



Foto: Adilson Werneck

COMUNICADO
TÉCNICO

207

Brasília, DF
Maio, 2020

Embrapa

Vascularização luteal e diagnóstico de gestação precoce em ovinos

Lucas Macedo Santos
Gabriela Cordeiro Brilhante
Jéssica Drechmer
Luis Alberto Martins P de Melo
Alexandre Floriani Ramos
Bianca Damiani Marques Silva

Vascularização luteal e diagnóstico de gestação precoce em ovinos¹

¹ Lucas Macedo Santos, Graduando do curso de Medicina Veterinária - Uniceplac; Gabriela Cordeiro Brilhante, Graduanda do curso de Medicina Veterinária - Uniceplac; Jéssica Drechmer, Médica Veterinária autônoma, graduada pelo Instituto Federal Catarinense – IFC; Luis Alberto Martins P de Melo, Analista de TI, doutor em Geografia, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Alexandre Floriani Ramos, Doutor em Ciência Animal, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Bianca Damiani Marques Silva, Doutora em Ciência Animal, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasília - DF.

Introdução

O rebanho brasileiro de ovinos, em 2017, foi contabilizado em cerca de 13,7 milhões de cabeças, concentrados principalmente nas regiões nordeste e sul do país, tendo em destaque os estados da Bahia e Rio Grande do Sul como as unidades da federação com os maiores rebanhos. A ovinocultura é uma importante atividade econômica para o país, sendo praticada em muitas propriedades de grande e pequeno porte (IBGE, 2018).

Devido à demanda dos ovinocultores por maior eficiência produtiva e reprodutiva, foram desenvolvidas e aprimoradas técnicas como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e transferência de embrião em tempo fixo (TETF), que tem como principal objetivo a indução do estro e da ovulação, de forma sincronizada nos lotes de animais tratados. Essas técnicas apresentam como principais vantagens a não necessidade de

observação de estro, padronização do rebanho com lotes mais uniformes, minimização dos riscos sanitários, aumento da eficiência reprodutiva podendo usar animais de genética superior, redução do intervalo entre partos e concentração dos nascimentos em épocas estratégicas (Menchaca e Rubianes, 2004).

O diagnóstico gestacional é uma ferramenta importante, pois permite identificar os animais prenhez e assim estabelecer o manejo específico para diferentes lotes, podendo-se repetir ou fazer uso de novo protocolo de sincronização nos animais não gestantes. O diagnóstico de gestação é comumente realizado com o uso da ultrassonografia convencional modo B, 30 dias após a inseminação artificial ou cobertura. O diagnóstico precoce aos 20 dias permite a tomada de decisões mais rápidas sobre o rebanho, principalmente quanto ao destino dos animais que não emprenharam. Isto porque, estes poderão então serem sincronizados novamente ou retirados do rebanho, aumentando assim a eficiência reprodutiva, a uniformidade de lote e reduzindo as perdas da produção.

A ultrassonografia com Doppler Colorido permite avaliar a funcionalidade dos órgãos por sua vascularização, a partir do fluxo dos líquidos nos vasos (Matsui e Miyamoto, 2009). O corpo lúteo (CL) é um dos órgãos mais vascularizados do organismo, recebendo um alto fluxo de sangue quando está funcional (Gaytan et al., 1999). Algumas horas após o fim da manifestação do estro e da ovulação, inicia-se a formação do CL, que irá permanecer funcional no ovário por volta de 14 dias caso não ocorra gestação. Nesse caso desencadeará o mecanismo de luteólise, com consequente redução da vascularização e da produção de progesterona (P4) para dar início a um novo ciclo. Havendo gestação, a fase luteal será prorrogada até próximo ao nascimento, com o CL mantendo a produção de P4, seu diâmetro e sua irrigação (Ayres e Mingoti, 2012).

Em bovinos já foi possível identificar vacas não prenhez aos 21 dias pós IA pela avaliação do fluxo sanguíneo luteal (Guimarães et al., 2015), como o ciclo estral na ovelha é mais curto, cerca de 17 dias, a identificação de um CL em luteólise será possível num menor intervalo de tempo, como foi visto por Arashiro et al. (2018), tiveram acurácia de 86% ao avaliar o fluxo sanguíneo luteal a partir de D17 para diagnóstico precoce de prenhez.

O objetivo deste trabalho foi validar a técnica de diagnóstico de gestação precoce em ovinos através da verificação do nível de acurácia da avaliação da irrigação luteal na predição precoce de

prenhez em fêmeas ovinas. Objetivou-se também descrever de forma simples e objetiva os critérios a serem considerados na avaliação ultrassonográfica dos ovários com o uso de Doppler colorido para o diagnóstico de gestação aos 17 dias.

Materiais e métodos

O experimento foi realizado no Setor de Campo Experimental Fazenda Sucupira (SCEFS) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, utilizando 54 ovelhas e 7 carneiros da raça Santa Inês, com idades entre 2 e 5 anos e aptos à reprodução. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA), da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (protocolo nº 003-2019).

Os animais foram submetidos a um protocolo de sincronização de estro com dispositivo de progesterona, que permaneceu por 7 dias e aplicação de 300 UI de eCG (gonadotrofina coriônica equina) e 0,275 mg de PGF2 α (prostaglandina F2 α) IM no momento da retirada do dispositivo. As ovelhas foram colocadas com os carneiros para monta natural no período de 28 a 54 horas após a retirada do dispositivo.

A avaliação da vascularização dos corpos lúteos para o diagnóstico de gestação precoce foi realizada pela via transretal utilizando-se aparelho de ultrassom com Doppler colorido (MyLab™ 30GoldVET, Esaote S.P.A., Firenze,

Itália), com transdutor linear adaptado para uso em ovinos. O transdutor é fixado com fita adesiva à um tubo de PVC de 1/2 polegada (20mm) de diâmetro e 35 centímetros de comprimento, serrado ao longo de sua extensão e moldado previamente em água quente, de modo a permitir um mais preciso encaixe do transdutor em seu interior (Figura 1).



Figura 1 – Cabo de PVC previamente confeccionado, transdutor linear e fita adesiva; transdutor já fixado no cabo de PVC com fita adesiva.

Com o animal contido em tronco de contenção (Figura 2), previamente a introdução do transdutor foi realizada a aplicação de 10 ml de mucilagem (carboximetilcelulose) no reto do animal. Com o transdutor posicionado buscou-se a visualização dos ovários, que comumente estão localizados após a passagem do transdutor sobre a bexiga e próximos aos cornos uterinos, avaliando-se se havia presença de corpo lúteo e então seu grau de vascularização. As avaliações foram realizadas entre 13 e 21 dias, intercalados, após a cobertura. O diagnóstico de gestação foi confirmado 30 dias após a cobertura, pela

constatação da presença de feto com batimento cardíaco.



Figura 2 – Animais contidos em tronco, para as avaliações ultrassonográficas.

A classificação da vascularização foi realizada considerando o percentual da vascularização na borda e no interior do corpo lúteo, sendo: grau 1 entre 0 e 25 % de vascularização (Figura 3), grau 2 entre 26 e 50% (Figura 4), grau 3 entre 51 e 75% (Figura 5) e grau 4 entre 76 e 100% (Figura 6).

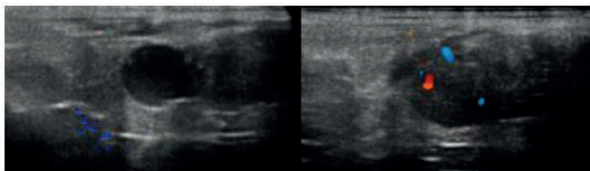


Figura 3 – Corpos lúteos Grau 1 apresentando entre zero e 25% de sua área com vascularização.

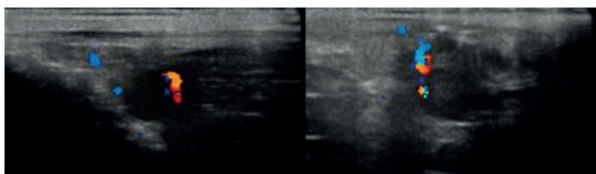


Figura 4 – Corpos lúteos Grau 2 apresentando entre 26 e 50% de sua área com vascularização.

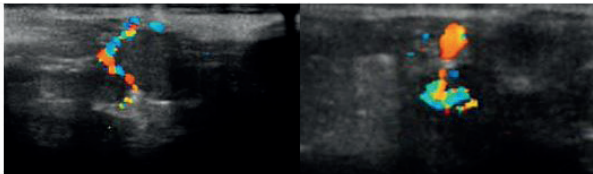


Figura 5 – Corpos lúteos Grau 3 apresentando entre 51 e 75% de sua área com vascularização.

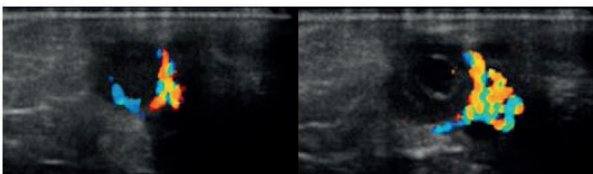


Figura 6 – Corpos lúteos Grau 4 apresentando entre 76 e 100% de sua área com vascularização. Corpo lúteo cavitário (B).

As análises estatísticas foram realizadas pela curva ROC (*Receiver operating characteristic*). Nos dias de avaliação luteal foram realizadas previsões do diagnóstico de gestação baseado nos graus de vascularização do CL, no qual as ovelhas que apresentaram CL com graus 1 e 2 foram consideradas não gestantes, enquanto as ovelhas que apresentaram vascularização luteal nos graus 3 e 4 foram consideradas gestantes. Os animais com dois ou mais corpos lúteos foram analisados pela média das avaliações dos mesmos, considerando os resultados iguais ou superiores a 2,5 como gestantes, e inferiores a 2,5 como não gestantes. Foi considerado grau de significância de 5%.

Resultados e discussão

As avaliações em D13 e D15 apresentaram um baixo percentual de diagnósticos corretos, com acurácia de 63% no D13 e 67% no D15, e alto número de falsos positivos ($P > 0,05$) (Tabela 1). A sensibilidade e especificidade nesses dias tem valores de AUC (*area under the ROC curve*) próximas a 0,5, o que indica um procedimento preditivo com baixa acurácia (Figura 7). Isso deve ter ocorrido devido à fase do ciclo estral em que os animais se encontravam no dia das avaliações (final do diestro), apresentando fisiologicamente vascularização luteal, independentemente de estarem gestantes ou não (Arashiro et al., 2018).

As avaliações em D17, D19 e D21 apresentaram alto percentual de previsões corretas, com acurácia dos diagnósticos em torno de 90%. O valor de AUC foi maior nesses dias do que em D13 e D15 ($P < 0,05$) (Tabela 1, Figura 7) além de terem valores mais próximos a 1, que indica melhor acurácia do procedimento. Isto poderia ser explicado devido ao início da luteólise nos animais não prenhez, em D17, o que justificaria uma progressiva redução no grau de vascularização também nas avaliações seguintes. Já as ovelhas gestantes mantiveram um padrão de irrigação Grau 3 ou Grau 4 em todas as avaliações realizadas.

A vascularização luteal foi avaliada de modo semiquantitativo por Dal et al. (2019), utilizando software para análise

das imagens de CL e avaliaram que a partir de D17 os animais gestantes tinham maior área de pixels coloridos no CL do que os não gestantes.

Tabela 1 – Previsão de diagnóstico de gestação em ovelhas através da avaliação ultrassonográfica da vascularização luteal em D13, 15, 17, 19 e 21 pós IA.

Dia	TP FP	FN TN	Sensitividade (S) Especificidade (E)	AUC IC (95%)	p-valor
13	TP=33 FP=20	FN=0 TN=1	S = 1 E = 0.0476	0.524 (0.477 – 0.570)	0.3219
15	TP=33 FP=18	FN=0 TN=3	S = 1 E = 0.1429	0.571 (0.495 – 0.648)	0.0735
17	TP=32 FP=16	FN=1 TN=15	S = 0.9697 E = 0.7143	0.842 (0.739 – 0.945)	< 0.0000 ^(*)
19	TP=31 FP=3	FN=2 TN=18	S = 0.9394 E = 0.8571	0.898 (0.811 – 0.985)	< 0.0000 ^(*)
21	TP=31 FP=5	FN=2 TN=16	S = 0.9394 E = 0.7619	0.851 (0.749 – 0.953)	< 0.0000 ^(*)

Obs.: TP (true positive), FP (false positive), TN (true negative), FN (false negative). AUC é a área sob a curva (AUC) ROC. (*) o teste foi significativo ao nível de 5%

Foi comparado o valor de AUC entre os dias 17, 19 e 21, não havendo diferença estatística entre eles ($P > 0,05$), o que indica acurácia semelhante entre os dias.

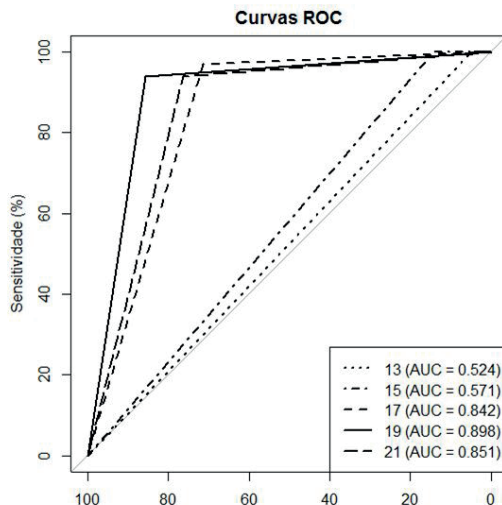


Figura 7 - Curvas ROC dos procedimentos de predição de diagnóstico para D13, 15, 17, 19 e 21 pela avaliação ultrassonográfica da vascularização luteal em ovelhas.

Verificou-se assim que a partir de D17, os animais com irrigação luteal acima de 50% em sua área obtiveram 87,04% de acertos quanto a previsão do diagnóstico de gestação, confirmando a acurácia dos resultados encontrados por Arashiro et al. (2018), pois é desejável obter resultados precisos o quanto antes. Podendo ser uma metodologia utilizada a campo, principalmente se aliada a esta ocorrer uma re-sincronização dos animais não gestantes, diminuindo o intervalo entre as coberturas, consequentemente diminuindo o período de cobertura, resultando em uma maior concentração da época de parição e na redução do intervalo entre partos,

umentando a uniformidade dos lotes e a eficiência do rebanho.

Conclusão

A avaliação subjetiva da vascularização do corpo lúteo de ovelhas por ultrassonografia Doppler, a partir do dia 17 pós-cobertura, teve uma alta correlação com prenhezess positivas, podendo ser uma ferramenta eficaz para diagnóstico de gestação precoce.

Referências

- ARASHIRO, E. K. N.; UNGERFELD, R.; CLARIGET, R. P.; PINTO, P. H. N.; BALARO, M. F. A.; BRAGANÇA, G. M.; RIBEIRO, L. S.; FONSECA, J. F. D.; BRANDÃO, F. Z. Early pregnancy diagnosis in ewes by subjective assessment of luteal vascularization using colour Doppler ultrasonography. **Theriogenology**, v.106, p.247-252, 2018.
- AYRES, H.; MINGOTI, G. Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 3, p. 174-180, 2012.
- DAL, G. E.; ENGINLER, S. O.; BAYKAL, K.; SABUNCU, A. Early pregnancy diagnosis by semiquantitative evaluation of luteal vascularity using power Doppler ultrasonography in sheep. **Acta Veterinaria Brno**, v. 88, n.1, p.19-23, 2019.
- GAYTAN, F.; MORALES, C.; GARCIA-PARDO, L.; REYMUNDO, C.; BELLIDO, C.; SANCHEZ-CRIADO, J. E. A quantitative study of changes in the human corpus luteum microvasculature during the menstrual cycle. **Biology Reproduction**, v. 60, p. 914-919, 1999.
- GUIMARÃES, C. R. B.; OLIVEIRA, M. E.; ROSSI, J. R.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M.; PALHAO, M. P. Corpus luteum blood flow evaluation on Day 21 to improve the management of embryo recipient herds. **Theriogenology**, v. 84, p.237-241, 2015.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Agropecuário 2017. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, v. 7, p.1-108, 2018.
- MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: practical use for reproductive management in the cow. **Veterinary Journal**, v.181, n.3, p.232-240, 2009.
- MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, n.4, p.403-413, 2004.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624

www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

1ª impressão (ano): tiragem

Impressão e acabamento



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



**PÁTRIA AMADA
BRASIL**
GOVERNO FEDERAL

Comitê Local de Publicações da Unidade Responsável

Presidente

Milene Castellen Sathler

Secretária-Executiva

Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros

Bruno Machado Teles Walter; Daniela Aguiar de Souza; Eudes de Arruda Carvalho; Luiz Joaquim Castelo Branco Carvalho; Marcos Aparecido Gimenes; Solange Carvalho Barrios Roveri Jose; Márcio Martinello Sanches; Sérgio Eustáquio de Noronha

Supervisão editorial

Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto

Bianca Damiani M. Silva

Normalização bibliográfica

Ana Flávia do N. Dias

Tratamento das ilustrações

Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Adilson Werneck

Foto da capa

Adilson Werneck