

Ultrassonografia Doppler na avaliação do status funcional do corpo lúteo de égua receptora de embrião: Relato de caso

Doppler ultrasonography on the evaluation of the functional status of the corpus luteum from an embryo recipient mare: A case report

Pedro Henrique Evangelista Guedes[†]; Gustavo Mendes Gomes[‡]; Ana Carla de Oliveira Figueira[§]; Carla Fernanda Paranhos de Moura Carvalho^{||}; Hugo Rocha Sabença Dias[†]; Letícia Patrão de Macedo Gomes[‡]

Resumo

Como citar esse artigo. Guedes PHE; Gomes GM; Figueira ACO; Carvalho CFPM; Dias HRS; Gomes LP. Ultrassonografia Doppler na avaliação do status funcional do corpo lúteo de égua receptora de embrião: Relato de caso. 2017 Jan./Jun.; 08 (1): 15-21.

A relação entre o fluxo sanguíneo luteal e a produção de progesterona já foi demonstrada em estudos. O objetivo deste trabalho foi descrever o uso da ultrassonografia Doppler na avaliação do status funcional do corpo lúteo de uma égua receptora de embrião, através de análise subjetiva e objetiva da área vascularizada em correlação às dosagens de progesterona sérica e de VEGF. O animal foi avaliado pós-ovulação, através de palpação retal e ultrassonografia modo-B e Doppler. As análises subjetivas e objetivas das imagens revelaram aumento de pixels até o D6 e queda a partir do D8. As concentrações sanguíneas de P4 e de VEGF aumentaram até o D6, apresentando estreita relação com a vascularização. P4 e VEGF também apresentaram resultados diretamente proporcionais. Os resultados do estudo estão de acordo com a literatura revisada e mais estudos são necessários para aperfeiçoar a técnica na avaliação luteal de éguas receptoras

Palavras-chave: Corpo lúteo; Pixels; Progesterona; Vascularização

Abstract

The relationship between the luteal blood flow and progesterone production (P4) has already been demonstrated in several studies. The aim of this study was to describe the use of Doppler ultrasonography on the functional status of the corpus luteum from an embryo receiving mare through the subjective and objective analysis of the vascularized area in correlation with serum progesterone dosages and VEGF. One mare was evaluated post ovulation by rectal palpation using B-mode ultrasonography and Doppler. Subjective and objective analysis of the images revealed increased pixels until D6 and decreased from D8. P4 and VEGF concentrations in blood increased until D6, presenting close relationship with vascularization analysis. Progesterone and VEGF were directly proportional to one another. The results agree with the reviewed literature and more studies are necessary to improve luteal evaluation technique on recipient mares.

Keywords: Corpus luteum; Pixels; Progesterone; Vascularization

Introdução

Com o intuito de incrementar o sucesso de um programa de transferência de embrião equino, torna-se essencial o conhecimento dos fatores que afetam as taxas de gestação pós-transferência. Nesses fatores estariam envolvidos: idade e tamanho do embrião, metodologia utilizada na técnica propriamente dita, características morfofisiológicas (ovário e útero) da égua receptora, qualidade morfológica do embrião,

sincronização entre os dias de ovulação doadora/receptora, manejo nutricional e sanitário da égua receptora^{1,2}.

O Doppler, nas suas diferentes modalidades, é uma tecnologia que permite avaliar o fluxo sanguíneo tecidual, com suas velocidades e/ou intensidades, em imagem ultrassonográfica em modo-B, proporcionando avaliações anatômicas e funcionais em tempo real.

A ultrassonografia se popularizou como

Afiliação dos autores: [†] Aluno do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Severino Sombra (USS), Vassouras-RJ, Brasil; [‡] Xxxxxx
[§] Docente do Mestrado em Diagnóstico Clínico e Laboratorial em Medicina Veterinária, Universidade Severino Sombra, Vassouras-RJ, Brasil;
^{||} Médica Veterinária Autônoma; ⁴ Docente Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica-RJ, Brasil.

* pedroheguedes@hotmail.com/ (24)992744846

um um equipamento indispensável para o médico veterinário que trabalha com reprodução assistida, ficando seu uso cada vez mais rotineiro e se tornando cada vez mais acessível.

Para que ocorra o desenvolvimento normal do corpo lúteo (CL), juntamente com a sua capacidade de produzir progesterona, fatores de crescimento, fatores angiogênicos e substâncias vasoativas dependem de boa vascularização e de bom fornecimento de fluxo sanguíneo teciduais para chegar até essa estrutura. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) são os principais responsáveis pelo desenvolvimento e pela manutenção da densa rede de capilares neoformados, além de contribuírem de maneira parácrina e autócrina para a produção de progesterona^{3,4}.

A relação entre o fluxo sanguíneo luteal e a produção de progesterona (P4) já foi demonstrada em estudos com bovinos e equinos. Todos os trabalhos mencionaram com segurança que o aporte sanguíneo do CL influencia os níveis séricos de progesterona⁵.

Uma vez que o desenvolvimento e a funcionalidade luteal estão estritamente relacionados com o desenvolvimento e a regressão de uma vascularização local, o Doppler desponta como uma ferramenta de grande importância na avaliação do status funcional do CL⁶.

O objetivo deste trabalho foi descrever o uso da ultrassonografia Doppler na avaliação do status funcional do corpo lúteo de uma égua receptora de embrião da raça Mangalarga Marchador, através de análises subjetiva e objetiva da área vascularizada em correlação às dosagens de progesterona sérica e de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

Material e Métodos

Uma égua receptora de embriões da raça Mangalarga Marchador, com 15 anos de idade, peso corporal de 370 kg, mantida em regime semi-extensivo, teve seu ciclo estral monitorado desde a fase folicular até dez dias após a ovulação (D1, D4, D6, D8, D10), que ocorreu de forma espontânea. O monitoramento foi realizado através de palpação retal, exame ultrassonográfico em modo-B e exame ultrassonográfico modo Color-Doppler.

Os escaneamentos do ovário de onde procedeu a ovulação foram realizados pelo mesmo observador, durante 1 minuto sobre a área do CL, com aparelho da marca Chison, modelo Q5Vet, utilizando um transdutor transretal, em frequência de 6.4MHz. Os exames foram gravados em forma de vídeo para posteriores análises subjetivas e objetivas da área vascularizada (pixels coloridos).

O tônus uterino, avaliado através de palpação retal, foi classificado numa escala que varia de 1(+) a 3(+++), em que 1(+) representa mais flacidez e 3(+++) mais turgidez, característica esta atribuída à ação da progesterona.

Os dados referentes ao tônus uterino, diâmetro do CL e área das cavidades do CL foram anotados em planilha.

Para a análise subjetiva, foi extraída do vídeo de cada um dos cinco dias de exame uma imagem representativa do momento com maior área colorida, de forma que significasse, naquele dia, o momento de maior vascularização. Dessa forma, cinco imagens foram selecionadas e usadas na avaliação (Figura 1).

A avaliação visual das imagens foi realizada pelo mesmo observador, que graduou o tamanho da área colorida em escores de 0 a 4, em que 0 representa nenhuma vascularização e 4 representa vascularização máxima, conforme metodologia utilizada por Silva e colaboradores⁷.

Posteriormente, realizou-se a análise objetiva com intuito de validar o método subjetivo. Para tanto, as mesmas imagens foram avaliadas através de duas ferramentas distintas: programa Photoshop CC 2015 (Adobe Systems, San Jose, CA) e programa ImageJ 1.31v (National Institute of Health, Bethesda, MD). As imagens foram salvas em formato TIFF e o aglomerado de pixels coloridos foi extraído através de ferramenta específica e estimado numericamente.

Em cada um dos cinco dias em que a égua foi examinada, extraiu-se uma amostra de 3mL de sangue total, através de punção da veia jugular externa com seringa de 10mL e agulha 40x12mm, que foi acondicionada em tubos com heparina sódica e transportada em isopor com gelo até o local de processamento, onde foi centrifugada em rotação de 3.760 g por 3min. Após centrifugação, o plasma foi extraído e congelado em microtubos, em temperatura de -10°C, para posteriores dosagens de progesterona e VEGF.

As dosagens de P4 foram realizadas através do método de radioimunoensaio e as de VEGF através do método ELISA Sanduíche (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Resultados

No dia marcado como D1 pós-ovulação, verificou-se, ao exame ultrassonográfico modo-B, a presença de um corpo lúteo cavitário no ovário direito, com diâmetro médio de 3,87 cm, possuindo três cavidades principais com áreas de 2,20 cm²,

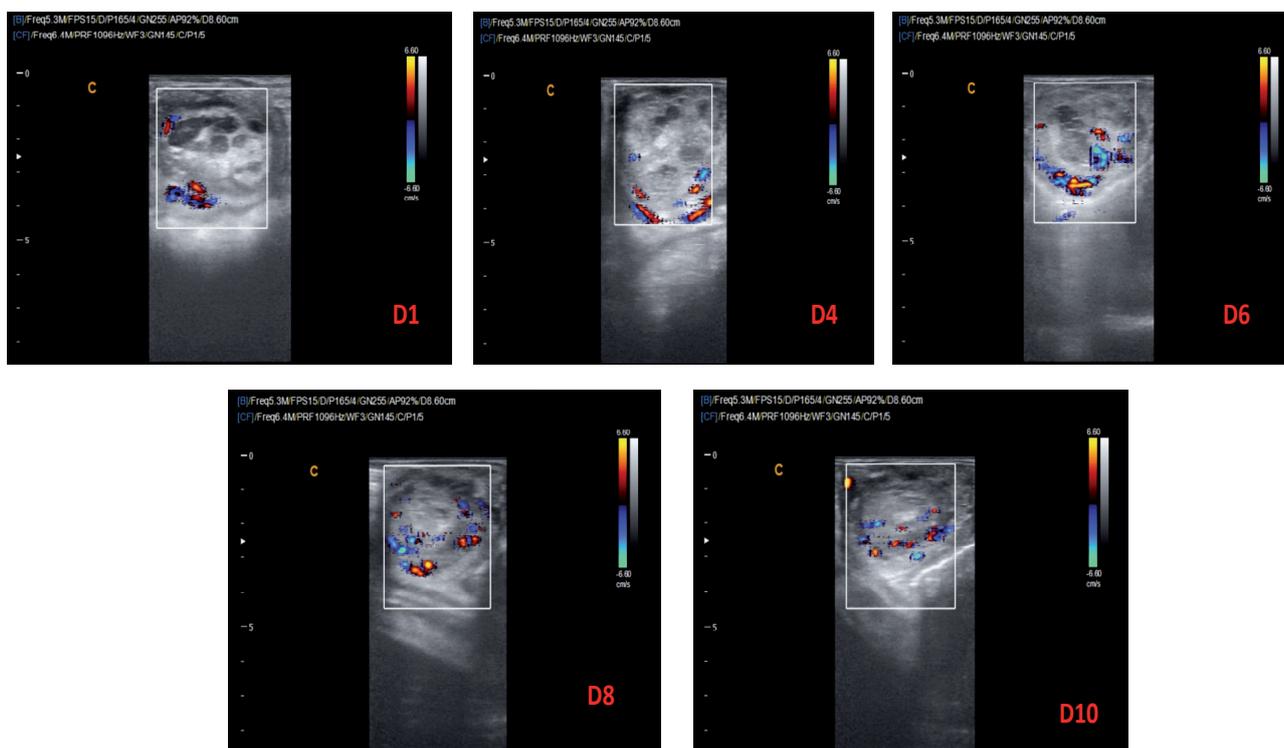


Figura 1. Imagens extraídas dos escaneamentos com Doppler que foram utilizadas nas avaliações subjetiva e objetiva.

0,60 cm² e 0,40 cm². Neste dia, o animal apresentou tônus uterino 1(+) ao exame de palpação retal. Pela análise subjetiva das imagens obtidas através do Doppler, o corpo lúteo recebeu escore 1 de vascularização, apresentando pontos coloridos nas áreas mais periféricas da estrutura.

No D4 pós-ovulação, o animal apresentou tônus uterino 2 (++) e escore 2 de vascularização, apresentando pontos coloridos na região medular da estrutura. Nos dias D6 e D8 pós-ovulação, o animal apresentou tônus uterino 3 (+++) e escore 4 de vascularização. No D10, o animal apresentou tônus uterino 2 (++) e escore 3 de vascularização. Os resultados das avaliações de tônus uterino e escore

subjetivo de vascularização estão descritos na tabela 1.

A partir das análises objetivas das imagens, o seguinte resultado foi encontrado: 1.067 pixels foram contados no D1; 1.921 no D4; 7.233 no D6; 5.236 no D8; e 3.092 no D10. Nas dosagens de P4, foram encontrados os seguintes valores: 2,16 ng/mL no D1; 7,14 ng/mL no D4; 9,93 ng/mL no D6; 10,20 ng/mL no D8; e 11,20 ng/mL no D10. As dosagens de VEGF revelaram: 1,014 mg/mL no D1; 1,728 mg/mL no D4; 2,706 mg/mL no D6; 1,404 mg/mL no D8; e 1,902 mg/mL no D10. Os dados coletados estão descritos na tabela 1. A correlação dos dados encontrados está demonstrada nos gráficos 1, 2 e 3.

Tabela 1. Resultados das avaliações realizadas

DIAS	TÔNUS UTERINO	ESCORE DE VASCULARIZAÇÃO	NÚMERO DE PIXELS	P4 (ng/mL)	VEGF (mg/mL)
D1	1 (+)	Escore 1	1.067	2,16	1,014
D4	2 (++)	Escore 2	1.921	7,14	1,728
D6	3 (+++)	Escore 4	7.233	9,93	2,706
D8	3 (+++)	Escore 4	5.236	10,20	1,404
D10	2 (++)	Escore 3	3.092	11,20	1,902

Discussão

Os resultados das avaliações uterinas deste trabalho, feitas através de palpação retal, estão em conformidade com a literatura. O tônus uterino

modifica durante as fases do ciclo estral da égua, sendo influenciado pelos hormônios reprodutivos.

Na fase estrogênica do ciclo, o útero se mostra menos túrgido (ou mais flácido), já que a principal

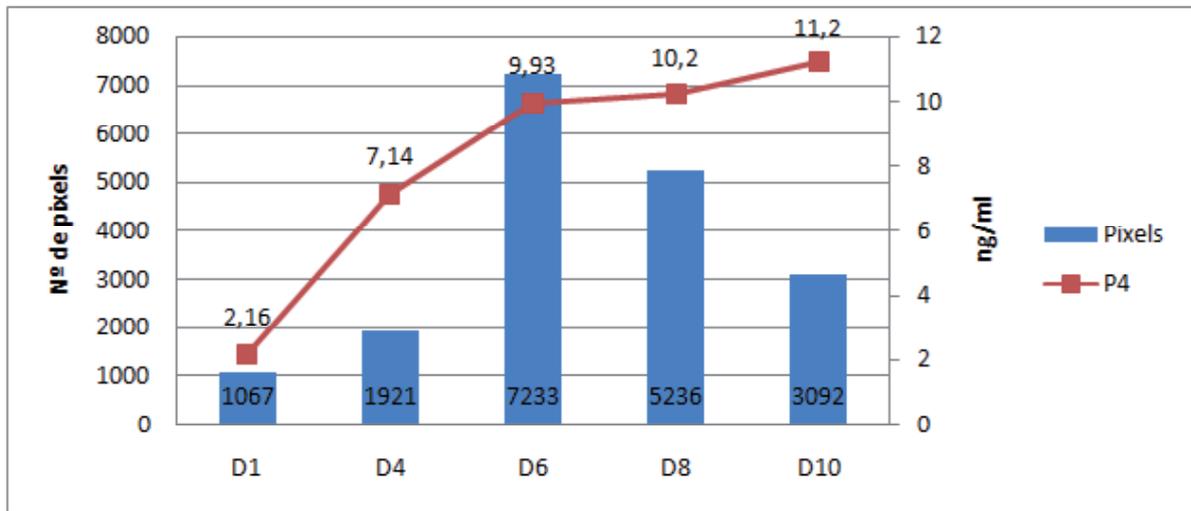


Gráfico 1. Relação entre a vascularização (número de pixels) e a concentração sérica de P4, de acordo com os dias após a ovulação.

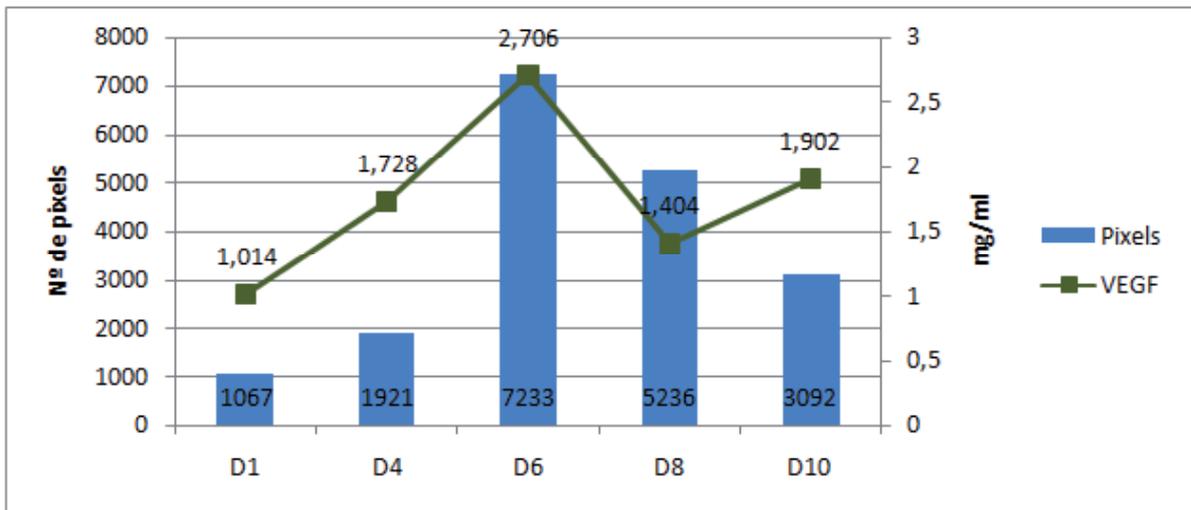


Gráfico 2. Relação entre vascularização (número de pixels) e concentração sérica de VEGF, de acordo com os dias após a ovulação.

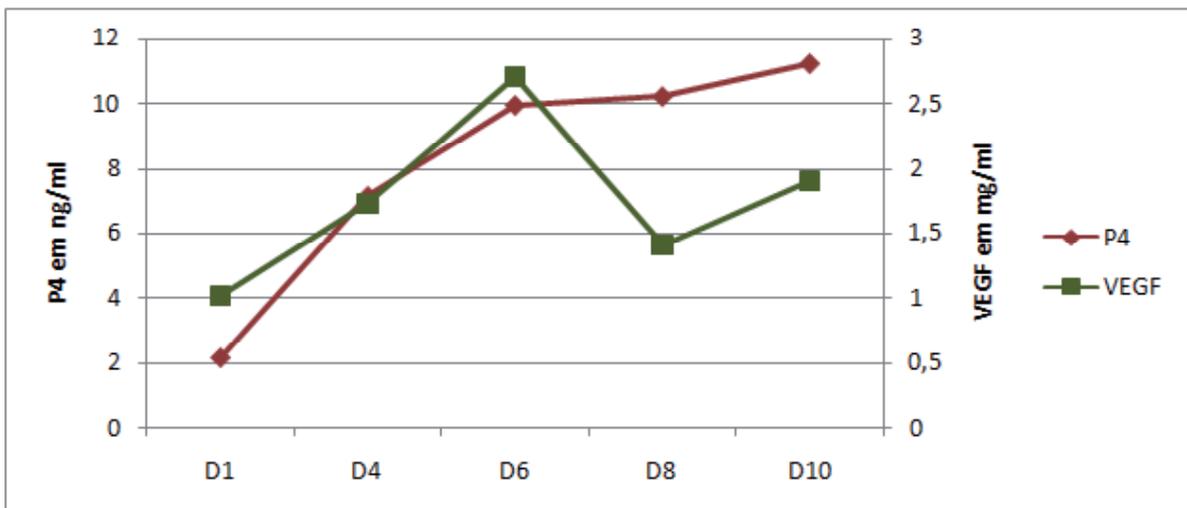


Gráfico 3. Relação entre as concentrações plasmáticas de P4 e VEGF, de acordo com os dias após a ovulação.

característica deste momento é a proliferação do endométrio e das glândulas endometriais. Na fase progesterônica (diestro), o útero torna-se mais túrgido, quiescente, e o endométrio passa então a secretar substâncias importantes para a gestação, como mostram alguns autores^{8,9}.

O padrão de tonicidade uterina seguiu o padrão de vascularização do CL, demonstrando a estreita relação entre a tonicidade e a produção hormonal, já reportada em estudo¹⁰. É primordial destacar a importância das características morfofisiológicas do útero durante a escolha de uma égua receptora. Essas características estão entre os fatores que afetam a taxa de prenhez pós-transferência de embrião, de acordo com a literatura atual^{1, 2, 11}.

As análises subjetivas e objetivas das imagens do exame revelaram que, após a ovulação, a vascularização do CL aumentou progressivamente, atingindo o máximo de perfusão no sexto dia, quando foram mensurados 7.233 pixels e escore 4 de vascularização. Estes achados corroboram com trabalhos que citam um aumento gradativo da vascularização luteal após a evacuação, chegando aos valores máximos após o D6^{12, 6, 13, 14}.

No D8, a análise objetiva evidenciou ligeira queda, passando a 5.236 pixels, mas mantendo o escore 4 na avaliação subjetiva. A diminuição na vascularização evidenciou-se no D10, quando os pixels mensurados passaram a 3.092 e o escore de perfusão passou a 3. O primeiro decréscimo de pixels no D8 não está de acordo com os dados encontrados na literatura, uma vez que autores relatam o início da queda de perfusão entre D10 e D14, período este que antecede o processo da luteólise^{6, 15}.

A progesterona é o hormônio responsável pela manutenção da gestação e seus níveis variam de acordo com a fase do ciclo estral da égua. A produção adequada de P4 reflete no sucesso dos programas de transferência de embriões, pois permite uma boa taxa de confirmação de prenhez, e evita os gastos com suplementações exógenas. Os níveis séricos de progesterona dependem da atividade secretória do CL e, por sua vez, um bom status funcional depende de uma boa irrigação sanguínea desta glândula transitória. Sendo assim, destaca-se o uso do Doppler como um método não invasivo para a avaliação da perfusão sanguínea e para o monitoramento da atividade luteal⁵. Seguindo a tendência evolutiva dos equipamentos eletrônicos, não é difícil imaginar que dentro de pouco tempo o Doppler será um recurso economicamente viável e comum a todos os equipamentos ultrassonográficos, podendo ser uma ferramenta importante para avaliar características morfofisiológicas (ovário e útero) da égua receptora. As concentrações de P4 sérica deste relato estão de acordo com os valores mencionados

pela literatura, que cita níveis entre 1,5 e 2,5 ng/mL nas primeiras 24h, entre 2,5 e 5,0 ng/mL de 24h a 48h após a ovulação e o pico (8 a 20 ng/mL) entre os dias 5 e 8, mantendo-se alto até o início da luteólise¹⁴.

Os padrões de vascularização e produção de P4 vêm sendo cada vez mais estudados e diversos autores destacam a forma como estes dois fatores se inter-relacionam. Trabalhos descrevem a forma como a perfusão vascular evolui no período pós-ovulação e associam as mudanças no perfil sérico de progesterona aos eventos vasculares do corpo lúteo, evidenciando uma relação diretamente proporcional. O nível de P4, assim como a perfusão, aumenta progressivamente, e atinge os valores máximos entre o D8 e o D14. Da mesma forma, durante o período de luteólise, a perfusão cai e logo após acontece o declínio deste hormônio^{16,6}. O presente estudo demonstra concordância com os dados acima citados, já que a vascularização aumentou exponencialmente até o D6 e a concentração de P4 seguiu este mesmo padrão. O declínio no número de pixels começou a ocorrer no D8, mas ficou evidente de fato (baseado em ambas as análises, objetiva e subjetiva) apenas no D10. O perfil hormonal neste período passa então a sofrer acréscimos bem mais discretos.

Dessa forma, ratifica-se o uso do Doppler como método auxiliar na estimativa de concentração de P4 circulante. Podendo-se, através de mais estudos, traçar um valor confiável de vascularização que reflita em quantidades ideais de hormônio circulante.

A expressão de VEGF como um dos principais fatores no processo de angiogênese em diversas partes do organismo já foi mencionada por vários pesquisadores^{17,14}. A expressão de VEGF nas células luteais, verificada através de imunohistoquímica, alcança seu ápice no início da fase luteínica e diminui drasticamente com o início da luteólise. Além disso, a expressão luteínica de receptores de VEGF é alta no D4, mantendo seus níveis até o D10 e diminuindo consideravelmente após este período¹⁸.

Os resultados das dosagens de VEGF deste estudo mostram uma concentração sanguínea progressiva na fase luteínica inicial, com pico de 2,706 mg/mL no D6. Entretanto, observou-se uma diminuição no D8, quando a concentração declinou para 1,404 mg/mL. É importante salientar que no último dia de avaliação (D10) os níveis de VEGF sofreram um novo aumento, chegando a 1,902 mg/mL. Este evento não alterou os outros padrões avaliados e pode ser justificado por diversos fatores, dentre eles uma onda de crescimento folicular no ovário contralateral.

Não foram encontrados, na literatura pesquisada, valores exatos para a concentração sanguínea de VEGF relacionada aos processos de luteogênese e luteólise. A expressão inicial de VEGF

coincide com os níveis de vascularização do tecido luteínico e aumenta a atividade secretória de P4 das células luteais através de uma provável atuação junto às enzimas esteroidogênicas, que regulam a produção hormonal de maneira autócrina e/ou parácrina^{19,20}. Durante a realização deste trabalho, foi observada uma concordância entre a perfusão sanguínea do tecido luteal e a concentração sanguínea de VEGF, que apresentaram valores crescentes na fase inicial, atingindo o pico no D6. Da mesma forma, houve similaridade nos padrões de concentração de P4 e concentração de VEGF, com aumentos exponenciais até o D6.

A janela de sincronia entre doadora e receptora é um dos fatores fundamentais para o sucesso de um programa de transferência de embriões. A janela mais utilizada é +1 (ovulação da receptora um dia antes da doadora) a -3 (ovulação da receptora três dias depois da doadora), de acordo com estudos atuais²¹.

Até o D8 pós-ovulação o animal apresentou tônus uterino (3+++), escore de vascularização e concentração de P4 descritos como ideais – fatores estes que indicam boa funcionalidade do CL – além de estar dentro da janela descrita como ideal. Logo, pode-se afirmar que até essa data o animal apresentava plenas condições para receber um embrião e, caso fosse realizada a inovulação, teria grandes chances de confirmar a gestação, sem que houvesse a regressão do CL nos momentos subsequentes.

Conclusão

Tendo em vista a boa concordância entre os métodos de análise subjetivo e objetivo das imagens dos exames ultrassonográficos, e as correlações diretamente proporcionais encontradas entre a vascularização e a produção de progesterona, entre a vascularização e a concentração de VEGF e entre a concentração de VEGF e produção de P4, podemos destacar o uso do Doppler como uma ferramenta promissora na rotina prática do médico veterinário para a avaliação do status funcional do corpo lúteo.

Entretanto, mais estudos são necessários, com um maior número de animais avaliados, para que a técnica seja validada e para que, de fato, se conheçam as relações entre o fluxo sanguíneo luteal e a funcionalidade desta glândula. Assim, o Doppler poderá ser utilizado como método auxiliar na escolha de éguas receptoras e poderá servir no acompanhamento do desenvolvimento e regressão do corpo lúteo, indicando sua responsividade a tratamentos hormonais, melhorando a relação entre tempo e resultado quando utilizado em um programa de transferência de embriões.

Agradecimentos

À Dra. Maria Fernanda de Mello Costa pela mesnuração da VEGF.

Referências

- 1 Veiga AP. Taxa de gestação em éguas Mangalarga-Marchador inovuladas em diferentes dias após a ovulação induzida com hCG. Vassouras. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Severino Sombra. 2007.
- 2 Lopes EP, Pinho RO, Siqueira JB, Rocha NA, Pereira JVTN, Martins LF, Freitas BW, Guimarães JD. Correlação dos fatores que interferem na eficiência reprodutiva de éguas Mangalarga marchador em programas de transferência de embriões. *Rev Bras Med Vet.* 2013; 35(1): 69-75.
- 3 Schams D, Berisha B. Regulation of corpus luteum functions in cattle: an overview. *Reprod Domest Anim.* 2004 (39): 241-51.
- 4 Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82/83: 127-40.
- 5 Sichter J, Rajmon R, Hosková K, Reháč D, Vostry L, Hartlová H. The luteal blood flow, area and pixel intensity of corpus luteum, levels of progesterone in pregnant and nonpregnant mares in the period of 16 days after ovulation. *Czech J Anim Sci.* 2013; 58 (11): 512-19.
- 6 Ferreira JC, Meira C. Aplicação da ultrassonografia colorida Doppler em programas de transferência de embriões equinos. *Ciê Rur.* Santa Maria. 2011; 41 (6): 1063-69.
- 7 Silva LDM, Barbosa CC, Pereira BS. O uso da ultrassonografia Doppler na reprodução de cadelas e gatas. *Rev Bras Reprod Anim.* 2011; 35 (2): 198-201.
- 8 Ginther OJ. Characteristics of the ovulatory season. In: _____. *Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects.* 2 ed. Madison: Equiservices, 1992. p. 173-232
- 9 Cunningham JG, Klein BG. Ciclos reprodutivos. In: _____. *Tratado de fisiologia veterinária.* 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 423-429
- 10 Carnevale EM, Frank-Guest BL, Stokes JE. Effect of equine oocyte donor age on success of oocyte transfer and intracytoplasmic sperm injection. *Anim Reprod Sci.* 2000; 121: 258-59.
- 11 Brogan PT, Henning H, Stout TAE, Ruijter-Villani M. Relationship between colour flow Doppler sonographic assessment of corpus luteum activity and progesterone concentrations in mares after embryo transfer. *Anim Reprod Sci* 2016; 166: 22-7.
- 12 Ginther OJ. Producing color-flow images. In: *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography.* Ed. OJ Ginther. Cross Plains: Equiservices Publishing, 2007.
- 13 Romano RM. Influência da gonadotrofina coriônica humana sobre a hemodinâmica de folículos pré-ovulatórios e desenvolvimento luteal em éguas. Botucatu. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – UNESP. 2013

14 Maia VN. Avaliação da vascularização e da angiogênese de corpos lúteos de éguas com ovulação natural e induzida por acetato de deslorrelina. Recife. Tese (Doutorado em Ciência Animal Tropical). Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2015.

15 Ignacio FS, Ferreira JC, Meira C. Uterine and luteal hemodynamic evaluation of the pregnant mare. *Acta Sci Vet.* 2011; 39: 117-21.

16 Ginther OJ, Gestal EL, Gestal MO, Utt MD, Beg MA. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science.* 2007; 99: 213-220.

17 Miyamoto A, Shirasuna K, Sasahara K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. *Dom Anim Endoc.* 2009; 37: 159-69.

18 Al-zi'abi MO, Watson ED, Fraser HM. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. *Reprod.* 2003; 125: 259-70.

19 Moura CE. Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2003.

20 Galvão A, Henriques S, Pestka D, Lukasik K, Skarzynski D, Mateus LM, Ferreira-Dias GML. Equine luteal function regulation may depend on the interaction between cytokines and vascular endothelial growth factor: an in vivo study. *Biol Reprod.* 2012; 86(6):1-9.

21 Alonso MA, Fleury PDC, Alvarenga MA. Utilização de éguas receptoras de embrião três dias (D3) após a ovulação. Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Equídeos – ABRAVEQ. Disponível em: <<http://www.itarget.com.br/newclients/abraveq2012/?p=2355>>. Acesso em 18 de setembro de 2016.