por Viñoles *et al.* (2001) em um protocolo curto (6 dias) de sincronização com progestágeno e eCG ($84,80 \pm 7,10$), e longo (12 dias) com e sem eCG ($44,6 \pm 2,5$ e $49,00 \pm 3,00$, respectivamente) em ovelhas da raça Polwarth, porém similar ao estudo de Cavalcanti *et al.* (2012), que verificaram intervalo de $32,90 \pm 7,40$ horas em ovelhas na mesma região geográfica.

A duração do estro foi de 8 a 36 horas. Embora o esperado seja de 24 a 48 horas (Gonzalez, 2002), o protocolo demonstrou grande sincronia, visto que 67,65% (23/34) estavam em estro 24 horas após a remoção da esponja. A duração média foi de $22,82 \pm 9,21$ horas, pouco inferior ao valor encontrado por Cavalcanti *et al.* (2012) de $37,40 \pm 9,00$ horas. O menor tempo entre a retirada da esponja e o início do estro, bem como um menor período de estro no presente experimento pode ser justificado pelo uso do eCG, porque esta gonadotrofina estimula o desenvolvimento folicular, aumentando o recrutamento de folículos pequenos (Evans *et al.*, 2003), elevando a concentração de estrógeno e LH, que atuam diretamente na duração do estro (Husein e Kridli, 1998; Dias *et al.*, 2000).

O diâmetro médio dos folículos ovulatórios foi de $6,71 \pm 1,03$ mm e variou numa amplitude

de 4,4 a 8,9. Esse resultado assemelha-se a outros observados na literatura. Foram observados folículos pré-ovulatórios de $6,00 \pm 0,30$ mm por Duggavathi *et al.* (2003), e $6,40 \pm 0,70$ mm por Cavalcanti *et al.* (2012). O diâmetro dos folículos ovulatórios pode variar em função da taxa de prolificidade das ovelhas. Bartlewski *et al.*, (1999), em seu estudo, observaram que ovelhas não prolíficas possuíam folículos maiores do que ovelhas prolíficas, $6,40 \pm 0,20$ vs $5,30 \pm 0,20$ mm, respectivamente ($P < 0,001$).

Os animais do G2 ($n=14$) tiveram uma taxa de concepção de 78,57% (11/14). A taxa de repetição de estro para o G1 ($n=20$) foi de 85% (17/20). A duração do ciclo estral nesses animais foi de $17,89 \pm 0,63$ dias entre estros, e $17,30 \pm 0,56$ dias entre ovulações, semelhante à duração média do ciclo estral em ovinos de 16 a 17 dias, verificado por Gordon (1997), Rosa e Bryant (2003) e Bartlewski *et al.* (2011).

Houve efeito de dia ($P < 0,0001$) sobre a área de tecido lúteal com aumento até o D5 em ambos os grupos, sem aumento significativo nos dias subsequentes, mantendo, assim, um platô (Figura 02). Esses achados foram similares aos encontrados por Davies *et al.* (2006) em ovelhas Western White Face (WWF), que verificaram aumento expressivo da área de tecido lúteal entre os dias 3 e 7, não se alterando do dia 7 ao 13. Em ovelhas da raça Finn, os mesmos autores encontraram um aumento da área lúteal do dia 3 ao 9 após a ovulação ($p < 0,05$), o qual declinou entre os dias 9 e 14 ($p < 0,05$). O padrão de crescimento da área lúteal não diferiu entre as raças, assemelhando-se ao relatado por Bartlewski *et al.* (1999). Os animais do grupo G1 tiveram uma queda acentuada na área lúteal após o D13 ($P < 0,0001$) (Figura 02). Davies *et al.* (2006) observaram essa queda significativa no dia 14 do ciclo estral em ovelhas WWF e Finn.

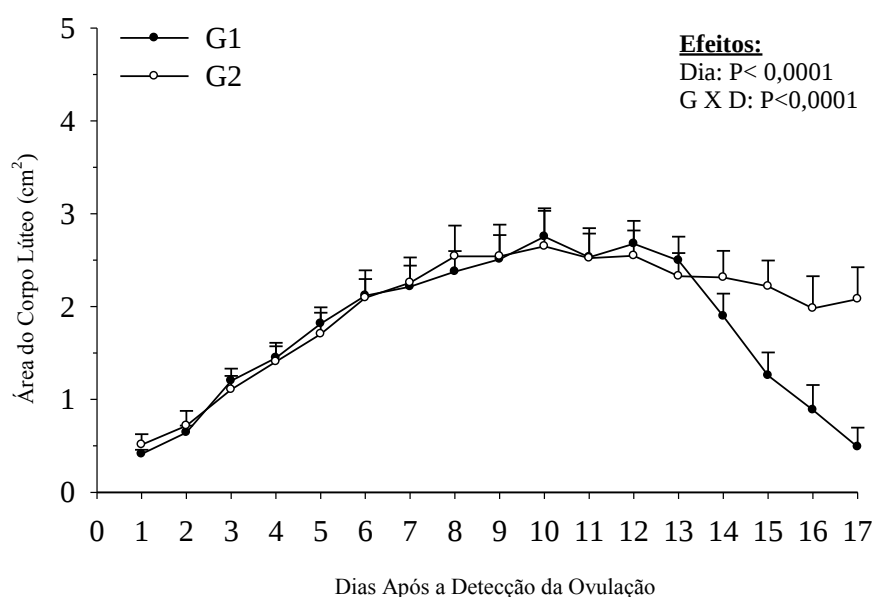


Figura 02. Área do corpo lúteo (cm²) em modo-B entre os dias D1 e D17 do ciclo estral, para os diferentes grupos de tratamento (G1 e G2).

O crescimento do CL até o D5 encontrado no presente estudo pode ser explicado pela intensa proliferação celular observada durante o período de luteogênese (Smith *et al.*, 1994) e pela hipertrofia das células esteroidogênicas luteais (Milvae *et al.*, 1996). Também se deve ao aumento das células esteroidogênicas na primeira metade do ciclo, enquanto que o número de células não-esteroidogênicas tendem a aumentar na parte posterior do ciclo (Farin *et al.*, 1986). A área luteal máxima foi de $2,71 \pm 1,32$ cm², atingida no D10 do ciclo. Gonzalez-Bulnes *et al.* (2000) observaram a área luteal máxima no dia 12 do ciclo com $1,54 \pm 0,12$ cm² em ovelhas Merino espanholas. Davies *et al.* (2006) observaram área luteal máxima de 2,00 cm² no dia 12 do ciclo, em ovelhas WWF. Já em ovelhas Finn, os mesmos autores observaram área luteal máxima de cerca de 2,30 cm² no dia 9 do ciclo. Assim, pode-se observar que a área total dos CLs foi superior às encontradas em estudos semelhantes. Tal fato pode ser justificado pela metodologia empregada neste estudo que utilizou a soma da área dos CLs em animais que tiveram múltiplas ovulações, podendo ter superestimada a área do CL.

O mesmo padrão da área do CL foi observado quanto à área FS, com crescimento até o D4 ($P < 0,0001$) para ambos os grupos, seguido por uma queda no D13 ($P < 0,0001$) para o G1 (Figura 03). Esses dados corroboram com Reynolds *et al.* (2000) que descreveram o processo

de angiogênese no CL, alcançando o máximo entre o segundo e terceiro dia após a ovulação.

Acosta *et al.* (2003) observaram que, durante o desenvolvimento do CL em bovinos, o aumento gradual na vascularização do CL na luteogênese ocorre simultaneamente com o aumento do seu volume e das concentrações de progesterona.

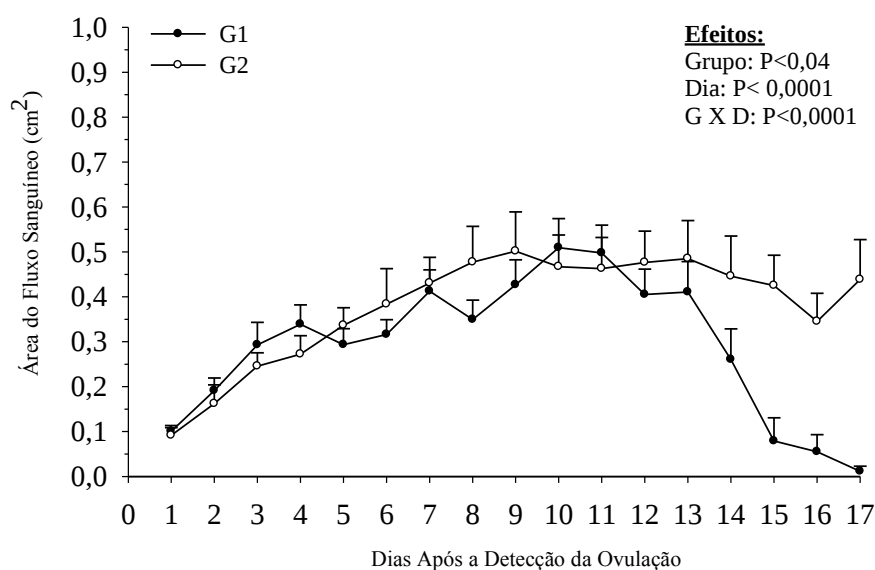


Figura 03. Área do fluxo sanguíneo (cm^2) mediante o sinal Doppler entre os dias D1 e D17 do ciclo estral, para os diferentes grupos de tratamento (G1 e G2).

Quando as medidas do fluxo sanguíneo foram transformadas em porcentagem da área total do CL (PFS), mantiveram-se constantes no G2 durante todo o experimento, ocorrendo divergência a partir do D11, atingindo significância estatística no D14 ($P < 0,0001$), sugerindo, de acordo com a vascularização, que a luteólise ocorreu após o dia 12, seguindo a progesterona (Figura 04).

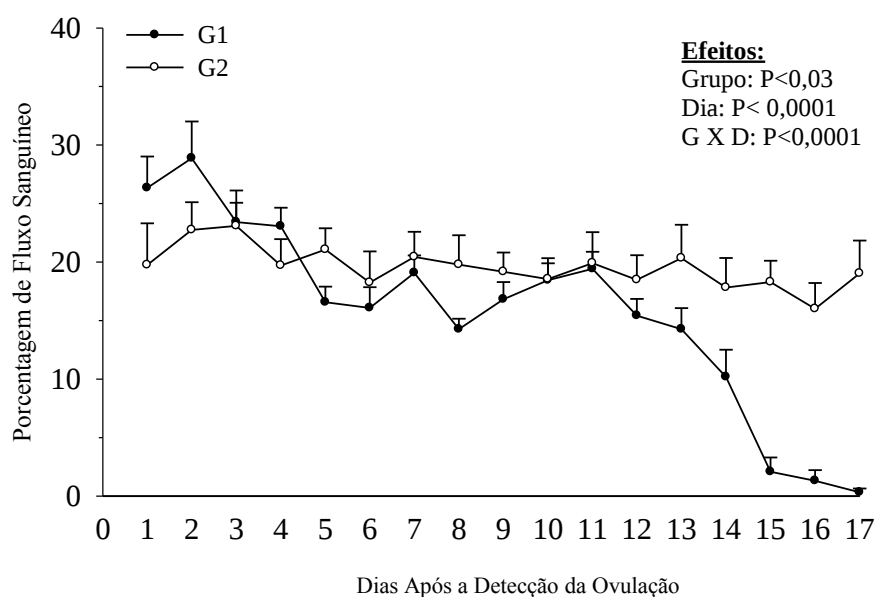


Figura 04. Porcentagem de fluxo sanguíneo dado pela razão entre a área do corpo lúteo e a área de vascularização do corpo lúteo entre os dias D1 e D17 do ciclo estral, para os diferentes grupos de tratamento (G1 e G2).

Shirasuna *et al.* (2004) utilizaram Doppler via transretal em bovinos para determinar alterações no fluxo sanguíneo do corpo lúteo durante a luteólise espontânea. No momento considerado como luteólise, em torno do dia 17 ao 18 do ciclo estral, houve aumento da vascularização dos corpos lúteos em todas as vacas examinadas ($n=8$), seguido de uma diminuição na concentração plasmática de P4 após 24 horas. Paralelamente, as concentrações plasmáticas de PGF aumentaram drasticamente quando a vascularização aumentou nos dias 17 e 18, sugerindo que a liberação pulsátil de $\text{PGF2}\alpha$ do útero estimula o aumento do fluxo sanguíneo luteal. Esses resultados demonstram que a vascularização aumenta agudamente antes de diminuir a concentração plasmática de P4 em bovinos. No presente estudo, não foi observado esse aumento de vascularização antecedendo a luteólise, pois a metodologia de avaliação foi em intervalos de 24 horas.

Após a ovulação, as concentrações plasmáticas de P4 alcançaram valores fisiológicos descritos para ovinos, com crescimento nas concentrações de P4 até o D6 ($P < 0,0001$), concordando com Mukasa-Mugerwa *et al.* (1990) que consideraram valores plasmáticos de P4 superiores a 3 ng/ml caracterizando a fase de diestro (luteal) ou gestação.

Em ovelhas da raça WWF, Davies *et al.* (2006) observaram esse aumento até o dia 5 do ciclo, não se alterando até o dia 13. Em ovelhas da raça Finn, os mesmos autores observaram aumento da progesterona até o dia 11 do ciclo, não se alterando até o dia 14, e declinando subsequentemente com a luteólise. Bartlewski *et al.* (1999), em experimento comparando as mesmas raças citadas anteriormente, observaram concentrações crescentes de progesterona até o dia 11 do ciclo, declinando no dia 13 e alcançando valores baixos no dia 15 do ciclo nas ovelhas da raça WWF. Já nas ovelhas da raça Finn, as concentrações de progesterona aumentaram até o dia 11, declinaram no dia 13 e alcançaram valores basais no dia 14. Nesse estudo, puderam observar que, apesar de as concentrações de progesterona serem maiores nas ovelhas da raça WWF do que em ovelhas da raça Finn, as áreas de tecido luteal não diferiram entre as raças. Os dados do presente estudo demonstram que as concentrações de progesterona variaram em um padrão fisiológico similar ao encontrado em outras raças, assemelhando-se mais com o padrão da raça não prolífica WWF, no qual há elevação rápida e estabilização nas concentrações de progesterona.

Considerando apenas os dados dos animais G1, foi possível observar uma queda pronunciada na concentração plasmática de P4 no D12 ($P < 0,0001$), caracterizando o início do processo de luteólise natural (Figura 05).

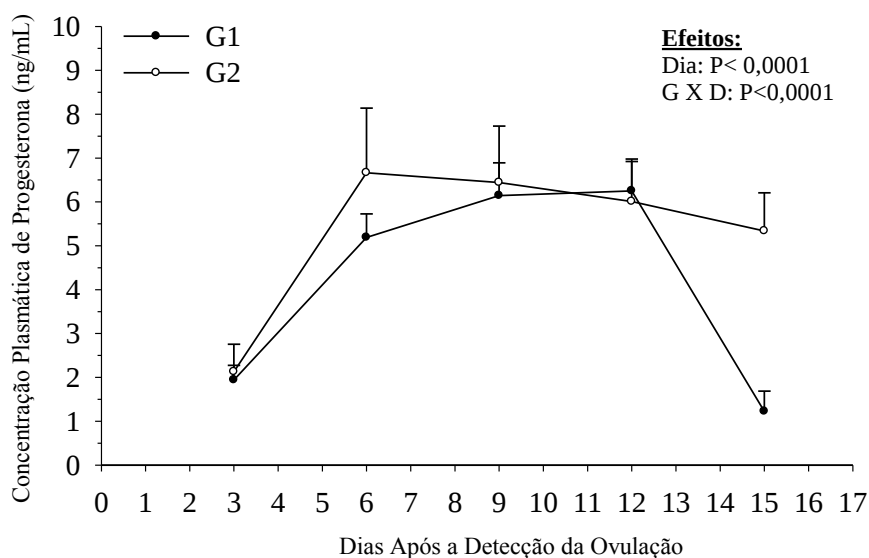


Figura 05. Concentração plasmática de progesterona nos dias D3, D6, D9, D12 e D15 do ciclo estral, para os diferentes grupos de tratamento (G1 e G2).

A queda pronunciada das concentrações de progesterona após a luteólise foi também

observada por outros autores. Contreras-solis *et al.* (2008) observaram queda acentuada 72 horas antes da nova ovulação, alcançando valores menores que 1 ng nas últimas 24 horas. Davies *et al.* (2006) observaram diminuição significativa da progesterona no dia 14 do ciclo em ovelhas da raça WWF, e a partir do dia 11 em ovelhas da raça Finn. Bartlewski *et al.* (1999) trabalhando com as mesmas raças, observaram declínio no dia 13 em ovelhas WWF e Finn, alcançando valores abaixo de 0,5 ng/mL no dia 15 e 14, respectivamente.

A queda na concentração plasmática de P4 foi repentina, quando comparada à redução gradual observada na área de tecido luteal, demonstrando a diferença temporal entre a luteólise funcional e estrutural evidenciada em estudos anteriores em ovinos (Bartlewski *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 2006; Contreras-Solis *et al.*, 2008). Os dados deste estudo e dos autores supracitados comprovam que no processo de luteólise, o CL perde a capacidade esteroidogênica (luteólise funcional) abruptamente e inicia o processo de regressão (luteólise estrutural) gradualmente.

CONCLUSÕES

A utilização da ultrassonografia em modo Doppler colorido (transdutor de 7,5 MHz) é uma potencial ferramenta de avaliação da função luteal em ovinos, permitindo melhor acurácia na identificação e na mensuração do corpo lúteo e de sua vascularização no acompanhamento da dinâmica luteal.

Os dados sugerem também que há uma íntima associação entre a vascularização lúteo e o potencial de produção de progesterona, uma vez que a rede vascular disponibiliza oxigênio, nutrientes, hormônios e substratos necessários à esteroidogênese.

AGRADECIMENTOS

FAPEMIG, CNPq, EMBRAPA/CENARGEN e I. F. de Educação, Ciências e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Muzambinho.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, T.J. YOSHIKAWA, N.; OHTANI, M. *et al.* Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F_{2α} injection in the cow. *Biol. Reprod.*, v.66, p.651-658, 2002.

ACOSTA, T.J.; HAYASHI, K.G.; OHTANI, M. *et al.* Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*, v.125, 759–767, 2003.

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 82-83, p. 127-140, 2004.

APARECIDO, L.E.O.; SOUZA, P.S. *Boletim Climático n9*. Muzambinho: IFSULDEMINAS – campus Muzambinho, 6 p, 2013. (Verificar)

BARTLEWSKI, P.M.; BABY, T.E.; GIFFIN, J.L. Reproductive cycles in sheep. *Anim. Reprod. Sci.*, v.124, p. 259–268, 2011.

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P; COOK, S.L. *et al.* Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrus cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J. Reprod. Fert.*, v.115, p.111-124, 1999.

BELTRAME, R.T.; COVRE, C.; LITTIG, L.B. *et al.* Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in ewes during pregnancy. *Theriogenology*, v.91, p.55-61, 2017.

BERTAN, C.M.; BINELI, M.; MADUREIRA, E.H. *et al.* Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.43, p.824-840, 2006.

BOLLWEIN, H.; MEYER, H.H.; MAIERL, J. *et al.* Transrectal doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle. *Theriogenology*, v.53, p.1541–1552, 2000.

CAVALCANTI, A.S.; BRANDÃO, F.Z.; NOGUEIRA, L.A. *et al.* Effects of GnRH administration on ovulation and fertility in ewes subjected to estrous synchronization. *Rev. Bras. Zoot.*, v.41, n.6, 2012.

CONTRERAS-SOLIS, I.; DIAZ, T.; LOPEZ, G. *et al.* Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in hair breed sheep. *Anim. Reprod. Scie.*, v.104, p.47- 55, 2008.

DAVIES, K.L.; BARTEWSKI, P.M.; PIERSON, R.A. *et al.* Computer-assisted image analyses of corpora Luteal in relation to peripheral concentrations of progesterone: a comparison between breeds of sheep with different ovulation rates. *Anim. Rep. Sci.*, v.96, p.165–175, 2006.

DIAS, E.F.; LOPES JÚNIOR, E.S.; VILLAROEL, A.B.S. *et al.* Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica equina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot*, v.53, n.5, p.618-623, 2001.

DUGGAVATHI, R., BARTLEWSKIB, P.M., BARRETT, D.W. *et al.* Use of high-resolution trans rectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. *Theriogenology*, v.60, n.3, p.495-510, 2003.

EVANS, A.C.O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim. Rep. Sci.*, v.78, p.289–306, 2003.

FARIN, C.E.; MOELLER, H.R.; SAWYER, F. *et al.* Morphometric analysis of cell types ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol. Rep.*, v.35, p.1299-1308, 1986.

GONZALEZ F.H.D. *Introdução à Endocrinologia Reprodutiva Veterinária*. Apostila UFRGS, 87p. 2002.

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; GOMEZ-BRUNET, A. *et al.* Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. *Reprod. Dom. Anim.*, v.35, p.65-68, 2000.

GORDON, I. *Controlled reproduction in sheep and goats*. Cambridge, UK: University Press, 450p. 1997. (Verificar)

GRIFFIN P.G.; GINTHER O.J. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. *J. Anim. Scie.*, v.70, p.953-972, 1992.

HUSEIN, M.Q.; KRIDLI, R.T. Effect of progesterone prior to GnRH-PGF2 α treatment on induction of oestrus and pregnancy in anoestrous Awassi ewes. *Rep. Dom. Anim.*, v.38, p.228-232, 2003.

KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; GINTER, O.J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, v.33, n.6, p.1269-1278, 1990.

MILLER, B.G.; MOORE, N.W. Effects of progesterone and oestradiol on RNA and protein metabolism in the genital tract and on survival of embryos in the ovariectomized ewe. *Aust. J. Biol. Scie.*, v.29, p.565-573, 1976.

MILVAE, R.A.; HINCKLEY, S.T.; CARLSON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, v. 45, p.1327-1350, 1996.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B. *et al.* Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Dom. Anim. Endocrin.*, v.29, p.329-339, 2006.

MOLENTO, M.B.; TASCA, C.; GALLO, A. *et al.* Método FAMACHA como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. *Ciênc. Rural*, v.34, n.2, p.1139-1145, 2004.

MUKASA-MUGERWA, E.; EZAZ, Z.; VIVIANI, P. Plasma concentration of progesterone during oestrous cycles of Ethiopian Menz sheep using radioimmunoassay. *Small Rum. Res.*, v.3, p. 57-62, 1990.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, L.J.; SILVA, P.J. *et al.* Mechanism controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.*, v.80, p.1-9, 2000.

OLIVEIRA, M.E.; FELICIANO, M.A.; D'AMATO, C.C. *et al.* Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. *Anim. Rep. Scie.*, v.144, p.30-37, 2014.

PIETERSE, M. C.; TAVERNE, M.A.M.; KRUIP, A.M. *et al.* Detection of corpora lutea and

follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. *Vet. Record*, v.126, p.552–554, 1990.

REYNOLDS, L.P.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine*, v.12, p.1-9, 2000.

RIBEIRO, S.D.A. *Caprinocultura: criação racional de caprinos*. São Paulo: Nobel, 1997.

ROSA, H.J.D.; BRYANT, M.J., Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rum. Res.*, v.48, p.155–171, 2003.

SÁ JUNIOR, A.; CARVALHO, L.G.; SILVA, F.F. *et al.* Application of the Köppen classification for climatic zoning in the state of Minas Gerais, Brazil. *Theor. Applied Climat.*, v.108, p.1-7, 2012.

SHIRASUNA, K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B.; WATANABE, S. *et al.* A blood flow in the corpus luteum acutely increases together with endothelin-1 mRNA expression at early stage of regression during spontaneous luteolysis in the cow. *Biol. Rep.*, v.71, 2004.

SINGH, J.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; Promise of new image technologies for assessing ovarian function. *Anim. Reprod. Scie.*, v.78, p.371-399, 2003.

SMITH, M.F.; McINTUSHI, E.W.; SMITH, G.W. Mechanism associated with corpus luteum development. *J. Anim. Scie.*, v.72, p.1857-1872, 1994.

VIÑOLES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G. *et al.* Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*, v.55, p.993-1004, 2001.

WILMUT, I.; SALES, D.I.; ASHWORTH, C.J. The influence of variation in embryo stage and maternal hormone profiles on embryo. *Theriogenology*, v.23, p.107-119, 1985.

CAPÍTULO 3

Diagnóstico precoce de gestação de ovinos através da ultrassonografia do corpo lúteo com Doppler colorido

[Early diagnosis of pregnancy in sheep through ultrasound of the corpus luteum color Doppler]

L. B. Rizzoni¹, J.P. Neves¹

¹Unifenas – Universidade José Rosário Vellano

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar a confiabilidade da ultrassonografia em modo Doppler colorido, como diagnóstico preditivo de ovelhas não gestantes 17 dias após cobertura por meio do padrão vascular do corpo lúteo. Foram utilizadas 63 ovelhas cruzadas Dorper com Santa Inês. O diagnóstico de gestação no D17 (DG17) classificou os animais como Gestantes, para os que apresentaram alguma área de fluxo sanguíneo (FS) no corpo lúteo (CL) e Não-gestantes, para aqueles que não apresentaram nenhuma área de FS no CL. No D30, o diagnóstico de gestação (DG30) foi confirmado por ultrassonografia em modo-B. O DG30 foi comparado retrospectivamente com o DG17. Os parâmetros de desempenho do diagnóstico baseado na área de FS tiveram uma sensibilidade de 100,0%; especificidade de 80,0%; valor preditivo negativo 100,0%; valor preditivo positivo de 73,3% e acurácia de 87,1%. A proporção de falso positivo foi 12,9% (8/62), causado por ciclos longos e perdas embrionárias precoce, e a de falso negativo foi de 0,0% (0/62). O presente estudo demonstrou que a utilização da ultrassonografia em modo Doppler colorido traz vantagens adicionais para a ultrassonografia em modo-B e é uma potencial ferramenta para o diagnóstico precoce de gestação em ovinos, permitindo melhor acurácia no diagnóstico de animais não gestantes no DG17.

Palavras-chave: fluxo sanguíneo; ovelha; especificidade; valor preditivo.

ABSTRACT

The objective of the present study was to determine the reliability of color Doppler ultrasonography, as a predictive diagnosis of non-pregnant ewes 17 days after coverage through the vascular pattern of the corpus luteum. 63 Dorper crossbred sheep were used with Santa Inês. The diagnosis of pregnancy in D17 (DG17), classified the animals as Pregnant, for those who presented some area of blood flow (FS) in the corpus luteum (CL) and Non-pregnant, for those who did not present any FS area in CL. In D30 the diagnosis of gestation (DG30) was confirmed by B-mode ultrasonography. DG30 was compared retrospectively with DG17. The diagnostic performance parameters based on the FS area had a sensitivity of 100.0%; specificity of 80.0%; negative predictive value 100.0%; positive predictive value of 73.3% and accuracy of 87.1%. The proportion of false positive was 12.9% (8/62), caused by long cycles and early embryonic losses, and the false negative rate was 0.0% (0/62). The present study demonstrated that the use of color Doppler ultrasonography offers additional advantages in B-mode ultrasonography and is a potential tool for the early diagnosis of gestation in sheep, allowing a better accuracy in the diagnosis of non-pregnant animals in DG17.

Keywords: blood flow, sheep, specificity, predictive value.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico de gestação é um estágio crítico do manejo reprodutivo de qualquer sistema de produção animal. A identificação de fêmeas não gestantes é de suma importância para a tomada de decisão em relação à situação da matriz no rebanho. Quanto mais cedo a gestação for diagnosticada, mais cedo a ovelha poderá ser reencaminhada ou descartada da reprodução, minimizando os prejuízos financeiros. Dessa forma, um método de diagnóstico de gestação precoce, preciso e viável é essencial para otimizar o desempenho reprodutivo do rebanho. A observação do retorno de estro após os protocolos reprodutivos é o método mais simples e, possivelmente, o mais amplamente utilizado para detectar animais não gestantes, entretanto, as ovelhas têm o seu ciclo estral pouco definido, podendo variar de 14 a 19 dias (Baird *et al.*, 1976; Senger, 2005). Além disso, o diagnóstico preditivo de gestação, baseado no retorno ao estro, necessita do uso de rufiões e geralmente é trabalhoso. Esse método também não pode

ser aplicado fora da estação reprodutiva, visto que muitas ovelhas entram em anestro após os protocolos de indução e de sincronização de estro (Ungerfeld *et al.*, 2003). A dosagem da concentração de progesterona plasmática é precisa para detectar animais não gestantes nos dias 16 a 18 após a cobertura (McPhee e Tiberghien, 1987; Susmel e Piasentier, 1992), entretanto é altamente dispendiosa, requer suporte laboratorial e não fornece resultados em tempo real. Por isso, não é uma ferramenta prática para o gerenciamento reprodutivo em condições a campo (Barbagianni *et al.*, 2017).

A ultrassonografia é uma técnica segura e não invasiva que fornece resultados em tempo real com base na interpretação direta das imagens. Atualmente, dentro das técnicas de imagem, é o método mais utilizado para diagnóstico de gestação em condições de campo. Embora a gestação em ovinos possa ser reconhecida em torno dos 17 a 19 dias após a cobertura utilizando o ultrassom em Modo-B, somente a partir do dia 25 os resultados são precisos e confiáveis (Garcia *et al.*, 1993). O potencial da ultrassonografia em modo Doppler colorido para o manejo reprodutivo em animais de produção foi inicialmente demonstrado no início dos anos 2000 (Bollwein *et al.*, 2000; Miyamoto *et al.*, 2006). Desde então, vários estudos foram realizados demonstrando que a técnica pode ser usada com sucesso para avaliar a vascularização de vários órgãos e estruturas reprodutivas (Oliveira *et al.*, 2014; Beltrame *et al.*, 2017), incluindo o corpo lúteo (Acosta e Miyamoto, 2004). A vascularização do corpo lúteo diminui simultaneamente com a concentração plasmática de progesterona, indicando que o início do processo de luteólise (McCracken *et al.*, 1999) e, conseqüentemente, a fertilização ou o processo de estabelecimento da gestação não ocorreram.

O objetivo do presente estudo foi determinar a confiabilidade da ultrassonografia em modo Doppler colorido, como diagnóstico preditivo de ovelhas não gestantes no 17º dia após cobertura através do padrão vascular do corpo lúteo.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos do experimento foram conduzidos seguindo os preceitos de bem-estar animal e submetidos ao Comitê de Ética (CEUA) sob o número 24 A/2016. O experimento foi realizado no Departamento de Ovinocultura do Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Câmpus Muzambinho – MG, no

período compreendido entre os meses de novembro de 2016 a fevereiro de 2017. O clima da região é temperado úmido com inverno seco e verão moderadamente quente (Cwb), segundo a classificação de Köppen (Sá Júnior, 2012), com temperatura média anual de 18°C, precipitação média anual de 1.605 milímetros (Aparecido e Souza, 2013) e altitude média de 1.013 metros.

Foram utilizadas 63 ovelhas cruzadas Dorper com Santa Inês, com idade entre 10 e 48 meses, peso médio de $45,7 \pm 6,4$ kg de peso vivo e escore de condição corporal médio de $4,00 \pm 0,48$ em uma escala de 0 a 5 (Ribeiro, 1997); 1 reprodutor Santa Inês PO de 16 meses e 58 kg de peso vivo; 1 reprodutor Dorper PO de 36 meses e 52 kg de peso vivo e 1 reprodutor White Dorper PO de 36 meses e 48 kg de peso vivo; o escore de condição corporal dos reprodutores foi de $4,25 \pm 0,25$ (0 a 5, Ribeiro, 1997). Os animais foram alocados em um sistema de manejo semi-intensivo com acesso ao pasto de capim Mombaça (*Panicum maximum* cv. Mombaça), diariamente, das 8 às 17horas, e suplementação média por animal com 1 kg de silagem de milho e 400 g concentrado comercial (Algomix Ovinos e Caprinos® – Algomix. Brasil) no período da tarde. Água e sal mineral foram fornecidos à vontade.

Todos os animais passaram por inspeção dos cascos e das mucosas, os endoparasitos foram avaliados semanalmente pelo método FAMACHA (Molento *et al.*, 2004) e mensalmente pelo OPG (ovos por grama de fezes) e OOPG (oocistos por grama de fezes). Previamente, o útero e os ovários foram avaliados para o descarte de possíveis patologias já existentes com o auxílio de um ultrassom (DP-2200Vet®, Mindray. China), equipado com um transdutor linear de 5,0 MHz, acoplado a uma haste plástica para permitir o acesso pela via transretal; todos os exames foram realizados pelo mesmo técnico.

Os animais foram submetidos à sincronização de estro por meio da utilização esponjas intravaginais, impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) (Progespon® - Zoetis. Brasil), introduzidas no dia 0 (D0) e retiradas no D9. No D7, os animais receberam 400 UI de eCG/ animal (Novormon® - Zoetis. Brasil) e 0,133 mg de cloprostenol sódico/ animal (Ciosin® - MSD Saúde Animal. Brasil) via intramuscular (protocolo descrito na Figura 1). Quatro horas após o final do protocolo, as ovelhas foram colocadas com dois reprodutores portando aventais na região abdominal ventral para evitar a cópula e atuarem como rufiões, para detecção do estro, durante duas horas, duas vezes ao dia, por três dias. O estro foi definido como o momento em que a fêmea aceitou a monta. Foram

observadas as seguintes variáveis: taxa de repetição de estro (%), intervalo entre o fim do protocolo e o início do estro (horas) e duração do estro (horas).

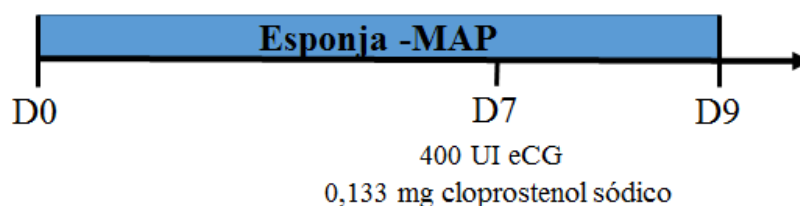


Figura 01. Protocolo de sincronização de estro.

Após a sincronização, 34 animais foram cobertos por três machos sexualmente maduros e aptos para a reprodução sendo que 29 ovelhas tiveram apenas o estro monitorado. Paralelamente, uma amostra do total de animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: G1 (n=20, somente rufiados) e G2 (n=9, cobertas). A avaliação ovariana foi realizada através de um aparelho de ultrassonografia portátil com a função Doppler colorido (Sonoscape S2V®, SonoScape, Shenzhen, China), equipado com um transdutor linear de 7,5 MHz, acoplado a uma haste plástica para permitir o acesso pela via transretal. As avaliações dos ovários foram feitas nos dias D7, D12 e D17. O D0 foi considerado o dia em que houve a ovulação, determinada pela ausência do folículo dominante. A última medida do folículo dominante em seu maior diâmetro foi considerada como diâmetro ovulatório. A ultrassonografia em modo-B foi utilizada para localizar o CL e mensurar a área do tecido lúteal (cm²) em seu maior diâmetro, considerada como diferença entre a área lúteal total, menos a área da cavidade, quando presente. Animais com múltiplas ovulações tiveram as áreas dos CLs somadas. O modo Doppler colorido foi utilizado para a determinação do fluxo sanguíneo lúteal através da área de vascularização. Todas as medidas foram calculadas por recursos do próprio aparelho. O percentual de vascularização foi dado pela razão da área do CL pela área de vascularização do CL.

Amostras de sangue foram coletadas para dosagem de progesterona, nos dias D3, D6, D9, D12 e D15, por meio da venopunção da jugular, em tubos vacuolizados de 5 mL (Vacutainer® - BD. Brasil) sem anticoagulantes; estes, após a coleta, foram acondicionados a 5° C até a dessoragem; logo após, o soro foi aspirado e estocado em tubetes plásticos à temperatura de 20 °C negativos até a análise. As concentrações plasmáticas de progesterona foram determinadas pela técnica de eletroquimioluminescência através do equipamento

Elecsys® (Roche Diagnóstica Brasil LTDA. Brasil) utilizando kits comerciais (Progesterona III, Roche Diagnóstica Brasil LTDA. Brasil) no Laboratório de Física do Exercício do Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Sul de Minas Gerais (Muzambinho-MG).

No D17, todos os animais (n=63) foram submetidos ao diagnóstico preditivo de gestação pela via transretal, através de um aparelho de ultrassonografia portátil com a função Doppler colorido (Sonoscape S2V®, SonoScape, Shenzhen, China), equipado com um transdutor linear de 7,5 MHz, acoplado a uma haste plástica. Foi utilizado o modo-B para a localização do corpo lúteo e o modo Doppler colorido para a avaliação do fluxo sanguíneo. Os animais foram classificados como Gestantes, para os que apresentaram alguma área de fluxo sanguíneo no CL e Não-gestantes, para aqueles que não apresentaram nenhuma área de fluxo sanguíneo no CL (Figura 2). No D30, o diagnóstico de gestação (DG30) foi confirmado por ultrassonografia em modo-B com a visualização do batimento cardíaco fetal.

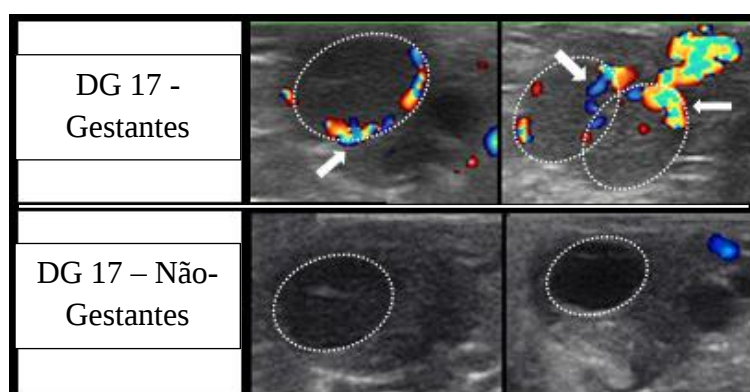


Figura 02. Diagnóstico de gestação de acordo com a área de fluxo sanguíneo no corpo lúteo.

Os dados foram analisados pelo PROC MIXED multivariável do SAS 9.3 (SAS Institute Ind., Cary, NC 27512-8000, EUA), utilizando teste T para efeito de grupo e teste LSD para efeito de dia e interação de grupo x dia. O nível de significância foi considerado $P < 0,05$.

O DG30 foi comparado retrospectivamente com o DG17, gerando resultados de verdadeiro-positivos (VP), verdadeiro-negativos (VN), falso positivos (FP) e falso-negativos (FN) que foram inseridos em uma tabela de contingência 2x2.

A sensibilidade (SEN), especificidade (ESP), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo

negativo (VPN) e acurácia (ACC) do DG17 foram calculados com as seguintes equações: $SEN = VP / (VP + FN) * 100$; $ESP = VN / (FP + VN) * 100$; $VPP = VP / (VP + FP)$; $VPN = VN / (FN + VN)$; e $ACC = (VP + VN) / n \text{ total}$. O teste Kappa foi aplicado para avaliar a concordância entre os diagnósticos de gestação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de repetição de estro para os animais que não foram cobertos ($n=29$) foi de 86,20% (25/29). A duração do ciclo estral nesses animais foi de $17,68 \pm 0,53$ dias entre estros, e $17,33 \pm 0,66$ dias entre ovulações, semelhante à duração média do ciclo estral em ovinos de 16 a 17 dias, verificado por Gordon (1997), Rosa e Bryant (2003) e Bartlewski *et al.* (2011).

O intervalo entre a retirada das esponjas até a manifestação de estro foi de $38,48 \pm 12,96$ horas. Esse intervalo foi inferior ao observado por Viñoles *et al.* (2001) em um protocolo curto (6 dias) de sincronização com progestágenos e eCG ($84,80 \pm 7,10$), porém um pouco abaixo do protocolo longo (12 dias), proposto pelos mesmo autores com e sem a utilização de eCG ($44,6 \pm 2,5$ e $49,00 \pm 3,00$, respectivamente) em ovelhas da raça Polwarth, e um pouco acima ao estudo de Cavalcanti *et al.* (2012), que verificaram intervalo de $32,90 \pm 7,40$ horas em ovelhas na mesma região geográfica.

A duração média do estro foi de $21,84 \pm 8,85$ horas, pouco inferior ao valor encontrado por Cavalcanti *et al.* (2012) de $37,40 \pm 9,00$ horas. O menor período de estro no presente experimento pode ser justificado pelo uso do eCG, porque esta gonadotrofina estimula o desenvolvimento folicular, aumentando o recrutamento de folículos pequenos (Evans *et al.*, 2003), elevando a concentração de estrógeno e LH, que atuam diretamente na duração do estro (Husein e Kridli, 1998; Dias *et al.*, 2000).

O diâmetro médio dos folículos ovulatórios foi de $6,67 \pm 1,05$ mm e variou numa amplitude de 4,0 a 9,0. Esse resultado assemelha-se a outros já observados na literatura. Duggavathi *et al.* (2003) relatou folículos pré-ovulatórios de $6,00 \pm 0,30$ mm e Cavalcanti *et al.* (2012) de $6,40 \pm 0,70$ mm. O diâmetro dos folículos ovulatórios pode variar em função da taxa de prolificidade das ovelhas. Bartlewski *et al.*, (1999), em seu estudo, observaram que ovelhas não prolíficas possuíam folículos maiores do que ovelhas prolíficas, $6,40 \pm 0,20$ vs $5,30 \pm 0,20$ mm, respectivamente ($P < 0,001$).

Houve efeito de dia sobre a área de tecido lúteal, os animais do G1 demonstraram um declínio na área do CL, do D7 para o D17 ($P<0,02$), divergindo do G2 no D12 ($P<0,004$ – Figura 01). Esse fato pode ser justificado pela ocorrência da luteólise. Davies *et al.* (2006) obtiveram dados semelhantes com ovelhas da raça Western White Face (WWF) e Finn, com uma queda acentuada na área do CL no dia 14 do ciclo estral.

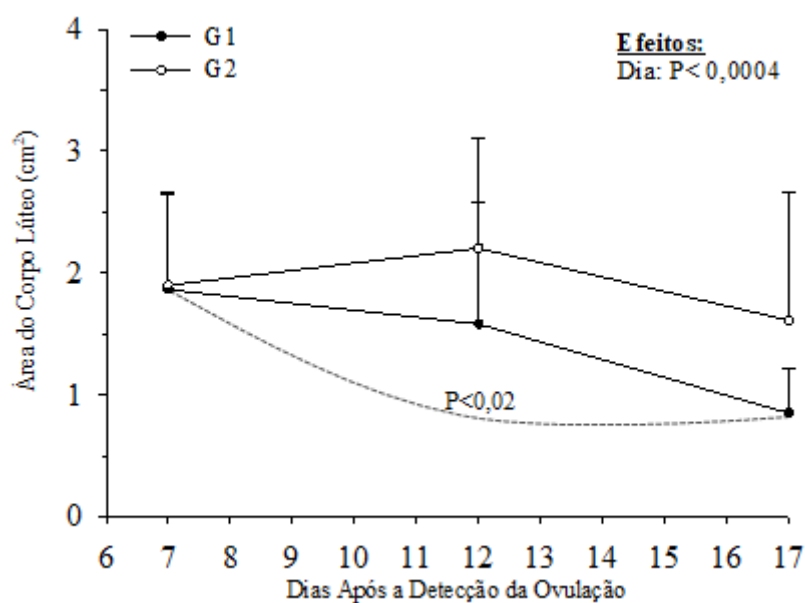


Figura 03. Área do corpo lúteo (cm^2) em modo-B entre os dias D7, D12 e D17 do ciclo estral, para os diferentes grupos de tratamento (G1 e G2).

O mesmo padrão da área do CL foi observado quanto à área FS, com divergência entre os grupos no D12, seguido por uma queda ($P<0,0001$) para o G1 (Figura 02).

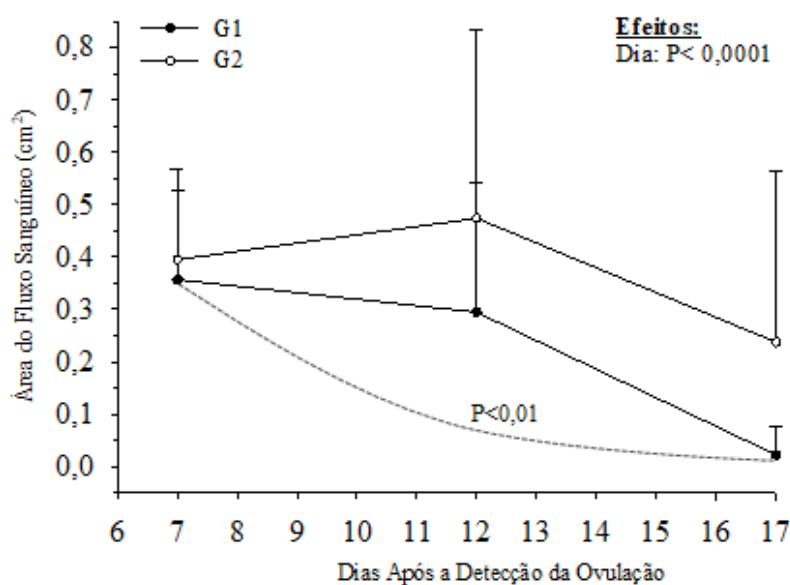


Figura 04. Área do fluxo sanguíneo (cm^2) mediante o sinal Doppler nos dias D7, D12 e D17 do ciclo estral, para os diferentes grupos de tratamento (G1 e G2).

Quando as medidas do fluxo sanguíneo foram transformadas em porcentagem da área total do CL (PFS), as medidas mantiveram-se constantes no G2 durante todo o experimento, ocorrendo divergência após o D12 ($P < 0,0001$), com uma queda significativa ($P < 0,05$) no percentual de fluxo sanguíneo do CL para os animais deste grupo (Figura 05).

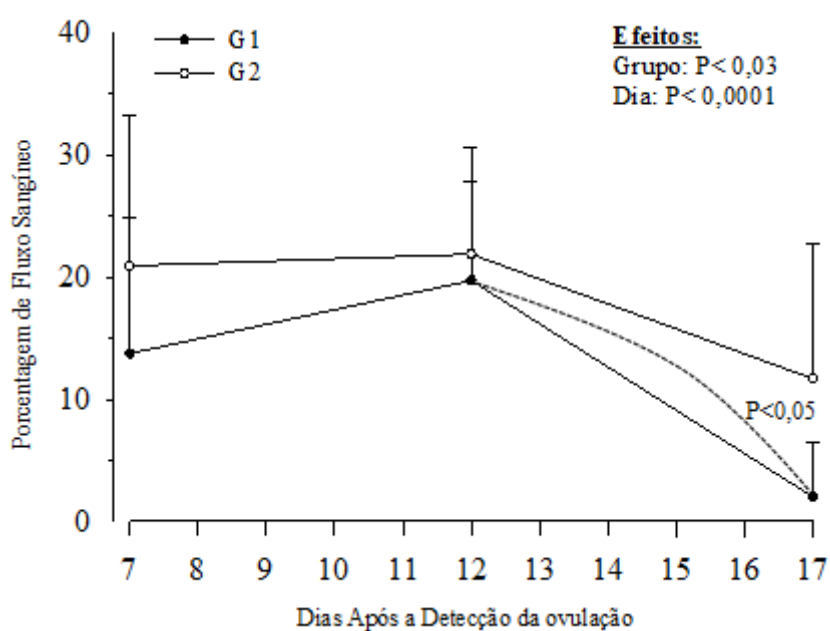


Figura 5. Porcentagem de fluxo sanguíneo dado pela razão entre a área do corpo lúteo e a área de vascularização do corpo lúteo nos dias D7, D12 e D17 do ciclo estral, para os diferentes grupos de tratamento (G1 e G2).

Os dados discrepantes (*out liers*) de progesterona foram desconsiderados quando as concentrações plasmáticas de progesterona foram maiores que a média de 14,6 ng/mL (duas vezes o valor do desvio padrão (5/145 – 3,0%)).

Após a ovulação, as concentrações plasmáticas de P4 alcançaram valores fisiológicos descritos para ovinos, com crescimento nas concentrações de P4 até o D6 ($P < 0,0001$), concordando com Mukasa-Mugerwa *et al.* (1990) que consideram valores plasmáticos de P4 superiores a 3 ng /mL caracterizando a fase de diestro (luteal) ou gestação.

Em ovelhas da raça WWF, Davies *et al.* (2006) observaram esse aumento até o dia 5 do ciclo, não se alterando até o dia 13. Em ovelhas da raça Finn, os mesmos autores observaram aumento da progesterona até o dia 11 do ciclo, não se alterando até o dia 14, e declinando subsequentemente com a luteólise.

Considerando apenas os dados dos animais G1, foi possível observar uma queda pronunciada na concentração plasmática de P4 no D9 ($P < 0,0001$), caracterizando o início do processo de luteólise (Figura 06).

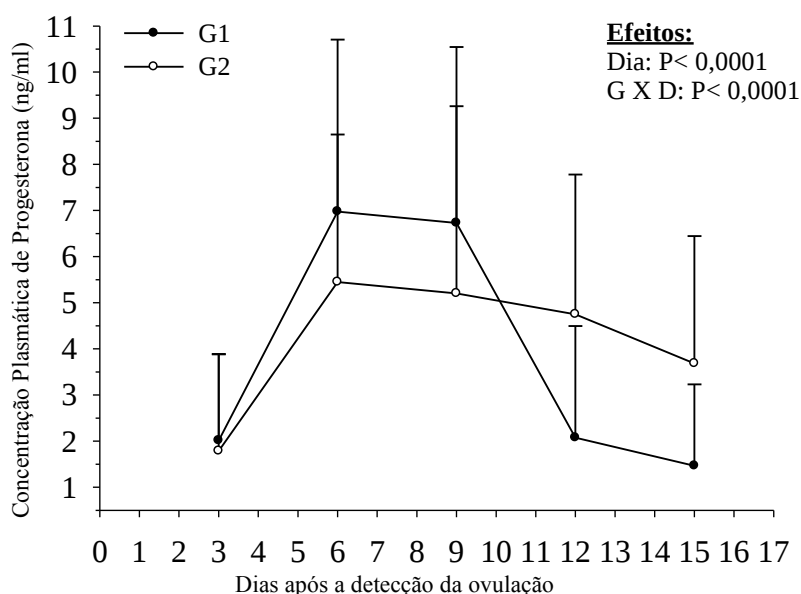


Figura 06. Concentração plasmática de progesterona nos dias D3, D6, D9, D12 e D15 do ciclo

estral, para os diferentes grupos de tratamento (G1 e G2).

A queda pronunciada das concentrações de progesterona após a luteólise foi também observada por outros autores. Contreras-Solis *et al.* (2008) observaram queda acentuada 72 horas antes da nova ovulação, alcançando valores menores que 1 ng nas últimas 24 horas. Davies *et al.* (2006) observaram diminuição significativa da progesterona no dia 14 do ciclo em ovelhas da raça WWF e, a partir do dia 11, em ovelhas da raça Finn.

Os animais classificados como Gestantes (n=30) no DG17 apresentaram uma área do CL ($2,10 \pm 1,10 \text{ cm}^2$) superior ($P < 0,05$) à área do CL dos animais Não-gestantes (n=32) ($0,5 \pm 0,6 \text{ cm}^2$), sugerindo que os animais não gestantes já apresentavam o CL em estado de luteólise. Da mesma forma, ocorreu para a área de fluxo sanguíneo (Gestantes $0,37 \pm 0,33 \text{ cm}^2$; Não-gestantes $0,00 \pm 0,00 \text{ cm}^2$ – $P < 0,05$) e percentual de fluxo sanguíneo (Gestantes $17,1 \pm 10,0 \%$; Não-gestantes $0,0 \pm 0,0 \%$ – $P < 0,05$). A $\text{PGF}_{2\alpha}$, liberada durante o processo de luteólise, é um potente vasoconstritor, proporcionando uma redução significativa no fluxo sanguíneo do CL (Weems *et al.*, 2006) levando à destruição funcional do CL (Siqueira, 2007). Os níveis de P4 dependem do fluxo sanguíneo presente no CL, que pode ser quantificado de forma confiável por ultrassonografia Doppler colorido, mostrando uma correlação positiva entre a área de vascularização do CL e as concentrações plasmáticas de P4 (Acosta *et al.*, 2002).

Tabela 01 – Tabela de contingência Predição de Gestação (Dia 17) vs. Diagnóstico de Gestação (Dia 30).

Predição Gestação (D17)	Diagnóstico gestação (Dia 30)		
	Gestante	Não gestante	Total
Gestante	VP (n=22)	FP (n=8)	VP+FP (n=30)
Não gestante	FN (n=0)	VN (n=33)	FN+VN (n=33)
Total	VP+FN (n=22)	FP+VN (n=41)	N Total (n=63)

VP – verdadeiro positivo; FP – falso positivo; FN – falso negativo; VN – verdadeiro negativo; N – número.

Os parâmetros de desempenho do diagnóstico baseado na área de fluxo sanguíneo tiveram uma sensibilidade (SEN) de 100,0% e especificidades (ESP) de 80,5%. Segundo De Vries *et al.* (2005), a SEN da técnica de diagnóstico de gestação deve estar sempre próxima aos 100%, assim como o valor preditivo negativo (VPN) de gestação, reduzindo, assim, as chances de

haver diagnósticos falsos negativos (FN) (Romano, 2004). Portanto, para aumentar a precisão do diagnóstico precoce de não gestação, um procedimento com alto VPN que minimiza os FN se faz necessário (Romano *et al.*, 2006).

O valor preditivo positivo (VPP) foi de 73,3% com 12,7% (8/63) de animais falsos positivos, provavelmente pela ocorrência de ciclos longos e de perdas embrionárias precoces. Segundo Nation *et al.* (2003), o diagnóstico de gestação antes do D30 é considerado precoce e pouco confiável, devido ao risco de perdas embrionárias, entretanto o VPN foi de 100,0%, igual ao desejável para a técnica. É importante que os animais que forem diagnosticadas não gestantes sejam verdadeiramente não gestantes, principalmente nos casos em que os animais forem posteriormente submetidos a procedimentos de manipulação de estro, pois a maioria dos protocolos utilizam PGF2 α . Se os animais fossem falsamente diagnosticados como não gestantes, iriam abortar (Fricke, 2002; De Vries *et al.*, 2005).

A acurácia (ACC) foi de 87,3%, superior ao trabalho de Ayres (2012) que, ao utilizar a mesma técnica de diagnóstico preditivo com Doppler colorido em bovinos no DG20, obteve 74,5% de ACC, superior ainda aos resultados de Pieterse *et al.* (1990), que utilizaram o modo-B para a avaliação uterina de vacas leiteiras do D21 ao D25 após IA (65%), sugerindo que a avaliação do CL é mais eficiente que a uterina para o diagnóstico precoce de gestação. Além disso, de acordo com Perry *et al.* (1990), existem dificuldades na diferenciação do fluido fisiológico intraluminal uterino do estro e do proestro com o córion alantoide entre 18 e 21 dias e, com isso, afirmaram que o tempo mínimo para alcançar eficiência no diagnóstico são após o D25. A acurácia tende aumentar com a evolução tecnológica e com a melhora dos equipamentos utilizados para a avaliação com o Doppler colorido (Ayres, 2012).

Os resultados demonstram que há uma boa concordância entre os diagnósticos do DG17 e DG30, com um teste Kappa de 0,74 que, quanto mais próximo de 1,00, mais perfeito se torna o acordo entre as amostras.

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a utilização da ultrassonografia em modo Doppler colorido traz vantagens adicionais para a ultrassonografia em modo-B e é uma potencial ferramenta de avaliação da função luteal, assim como para o diagnóstico precoce de gestação em ovinos,

permitindo melhor acurácia no diagnóstico de animais não gestantes no DG17.

AGRADECIMENTOS

FAPEMIG, CNPq, EMBRAPA/CENARGEN e I. F. de Educação, Ciências e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Muzambinho.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T.J. YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M. *et al.* Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F₂ α injection in the cow. *Biol. Reprod.*, v.66, p.651-658, 2002.
- ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 82-83, p. 127-140, 2004.
- APARECIDO, L.E.O.; SOUZA, P.S. Boletim Climático n9. Muzambinho: IFSULDEMINAS – campus Muzambinho, 6 p, 2013.
- ARASHIRO, E.K.N.; UNGERFELD R.; CLARIGET R.P. *et al.* Early pregnancy diagnosis in ewes by subjective assessment of luteal vascularization using colour Doppler ultrasonography. *Theriogenology*, v. 106, p. 247-252, 2017.
- AYRES, H.; MINGOTI, G.Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.36, n.3, p.174-180, 2012.
- BAIRD, D.T.; SWANSTON, I.; SCARAMUZZI, E.J.; Pulsatile release of LH and secretion of ovarian steroids in sheep during the luteal phase of the estrous cycle. *Endocrinology*, v.98, p.1490-1496, 1976.
- BARBAGIANNI, M.S.; IOANNIDI, K.I.; VASILEIOU, N.G.C. *et al.* Ultrasonographic examination of pregnant ewes: from early diagnosis of pregnancy to early prediction of dystocia. *Small Rumin. Res.*, v.152, p.41-55, 2017.
- BARTLEWSKI, P.M.; BABY, T.E.; GIFFIN, J.L. Reproductive cycles in sheep. *Anim. Reprod. Sci.*, v.124, p. 259–268, 2011.
- BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P; COOK, S.L. *et al.* Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrus cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J. Reprod. Fert.*, v.115, p.111-124, 1999.
- BELTRAME, R.T.; COVRE, C.; LITTIG, L.B. *et al.* Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in ewes during pregnancy. *Theriogenology*, v.91, p.55-61, 2017.
- BOLLWEIN, H.; MEYER, H.H.; MAIERL, J. *et al.* Transrectal doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle. *Theriogenology*, v.53, p.1541–1552,

2000.

CAVALCANTI, A.S.; BRANDÃO, F.Z.; NOGUEIRA, L.A. *et al.* Effects of GnRH administration on ovulation and fertility in ewes subjected to estrous synchronization. *Rev. Bras. Zoot.*, v.41, n.6, 2012.

CONTRERAS-SOLIS, I.; DIAZ, T.; LOPEZ, G. *et al.* Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in hair breed sheep. *Anim. Reprod. Scie.*, v.104, p.47- 55, 2008.

DAVIES, K.L.; BARTEWSKI, P.M.; PIERSON, R.A. *et al.* Computer-assisted image analyses of corpora Luteal in relation to peripheral concentrations of progesterone: a comparison between breeds of sheep with different ovulation rates. *Anim. Rep. Sci.*, v.96, p.165–175, 2006.

De VRIES, A.; BARTOLOME, J.; BROADDUS, B. What is Early Pregnancy Diagnosis Worth? In: PROCEEDINGS 2ND FLORIDA DAIRY ROAD SHOW, p. 31-40, 2005.

DIAS, E.F.; LOPES JÚNIOR, E.S.; VILLAROEL, A.B.S. *et al.* Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica equina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.53, n.5, p.618-623, 2001.

DUGGAVATHI, R., BARTLEWSKIB, P.M., BARRETT, D.W. *et al.* Use of high-resolution trans rectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. *Theriogenology*, v.60, n.3, p.495-510, 2003.

EVANS, A.C.O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim. Rep. Sci.*, v.78, p.289–306, 2003.

FIGUEIRA, L.M.; FONSECA, J.F.; ARASHIRO, E.K.N. *et al.* Colour Doppler ultrasonography as a tool to assess luteal function in Santa Inês ewes. *Reprod. Dom. Anim.*, v.50, p.643-650, 2015.

FRICKE, P.M. Scanning the future – ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *J. Dairy Scie.*, v. 85, p. 1918-1926, 2002.

GARCIA, A.; NEARY, M.K.; KELLY, G.R. *et al.* Accuracy of ultrasonography in early pregnancy diagnosis in the ewe. *Theriogenology*, v.39, p.847-61, 1993.

GORDON, I. *Controlled reproduction in sheep and goats*. Cambridge, UK: University Press, 450p. 1997.

HUSEIN, M.Q.; KRIDL, R.T. Effect of progesterone prior to GnRH-PGF2a treatment on induction of oestrus and pregnancy in anoestrous Awassi ewes. *Rep. Dom. Anim.*, v.38, p.228-232, 2003.

McCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine mediated event. *Physiol. Rev.*, v.79, n.2, p.263-304, 1999.

McPHEE, I.M.; TIBERGHIE, M.P. Assessment of pregnancy in sheep by analysis of plasma progesterone using an amplified enzyme immunoassay technique. *Vet. Record*, v.121,

p.63-65, 1987.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B. *et al.* Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Dom. Anim. Endocrin.*, v.29, p.329–339, 2006.

MOLENTO, M.B.; TASCA, C.; GALLO, A. *et al.* Método FAMACHA como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. *Ciênc. Rural*, v.34, n.2, p.1139-1145, 2004.

MUKASA-MUGERWA, E.; EZAZ, Z.; VIVIANI, P. Plasma concentration of progesterone during oestrous cycles of Ethiopian Menz sheep using radioimmunoassay. *Small Rum. Res.*, v.3, p. 57-62, 1990.

NATION, D.P.; MALMO, J.; DAVIS, G.M. *et al.* Accuracy of bovine pregnancy detection using transrectal ultrasonography at 28 to 35 days after insemination. *Aust. Vet. J.*, v. 81, 2003.

OLIVEIRA, M.E.; FELICIANO, M.A.; D'AMATO, C.C. *et al.* Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. *Anim. Rep. Scie.*, v.144, p.30-37, 2014.

PERRY, R.C.; BEAL, W.E.; CORAH, L.R. Monitoring uterine characteristics and pregnancy. *Agri-Practice*, v. 11, n. 6, p. 31-35, 1990.

PIETERSE, M. C.; TAVERNE, M.A.M.; KRUIP, A.M. *et al.* Detection of corpora lutea and follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. *Vet. Record*, v.126, p.552–554, 1990.

RIBEIRO, S.D.A. *Caprinocultura: criação racional de caprinos*. São Paulo: Nobel, 1997.

ROMANO, J.E. Early pregnancy diagnosis and embryo/fetus mortality in cattle. 2004. 120f. Dissertação (Doutorado). Texas A&M University.

ROMANO, J.E.; THOMPSON, J.A.; FORREST, D.W. *et al.* Early pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography in dairy cattle. *Theriogenology*, v.66, p.1034-1041, 2006.

ROSA, H.J.D.; BRYANT, M.J., Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rum. Res.*, v.48, p.155–171, 2003.

SÁ JUNIOR, A.; CARVALHO, L.G.; SILVA, F.F. *et al.* Application of the Köppen classification for climatic zoning in the state of Minas Gerais, Brazil. *Theor. Applied Climat.*, v.108, p.1-7, 2012.

SENGER, P.L. *Pathways to pregnancy and parturition*. 2a ed. Washington: Current conceptions, 2005.

SHIRASUNA, K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B.; WATANABE, S. *et al.* A blood flow in the corpus luteum acutely increases together with endothelin-1 mRNA expression at early stage of regression during spontaneous luteolysis in the cow. *Biol. Rep.*, v.71, 2004.

SIQUEIRA, L.G.B.; AREAS, V.S.; GHETTI, A.M. *et al.* Color Doppler flow imaging for the

early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *J. Dairy Scie.*, v.96, p.6461–6472, 2013.

SUSMEL, P.; PIASENTIER, E. Assessment of pregnancy in Bergamasca ewes by analysis of plasma progesterone. *Small Rum. Res.*, v8, p.325-332, 1992.

UNGERFELD, R.; SUÁREZ, G.; CARBAJAL, B. *et al.* Medroxyprogesterone primings and response to the ram effect in Corriedale ewes during the non-breeding season. *Theriogenology*, v.60, p.35-45, 2003.

VIÑALES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G. *et al.* Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*, v.55, p.993-1004, 2001.

WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandin and reproduction in female farm animals. *Vet. J.*, v.171, p.206-228, 2006.