

AVALIAÇÃO DOPPLERVELOCIMÉTRICA DO OVÁRIO EM CABRAS SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA

(Dopplervelocimetric ovarian assessment in goats submitted to ovarian stimulation)

Yara Pereira Diógenes¹; Maria Eduarda Monteiro Temporal Agostinho¹; Aniele dos Santos Bezerra¹; Samara Silva de Souza¹; Benner Geraldo Alves¹; Vicente José de Figueiredo Freitas²; Dárcio Ítalo Alves Teixeira¹

¹Universidade Estadual do Ceará - Faculdade de Veterinária, Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução – LFCR. Fortaleza - CE, Brasil. Av. Dr. Silas Munguba 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza, CE: 60.740-903.

RESUMO

As biotecnias da reprodução vêm sendo utilizadas na Medicina Veterinária, a fim de melhorar o desempenho reprodutivo de animais sem padrão racial definido (SRD), aumentando a produtividade desses animais. Dentre essas biotecnias, a ultrassonografia modo B, associada ao Doppler, permite a avaliação da dinâmica do fluxo sanguíneo e a detecção da neovascularização; além de permitir o escaneamento pelo modo Doppler, para calcular índices de vascularidade da artéria ovariana, índice de resistividade (IR) e velocidade do pico sistólico (PSV). Assim, o objetivo do presente trabalho foi comparar dois protocolos de estimulação ovariana em caprinos SRD, dando enfoque na Dopplervelocimetria ovariana, a fim de verificar fluxo sanguíneo e dopplervelocimetria da artéria ovariana; bem como, observar a dinâmica folicular de cabras submetidas a dois diferentes protocolos hormonais.

Palavras chave: Dopplervelocimetria, cabras, ultrassonografia.

ABSTRACT

Reproductive biotechnologies have been used in veterinary medicine to improve the productivity and reproductive performance in caprine. Among these biotechniques, the mode B ultrasonography associated with Doppler allows the evaluation of blood flow dynamics and the vascularization detection by the determination of vascularity index such as resistivity index (IR) and systolic peak velocity (PSV) of two hormonal ovarian stimulation protocols on follicular dynamics and Doppler velocitometry parameters of the ovarian artery in caprine.

Key Words: Dopplervelocitometry, goats, ultrasound.

INTRODUÇÃO

A caprinocultura tem importância no âmbito social e econômico na população rural, tratando-se de uma atividade

desenvolvida principalmente para pequenos e médios produtores. A espécie caprina apresenta boa adaptação às condições ambientais adversas e aos diferentes regimes de criação (NOGUEIRA FILHO e

¹Endereço para correspondência:
darcio.teixeira@uece.br

KASPRZYKOWSKI, 2006). O rebanho de caprinos no Brasil é constituído, principalmente, por animais denominados SRD (Sem Padrão Racial Definido), os quais são resultado do cruzamento de raças nativas com raças importadas (SANTANA e SIMPLICIO, 1992). Os rebanhos SRD apresentam características de baixo peso e reduzida capacidade de produzir carne e leite. No entanto, possuem alta resistência às doenças e ao clima semiárido; mesmo quando submetidos a uma alimentação reduzida (MADRUGA *et al.*, 2005).

Assim, as biotecnias da reprodução vêm sendo utilizadas na Medicina Veterinária, a fim de auxiliar no desempenho desses animais. Dentre essas biotecnias, a ultrassonografia modo B, associada ao Doppler, permite a avaliação da dinâmica do fluxo sanguíneo e a detecção da neovascularização (FLEMMING-FORSBERG *et al.*, 2002); possibilitando o mapeamento do sítio ovariano através do Doppler espectral e visualizando as mudanças da vascularização intraovariana (PAREJA *et al.*, 2010); além de permitir o escaneamento pelo modo Doppler, para calcular índices de vascularização da artéria ovariana (DU *et al.*, 2006).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi comparar dois protocolos de estimulação ovariana em caprinos SRD, dando enfoque na Dopplervelocimetria

ovariana, a fim de verificar fluxo sanguíneo da artéria ovariana e observar dinâmica folicular de cabras, submetidas a dois diferentes protocolos hormonais.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução da FAVET/UECE e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), com o seguinte número de protocolo 3.324.535/2014. Foram utilizadas 4 fêmeas mestiças de Anglonubiana, com idade entre 5 e 8 anos, com peso variando de 36 - 43 Kg. Os animais foram mantidos em sistema semiintensivo de produção, recebendo feno de Tifton (*Cynodon dactylon*). A dieta foi suplementada com concentrado comercial (18% de Proteína Bruta), uma vez ao dia. Água e sal mineral à vontade foram fornecidos.

Tratamentos hormonais

Sincronização do estro: Inicialmente, as fêmeas receberam esponjas intravaginais, contendo 60 mg de MAP (Progespon, Coopers Saúde Animal®, Cotia, Brasil). O progestágeno foi inserido, através de um aplicador, contendo gel lubrificante, numa angulação de 45°, permanecendo por 10 dias. No sétimo dia de tratamento, foi

aplicado, por via intramuscular, 50 µg de d-cloprostenol (Ciosin, Coopers[®], São Paulo, Brasil).

Superestimulação ovariana: As cabras foram distribuídas em dois grupos experimentais, com diferentes tratamentos. Para um grupo de múltiplas doses (MD), foram administrados de 120 mg de pFSH (Folltropin-V; Bioniche, Belleville, Canadá), divididas em cinco doses decrescentes (30/30, 20/20 e 20 mg), administradas por via intramuscular, em intervalos de 12 em 12 horas. As injeções pFSH, nesse grupo, tiveram início no 7º dia de tratamento com progestágeno.

Para um grupo de one-shot (OS), foram administrados de 70 mg de pFSH (Folltropin-V[®]; Bioniche, Belleville, Canadá), mais 200 UI de eCG (Novormon[®], Syntex, Argentina); ambos administrados, em seringas diferentes, por via intramuscular, 36h antes da retirada da esponja. Os animais tiveram os tratamentos de estimulação ovariana intervalados em 14 dias, com duas repetições por animal. Todas as fêmeas passaram pela mesma quantidade de tratamentos.

Exames Ultrassonográficos

Todas as análises ultrassonográficas foram efetuadas, usando equipamento Doppler digitalizador (CTS-8800V[®], SIUI, Jiangsu, China), equipado

com uma sonda transretal linear, com frequência de 7,5 MHz, pouco antes da inserção da esponja (D0), para mensurar a vascularização da artéria ovariana. O procedimento foi realizado pelo mesmo operador, em todos os animais. Durante os exames ultrassonográficos, as cabras foram mantidas na posição estacional, a bexiga foi utilizada como guia para a localização ovariana, a sonda foi inserida com o transdutor orientado perpendicularmente à parede abdominal ventral, logo após a remoção manual das fezes. O escaneamento foi realizado no sentido horário de 90° e anti-horário de 180°, para localização dos ovários e das artérias ovarianas direita e esquerda, que se apresentam espiraladas e aderidas intimamente às veias uterinas. Os exames foram realizados antes da inserção e da retirada do dispositivo vaginal. Foi utilizada a ultrassonografia modo-B para localização e observação da artéria ovariana e dos ovários, quanto à quantidade de folículos. A ultrassonografia Doppler espectral foi utilizada para mensurar a dopplervelocimetria da artéria ovariana. O ângulo de insonação utilizado foi de 60°. As mudanças do fluxo sanguíneo, em resposta à estimulação hormonal foram avaliadas duas vezes ao dia, entre os dias 7 e 9 (D7, D8, D9) do tratamento com progestágeno e,

posteriormente, momentos antes retirada da esponja (D 10).

Análise estatística

Foi realizado o mapeamento da velocidade do fluxo sanguíneo (índice de resistência do fluxo sanguíneo). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão, e o teste T de Student foi realizado, para verificar diferença entre os grupos; sendo as diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os exames ultrassonográficos, foi possível observar o útero e os ovários, bem como a artéria ovariana; além de visualizar fluxo

sanguíneo. Usando o Doppler pulsado (PW), a onda formada mostrou um padrão típico de baixa resistividade, devido a um pico sistólico rápido, seguido por uma redução lenta diastólica, com uma velocidade relativamente alta diastólica final. Não foi observada diferença estatística entre os grupos MD e OS, em relação ao PSV, em ambos os tratamentos. No que diz respeito ao índice de resistividade (IR), o tratamento multidoses apresentou-se significativamente superior ($p < 0,05$) nos dias 8 ($0,43 \pm 0,03$) e 10 ($0,43 \pm 0,04$), quando comparado com o tratamento de dose única, nos dias 8 ($0,45 \pm 0,05$) e 10 ($0,48 \pm 0,04$), respectivamente (Tab. 1).

Tabela 1: Índice de resistência do fluxo da artéria ovariana de cabras SRD submetidas a dois protocolos de superestimulação ovariana, múltiplas doses (MD) e one shot (OS).

Tratamentos	D0	D7	D8	D9	D10
MD	$0,60 \pm 0,04^{aA}$	$0,54 \pm 0,02^{aA}$	$0,43 \pm 0,03^{bA}$	$0,51 \pm 0,03^{abA}$	$0,43 \pm 0,04^{bA}$
OS	$0,52 \pm 0,04^{aA}$	$0,47 \pm 0,01^{ab}$	$0,45 \pm 0,05^{aA}$	$0,46 \pm 0,04^aA$	$0,48 \pm 0,04^{aA}$

^{A,B}Diferença entre os tratamentos dentro do dia entre colunas ($p < 0,05$).

Letras minúsculas representam diferenças entre os dias em cada tratamento e letras maiúsculas representam diferenças entre tratamentos dentro de cada dia.

Em relação ao tamanho de ovário, os dois grupos MS e OS não demonstraram diferenças estatísticas. Foi observado que o

número de total de folículos apresentou uma superioridade no grupo MD ($p < 0,05$),

no dia 0 ($5,6\pm 0,3$), quando comparado ao OS ($4,2\pm 0,4$) (Tab. 2).

O presente estudo demonstrou que existe uma relação entre fornecimento de

gonadotrofinas exógenas com a variação no fluxo sanguíneo e o aumento do número de folículos em crescimento (Tab. 2).

Tabela 2: Média de folículos ovarianos por ovário de cabras SRD, submetidas a dois protocolos de superestimulação ovariana, múltiplas doses (MD) e one shot (OS).

Tratamentos	D0	D7	D8	D9	D10
MD	$5,6\pm 0,3^aA$	$5,1\pm 0,3^{aa}$	$4,5\pm 0,4^{aa}$	$5,1\pm 0,4^aA$	$5,0\pm 0,4^{aa}$
OS	$4,2\pm 0,4^{ab}$	$4,5\pm 0,2^{aa}$	$4,8\pm 0,3^{ab}A$	$5,4\pm 0,4^{ba}$	$5,4\pm 0,3^{ba}$

^{a,b}Diferenças entre os dias na mesma linha ($p<0,05$).

^{A,B}Diferença entre os tratamentos dentro do dia entre colunas ($p<0,05$).

Não foi observado diferença na PSV entre os tratamentos. Isso poderia estar associado aos protocolos utilizados, uma vez que a dose total de FSH administrada de uma só vez conduziria a um menor número de folículos (KELLY *et al.*, 2005). No desvio folicular haveria um aumento da perfusão vascular no futuro folículo dominante, ao passo em que haveria uma diminuição desta nos folículos subordinados, quando analisada a PSV por meio da avaliação Doppler espectral de vasos presentes na parede folicular (ACOSTA *et al.*, 2004a). Como o recrutamento folicular por meio de hormônio exógeno não levaria a uma dominância, os folículos tenderiam a receber uma quantidade de hormônio semelhante.

O grupo de tratamento múltiplas doses, também nos dias 8 e 10, mostrou-se superior ao de única dose para o IR. O índice de resistividade apresentaria uma relação inversamente proporcional com a perfusão vascular (ACOSTA *et al.*, 2004a; GINTHER e UTT, 2004). Como a perfusão se manteve constante durante os dias de tratamento (MD e OS), isso pode estar relacionado aos hormônios utilizados, já que os dias 8 e 10 são o primeiro e último dia de aplicação hormonal, respectivamente.

Houve diferença no número de folículos por ovário dos diferentes tratamentos, sendo o grupo MD ($5,6\pm 0,3$) superior ao OS ($4,2\pm 0,4$) no dia 0 de tratamento. Isso poderia estar associado à variabilidade, nas a resposta ao tratamento

(número de folículos) poderia ser associada a fatores intrínsecos como idade e estado nutricional (COGNIE, 1999; GIBBONS *et al.*, 2008), ou a outros fatores, como protocolo previamente utilizados (tipo de gonadotrofina) e intervalo de tratamentos.

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a ultrassonografia Doppler é eficiente para avaliar as mudanças na vascularização ovariana, podendo esta técnica ser indicada para esta finalidade no exame de fêmeas caprinas (SRD). No que diz respeito à velocidade do pico sistólico, não houve diferença significativa entre os grupos de uma única dose e o de múltiplas doses, sendo indicada a utilização do primeiro, pois permitirá um manejo mais adequado e um menor estresse aos animais assim tratados. O índice de resistência da vascularização e o número de folículos por ovário foram maiores no grupo de MD, quando comparado ao OS, tendo essas duas características uma relação positiva entre si. No geral, os resultados indicam o MD como tratamento de eleição, uma vez que seus resultados foram superiores aos do grupo OS.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, T.J.; YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local Changes in Blood Flow Within the Early

and Midcycle Corpus Luteum after Prostaglandin F_{2α} Injection in the Cow. *Biology of Reproduction*, v.66, p.651-658, 2002.

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

ACOSTA, T.; GASTAL, E.; GASTAL, M.; BEG, M.; GINTHER, O. Differential blood flow changes between the future dominant and subordinate follicles precede diameter changes during follicle selection in mares. *Biology of Reproduction*, v.71, p.502-507, 2004a.

ADAMS, G.P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, v.69, p.72-80, 2008.

COGNIE, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.109-116, 1999.

D'ALESSANDRO, A.G.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M.A.; BORGHESE, A.; TERZANO, M.G.; BELLITTI, A. Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. *Animal*

- Reproduction Science, v.65, p.255-264, 2001.
- DU, B.; TAKAHASHI, K.; ISHIDA, G.M.; NAKAHARA, K.; SAITO, H.; KURACHI, H. Usefulness of intraovarian artery pulsatility and resistance indices measurements on the day of follicle aspiration for the assessment of the oocyte quality. *Fertility and Sterility*, v.85, n.3, p.366-370, 2006.
- DURFEE, S.M.; FRATES, M.C. Sonographic spectrum of the corpus luteum in early pregnancy: gray-scale, color and pulsed Doppler appearance. *Journal Clinic Ultrasound*, v.27, p.55-59, 1999.
- FLEISCHER, A.C.; CULLINAN, J.A.; KEPPLER, D.M. Ultra-sonografia com Doppler colorido em massas pélvicas. In: Fleischer AC, Cullinan JA, Kepple DM. *UltraSonografia em Obstetria e Ginecologia: princípios e prática*. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.791-813.
- FLEMMING-FORSBERG, D.K.; JOHNSON, D.A.; MERTON, J.B.L.; LOSCO, P.E.; HEGEN, E.K.; GOLDBERG, B.B. Contrast-enhanced transrectal ultrasonography of a novel canine prostate cancer model. *Journal Ultrasound Medicine*, v.21, p.1003-1013, 2002.
- GINTHER, O.P. In: GINTHER, O.P. *Ultrasound imaging and reproductive events in the mare*. Madison: Equiservice, 1986. 377p.
- GINTHER, O.J.; UTT, M.D. Doppler ultrasound in Equine Reproduction: Principles, Techniques and Potencial. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.24, n.12, p.516-526, 2004.
- GRANADOS, L.B.C.; DIAS, A.J.B.; SALES, M.P. *Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos*. 1ª ed. Rio de Janeiro, p.2, 2006.
- KELLY, J.M.; KLEEMAN, D.O.; WALKER, S.K. Enhanced efficiency in the production of offspring from 4- to 8-week-old lambs. *Theriogenology*, v.63, p.1876-1896, 2005.
- KNIGHTS, M.; BAPTISTE, Q.S.; DIXON, A.B.; PATE, J.L.; MARSH, D.J.; INSKEEP, E.K.; L'EWIS, P.E. Effects of dosage of FSH, vehicle and time of treatment on ovulation rate and prolificacy in ewes during the anestrous season. *Small Ruminant Research*, v.50, p.1-9, 2003.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos>> Acesso junho de 2016.
- MADRUGA, M.S.; NARAIN,N.; DUARTE, T.F.; SOUSA, W.H.;

- GALVÃO, M.S.; CUNHA, M.G.G; RAMOS, J.L.F. Características químicas e sensoriais de cortes comerciais de caprinos SRDe mestiços de Boer. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.4, p.713-719, 2005.
- MAY, N.D.S. The anatomy of the sheep with instructions for its dissection. Brisbane: University of Queensland Press, 1964.
- MC LEOD, W.M. Bovine anatomy. 2ª .ed. Minneapolis: Burgess, p.148-150, 1958.
- MCMANUS, C.; PAIVA, S.; LOUVANDINI, H. INCT: Informação Genético-Sanitária da pecuária Brasileira. Série técnica: Genética. Caprinos no Brasil. 2010.
- MOURA, J.C.A.; MERKT, H. In: A ultrasonografiana reprodução eqüina. 2ª ed., Salvador: Editora Universitária Americana, 1996. 162p
- NOGUEIRA FILHO, A.; KASPRZYKOWSKI, J.W.A. Série: Documentos do ETENE. O agronegócio da caprinovinocultura no Nordeste brasileiro, n.9, 2006.
- OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; VICENTE, R.R.W. Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos. 1ª ed. São Paulo: MedVet, 2013. p.1-3.
- PAREJA, O.S.; URBANETZ, A.A.; URBANETZ, L.A.M.L.; CARVALHO, N.S.; PIAZZA, M.J. Características ecográficas do corpo lúteo em gestações iniciais: morfologia e vascularização. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria*, n.11, v.32, p.549-555, 2010.
- SANTANA, O.P.; SIMPLICIO, A. Goat Production in Brazil. Recent Advances in Goat Production, ed. R.R. Lokeshwar, Proceedings and papers presented at V International conference on goats, New Dehli, India, p.460-474, 1992.