

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO - UFRPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

VICTOR NETTO MAIA

**AVALIAÇÃO DA VASCULARIZAÇÃO E DA ANGIOGÊNESE DE CORPOS
LÚTEOS DE ÉGUAS COM OVULAÇÃO NATURAL E INDUZIDA POR
ACETATO DE DESLORELINA**

RECIFE – PE

2015

VICTOR NETTO MAIA

**AVALIAÇÃO DA VASCULARIZAÇÃO E DA ANGIOGÊNESE DE CORPOS
LÚTEOS DE ÉGUAS COM OVULAÇÃO NATURAL E INDUZIDA POR
ACETATO DE DESLORELINA**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientadora: Profa. Dra. Aurea Wischral.

RECIFE – PE

2015

Ficha catalográfica

M217a Maia, Victor Netto
Avaliação da vascularização e da angiogênese de corpos lúteos
de éguas com ovulação natural e induzida por acetato de deslorelina
/ Victor Netto Maia. -- Recife, 2015.
67 f. : il.

Orientadora: Aurea Wischral.
Tese (Doutorado em Ciência Animal Tropical) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e
Fisiologia Animal, Recife, 2015.

Referências.

1. Acetato de deslorelina 2. Angiogênese 3. Vascularização
4. Equino I. Wischral, Aurea, orientadora II. Título

CDD 636.089

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

Recife, 31 de março de 2015.

Victor Netto Maia

Profa. Aurea Wischral (orientadora)

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares – DMFA – UFRPE – PGCAT

Prof. Dr. Helio Cordeiro Manso Filho – DZ/UFRPE

Profa. Dra. Elayne Cristine da Silva – UNINASSAU

Dr. André Mariano Batista – UFRPE – PNPB

Aos meus pais, Mauricio do Rego Barros Maia e Dolores de Fátima Netto Maia, Meus irmãos, Daniel Netto Maia e Juliana Netto Maia, por serem tão presentes em minha vida; sendo sempre porto seguro.

À Karinna Romeiro Maia, minha esposa, pelo companheirismo, pelo ouvido sempre disposto, pelas palavras de amor e de incentivo.

Aos meus filhos, Mariah Romeiro Maia e Victor Romeiro Maia, meus tesouros e meu eterno incentivo de seguir em frente.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar por me dar força e condições de cumprir meus objetivos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, pela oportunidade de realizar este Programa de Pós-Graduação e à FACEPE pela bolsa de estudos.

Aos Amigos de toda minha caminhada acadêmica, Dr. Gustavo Ferrer, Dr. Oswaldo Gomes, Dr. André Mariano, Dra. Sildivane Valcácia, Dra. Ellen Cordeiro, a todos do FAMA, em especial aos contemporâneos de Pós – Graduação, Diogo, Sandra, Debora, Suzana, Albeline e Maria.

À Profa. Dra. Aurea, por ter aceitado me orientar e pelo profissionalismo com que executou o papel de orientadora e amiga, contribuindo de forma imprescindível para a qualidade final deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação pela dedicação e ensino.

A todos os estagiários que me acompanharam nesta jornada, em especial a Sylvinho e a Igor (hoje colega de trabalho).

A todos os clientes que desde minha formatura acreditaram em meu trabalho.

Aos animais que participaram deste estudo, pelo aprendizado proporcionado, cuja utilização ajudou no desenvolvimento científico para um bem maior.

Aos alunos e todos da UNINASSAU, pela confiança e carinho.

Aos meus amigos e a todos que, em algum momento e de alguma forma, tenham contribuído com esta empreitada, seja na torcida ou nas orações.

A todos os meus familiares.

Muito obrigado a todos.

LISTA DE FIGURAS e GRÁFICOS

	Pag.
Revisão de Literatura	
Figura 1 – Fórmula química do acetato de deslorelina. Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ADeslorelin.svg . Por Alison (Own work) [CC BY-SA 3.0 (http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0)].	20
Capítulo 1	
Figura 1 – Média e erro padrão da média do percentual de vascularização do corpo lúteo (% Vasc. CL) e dosagem de progesterona sérica (P4 ng/mL) conforme o tipo de ovulação e dia de avaliação após a ovulação.	42
Figura 2 – Imagens representativas da vascularização do corpo lúteo equino aos 4 (A), 8 (B) e 12 (C) dias após a ovulação, por ultrassonografia Doppler colorida.	44
Capítulo 2	
Figura 1 – Média e erro padrão da média da expressão relativa do mRNA dos genes do LHR, VEGF e bFGF em corpos lúteos de éguas com ovulação natural ou induzida com acetato de deslorelina, conforme o tempo pós-ovulatório.	57

LISTA DE TABELAS**Pag.****Capítulo 2**

Tabela 1- Sequências de oligonucleotídeos utilizados para amplificar os 55
fragmentos dos genes estudados.

MAIA, V.N. Avaliação da vascularização e da angiogênese de corpos lúteos de éguas com ovulação natural e induzida por acetato de deslorelina. Recife, 2015. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2015.

RESUMO

Muito tem sido feito no intuito de potencializar a aplicação e os resultados das biotécnicas de reprodução assistida na espécie equina, no entanto ainda são escassos os estudos sobre vascularização do corpo lúteo (CL) e sua relação com a progesterona em éguas induzidas com acetato de deslorelina; bem como, sua relação com os fatores angiogênicos e suas consequências quando a ovulação é induzida. Foram utilizadas éguas com ovulação natural (GC) e induzida (GT) com acetato de deslorelina (folículo >35mm). No primeiro experimento, os ovários foram acompanhados por ultrassonografia Doppler (6,5 MHz), nos dias 4, 8 e 12 após a ovulação (D0), quando também foram obtidas amostras de sangue para dosagem de progesterona. Os CLs foram analisados quanto a sua vascularização e as imagens gravadas em vídeo. A análise das imagens considerou o percentual de área do parênquima luteal que estava apresentando sinais coloridos. A concentração de progesterona foi analisada por enzima-imunoensaio. Os resultados foram apresentados em média \pm erro padrão da média. As médias de vascularização foram no GC: $76,25 \pm 8,98$; $70,00 \pm 8,16$ e $57,50 \pm 13,31\%$ e no GT: $85,00 \pm 5,40$; $90,00 \pm 0,00$ e $58,75 \pm 9,24\%$, respectivamente para os dias 4, 8 e 12 após a ovulação. As concentrações de progesterona foram no GC: $6,21 \pm 0,61$; $5,82 \pm 1,44$ e $4,63 \pm 0,79$ ng/mL e no GT: $6,10 \pm 1,18$; $4,67 \pm 1,06$ e $4,49 \pm 1,37$ ng/mL respectivamente para os dias 4, 8 e 12 após a ovulação. Os percentuais de vascularização apresentaram valores superiores nos dias 4 e 8 comparados ao D12 do GT ($P < 0,05$), não havendo diferença nos dias do GC, nem entre os grupos a cada momento estudado. As concentrações de progesterona não apresentaram diferenças significativas entre grupos ou momentos estudados. No segundo experimento, foram

tomadas amostras do CL através de biópsia guiada por ultrassom (5 MHz), nos mesmos períodos, e os fatores angiogênicos analisados pela expressão do mRNA dos genes VEGF, bFGF e receptor de LH (LHR) utilizando PCR em tempo real. Foi observada correlação positiva entre VEGF e LHR ($P < 0,00001$, $r = 0,78$). A expressão do LHR no D4 foi maior no GT do que no GC ($p < 0,05$). Também observou-se maior expressão nos D-4 e D-8 do que o D-12 do GT. A expressão do VEGF declinou no D12 comparado aos dias D4 e D8 do GT ($P = 0,06$). O bFGF foi expresso em todos os momentos dos dois grupos, porém sem diferença significativa. Conclui-se que o acetato de deslorelina, foi eficiente para a indução de ovulação em éguas, não alterando as respostas fisiológicas do corpo lúteo no que diz respeito a concentração plasmática de progesterona. No entanto, aumentou a responsividade do CL ao LH através de seus receptores, principalmente no quarto dia após a ovulação. Também a expressão do gene do VEGF foi influenciada pela indução da ovulação, tendo uma queda mais acentuada aos 12 dias após a ovulação, o que deve ser esperado em éguas não prenhes.

Palavras – chave: indutor de ovulação, progesterona, equino, vascularização, VEGF, bFGF

MAIA, V.N. Evaluation of vascularization and angiogenesis of corpus luteum in mares with spontaneous ovulation and induced with deslorelin acetate. Recife, 2015. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2015.

ABSTRACT

Much has been made in order to enhance the implementation and improve results of assisted reproductive biotechnologies in mares, however there are still few studies on vascularization of the corpus luteum (CL) and its relation to progesterone and angiogenic factors and their consequences when the ovulation is induced with deslorelin acetate. Mares were used in natural ovulation (GC) condition and induced (GT) with deslorelin (>35 mm follicles). In the experiment 1 ovulation and CL formation were followed by Doppler ultrasound (6.5 MHz), on days 4, 8 and 12 after ovulation (D0). Blood samples were obtained for progesterone assay by enzyme-immunoassay. The CLs were analyzed for vascularization, and images were recorded in video. Image analysis considered the percentage of luteal parenchymal area presenting color signals. The results were presented as mean \pm epm. The average vascularization was in GC: 76.25 \pm 8.98; 70.00 \pm 8.16 and 57.50 \pm 13.31 % and in GT: 85.00 \pm 5.40, 90.00 \pm 0.00 and 58.75 \pm 9.24 % respectively for the days 4, 8 and 12 after ovulation. Progesterone concentrations were in GC: 6.21 \pm 0.61; 5.82 \pm 1.44 and 4.63 \pm 0.79 ng/mL and GT: 6.10 \pm 1.18; 4.67 \pm 1.06 and 4.49 \pm 1.37 ng/ml, respectively for the 4, 8 and 12 days after ovulation. The patterns of vascularization were higher in D4 and D8 compared to D12 of GT (P<0.05). However, there were no differences between groups or days in GC. The concentration of progesterone didn't show significant differences between groups or studied days. In experiment 2, samples of CL were collected through ultrasound guided biopsy at the same time points after ovulation. The mRNA expression of VEGF, BFGF and LHR genes were analyzed by real time PCR. It was observed positive correlation between VEGF and LHR (P < 0.00001, r = 0.78), and it was possible to

detect a higher LHR expression in D4 of GT than GC ($p < 0.05$), moreover this expression was higher in D4 and D8 than D12 of the GT group. bFGF was also expressed in luteal tissue in all days of both groups, however without statistical differences. It was concluded that deslorelin acetate was effective to induce ovulation in mares which did not alter the physiological responses of the corpus luteum in respect of the plasma progesterone concentration, however, affected luteal parenchyma vasculature. Also, LHR and VEGF expression was influenced by induced ovulation, with a lower level at D12, what must be expected in non-pregnant mares.

Keywords: ovulation inducer, progesterone, equine, vascularization, VEGF, bFGF

SUMÁRIO

	Pag.
Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Lista de Figuras e Gráficos	vii
Lista de Tabelas	viii
Resumo	ix
Abstract	xi
1 Introdução	14
2 Revisão de Literatura	16
2.1 Corpo Lúteo	16
2.1.1 Formação e Composição	16
2.1.2 Angiogênese e Vascularização do Corpo Lúteo.....	17
2.3 Progesterona	18
2.4 Indução da Ovulação em Éguas.....	19
2.4.1 Histórico	19
2.4.2 Deslorelina	19
2.5 Ultrassonografia Doppler	21
2.5.1 Histórico e Princípio	21
2.5.2 Utilização na Reprodução Equina.....	22
2.5.3 Doppler em Corpo Lúteo de Éguas	23
2.6 Receptores do Hormônio Luteinizante (LHR).....	23
2.7 Fator de Crescimento Vascular Endotelial	25
2.8 Fator de Crescimento do Fibroblasto.....	26
3 Objetivos	27
4 Referências Bibliográficas.....	28
5 Capítulo 1	36
6 Capítulo 2	48
7 Conclusões Finais	67

1 INTRODUÇÃO

A grande quantidade de animais que compõe o plantel nacional e a grande importância econômica, somados ao papel que o cavalo tem hoje na vida das pessoas (ALONSO, 2013), tem contribuído bastante para o desenvolvimento das biotécnicas de reprodução assistida nesta espécie devido a crescente busca por parte dos criadores (GASTAL et al, 2009). Com isso, fica cada vez mais necessária a busca por melhores resultados, principalmente nas transferências de embriões (T.E.) cujo sucesso tem como um dos fatores determinantes, entre outros aspectos, a escolha adequada da receptora (SANTOS et al., 2005). Neste sentido, se faz necessária a investigação elucidativa sobre as características inerentes à receptora, tais como qualidade, vascularização e aspecto do corpo lúteo (CL), além de sua produção de progesterona, indispensável na manutenção da gestação.

Pelo fato das éguas possuírem como característica fisiológica um longo período de estro, o uso da indução da ovulação através de hormônios exógenos é de fundamental importância para reprodução assistida (FERRIS et al., 2012), visto que, auxilia diretamente nos índices de sucesso nas inseminações artificiais (I.A.). Desta forma, a busca por indutores de ovulação para esta espécie vem sendo, constantemente, alvo de muitos pesquisadores. O hormônio mais utilizado para esta finalidade, a gonadotrofina coriônica humana (hCG), vem sendo associado à produção de anticorpos reduzindo assim, sua eficiência em induzir a ovulação em éguas com exposições contínuas a este protocolo (LEY, 2006). Assim, o acetato de deslorelina tem sido utilizada como indutor de ovulação para essas fêmeas. Seu mecanismo de ação se dá através do estímulo das células da hipófise para sintetizar e liberar o hormônio luteinizante (LH), que vai se ligar aos receptores específicos no ovário e induzir a maturação folicular e a ovulação (McCUE et al., 2004).

O CL é imprescindível para a manutenção da gestação, tendo em vista seu papel na secreção da progesterona que é produzida nos ovários, na placenta e nas glândulas adrenais (SPENCER et al., 2004; SILVA et al., 2012; HAFEZ e HAFEZ, 2004). O entendimento dos processos morfofisiológicos do CL pode auxiliar bastante na avaliação e seleção de receptoras aptas e com elevada chance de levar uma gestação a termo.

O uso da ultrassonografia na reprodução equina já é indispensável no dia-a-dia do veterinário de campo. Com o surgimento da tecnologia color Doppler, foi possível avaliar mais detalhadamente os órgãos e tecidos e, no que se refere a reprodução, possibilitou a avaliação da perfusão vascular do trato reprodutivo de éguas (GINTHER et al., 2006), viabilizando a avaliação das características vasculares do CL. A relação entre fluxo de sangue luteal e produção de progesterona (P_4) foi demonstrada por Ginther et al. (2007) e Bollwein et al. (2002), durante o ciclo estral de éguas, observando que a vascularização do CL reflete de forma confiável os níveis de P_4 .

Durante a formação do CL, há uma intensa angiogênese, iniciada a partir da vascularização do folículo pré ovulatório, que leva a formação de uma densa rede de capilares que irão possibilitar às células produtoras de hormônios obterem oxigênio e nutrientes necessários para a síntese e liberação de progesterona em quantidade adequada para o estabelecimento e manutenção da prenhez (SUZUKI et al., 1998.; GAYTÁN et al., 1999)

Pouco se conhece sobre o padrão de vascularização do CL em éguas com ovulação espontânea e induzida, tampouco sobre a relação com a expressão dos fatores angiogênicos. A determinação deste padrão pode ser uma ferramenta de avaliação e/ou escolha de uma receptora em programas comerciais de transferência de embriões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Corpo Lúteo

2.1.1 Formação e composição

Por produzir hormônio e não ser permanente, o corpo lúteo (CL) é considerado uma glândula transitória, que tem o início de seu desenvolvimento no ovário imediatamente após a ovulação. Sob a ação de um conjunto de fatores mitogênicos, angiogênicos e de crescimento, que atuam com as células foliculares remanescentes, o CL sofre a luteinização. Ao final do ciclo, sua regressão depende de aumento dos pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida pelas células endometriais. Por outro lado, a evolução do corpo lúteo cíclico em gestacional depende de um ajuste entre a produção de substâncias luteotróficas e luteolíticas iniciado a partir do reconhecimento materno da gestação (SALLES e ARAÚJO, 2010).

Os primeiros estudos sobre a origem, função e regulação do CL foram realizados por Falloppio, em 1561, e por Marcello Malpighi, em 1689, que o nomeou. Em 1672, Regnier de Graaf descreveu os CLs como corpos globulares e associou a presença destas estruturas nos ovários das coelhas com a quantidade de filhotes ao parto, ainda observou sua presença entre o coito e o parto (NISWENDER et al., 2000).

Com a ovulação, é deixado um espaço na região do folículo que é rapidamente invadido por fibroblastos, células musculares lisas e células do sistema imune (REYNOLDS et al., 1994; WEBB et al., 2002). Além dessas células, há também células endoteliais, células da teca interna e células da granulosa, que inicialmente serão responsáveis pela sua formação (DIAZ et al., 2002), sofrendo rápida diferenciação e crescimento (DAVIS e RUEDA, 2002). A luteogênese se dá em virtude de mudanças morfológicas, endócrinas e enzimáticas que ocorrem antes mesmo da ovulação, além de mudanças na população de receptores de gonadotrofinas (MOURA, 2003) até que se transforme em corpo lúteo funcional (SMITH et al., 1999) capaz de secretar grandes quantidades de progesterona e manter a gestação (SALLES e ARAÚJO, 2010)

Alguns hormônios estão ligados à formação do CL. O hormônio luteinizante (LH), produzido pela adenohipófise, é um dos principais hormônios envolvidos na formação do CL (MILVAE et al., 1996), sendo o número de receptores para LH no CL correlacionado com a produção de progesterona (JONES et al., 1992).

Em um CL maduro, são encontrados dois tipos de células esteroidogênicas, células luteais pequenas e as células luteais grandes. Ambas apresentam diferenciação morfológica e funcional e também diferente origem folicular. As células luteais pequenas originam-se das células da teca e respondem ao LH com aumento na secreção de P_4 , via ativação da proteína kinase A (SMITH et al., 1999). As células luteais grandes são originárias das células da granulosa, e contém receptores para $PGF2\alpha$ e, aparentemente, atuam na mediação das ações luteolíticas deste hormônio, além de serem responsáveis por aproximadamente 80% da progesterona secretada in vivo (NISWENDER et al., 2000).

Durante o desenvolvimento do CL, ocorre um aumento no número de receptores de LH (OKUDA et al., 1999). Estes receptores existem em abundância nas células luteínicas pequenas tornando-as mais responsivas às células luteínicas grandes, que, por sua vez, contém mais receptores de prostaglandinas, e que na ausência do estímulo do LH, secretam mais progesterona (MILVAE et al., 1996; NISWENDER et al., 2000). Segundo Liebermann e Schams (1994), o hormônio do crescimento (GH) também é um importante estimulador endócrino da secreção de progesterona no CL. O receptor de GH foi localizado nas células luteínicas grandes e nas células endoteliais do CL (LUCY et al., 1993) e de acordo com Schams et al. (1999) a expressão gênica do receptor de GH aumenta com o desenvolvimento do CL.

2.1.2 Angiogênese e vascularização do corpo lúteo

A angiogênese é um processo raro em um animal adulto, com exceção do aparelho reprodutivo feminino, cicatrização de feridas e processos tumorais (XAVIER, 2011). É o processo no qual há a formação de novos vasos sanguíneos pela proliferação e migração de células do endotélio de vasos remanescentes (TAMANINI e De AMBROGI, 2004). Este evento é indispensável para a formação e para a manutenção do CL, pois é a partir dele que ocorrerá uma adequada nutrição e, conseqüente desempenho de suas funções (YAN et al., 1998).

No CL, a vascularização está diretamente associada ao aumento do fluxo sanguíneo. Logo após a ovulação há uma diminuição do fluxo sanguíneo no folículo remanescente, que vai aumentando de acordo com a formação do CL e o aumento da concentração plasmática de progesterona (ACOSTA et al., 2003).

Um controle preciso da angiogênese no ovário é essencial para a função luteal normal. Alguns promotores da angiogênese já foram identificados, dentre eles podemos destacar o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A), o fator de crescimento de fibroblasto ácido e básico (FGF-1 e FGF-2), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1 e IGF-2) e as angiopoietinas (ANPT-1 e ANPT-2) (SCHAMS e BERISHA, 2002).

2.3 Progesterona

O principal produto secretado pelo CL é a progesterona, este hormônio é essencial para o estabelecimento e a manutenção da prenhez e desempenha um importante papel na ciclicidade ovariana (GIOMETTI et al., 2009), esta característica torna o CL vital à manutenção da gestação nos mamíferos, sendo a sua ausência e/ou lise capaz de interromper a gestação em determinadas fases da gestação de algumas fêmeas mamíferas. Este fato foi comprovado por Prenent, em 1898, que ao retirar os ovários de coelhas prenhes, notou a perda da gestação (ALONSO, 2013).

A manutenção da gestação em equinos, assim como nas demais espécies domésticas, requer constante síntese de progesterona. Sabe-se que em éguas a progesterona tem inicialmente origem ovariana, sendo secretada pelo CL primário e, a partir dos 36-40 dias de gestação, também pelos corpos lúteos suplementares (SILVA et al., 2012).

As grandes células luteais encontradas no CL medem em torno de 20-30 μm , elas não se multiplicam e produzem grandes quantidades de progesterona, não sendo responsivas à estimulação do LH (FARIN et al., 1986). Este grupo celular é responsável pela ocupação de cerca de 70% da área total do corpo lúteo, secretando mais de 85% da progesterona produzida por ele. A progesterona também aparenta ter ação luteotrópica estimulando a síntese de receptores de LH no CL (JONES et al., 1992).

O papel regulador da progesterona tem sua devida importância por determinar o comprimento do ciclo estral e a manutenção da gestação, com ações fisiológicas em vários tecidos alvos (BERTAN, 2004).

Usualmente, a dosagem de progesterona não é usada como diagnóstico de gestação, muito embora saibamos que na gestação ela encontra-se em concentrações elevadas no organismo das fêmeas mamíferas, mas o custo do procedimento e a demora

em obter o resultado, deixa este parâmetro obsoleto quando comparado com o diagnóstico por ultrassonografia, por exemplo.

2.4 Indução da ovulação em éguas

2.4.1 Histórico

O indutor de ovulação mais utilizado, em éguas, é a gonadotrofina coriônica humana (hCG). Porém, seu uso frequente vem sendo associado à produção de anticorpos que reduzem sua eficiência em induzir a ovulação nesta espécie (LEY, 2006). Assim, algumas alternativas vêm sendo desenvolvidas para esta função, dentre elas o extrato de pituitária equina, que é um preparado parcial de gonadotrofina equina (ALVARENGA et al., 2005), o eFSH (hormônio folículo estimulante equino purificado), que é um FSH parcialmente purificado de hipófise equina (ALVARENGA et al., 2003) e o acetato de deslorelina, que é um agonista do GnRH (HEMBERG et al., 2006). De certo modo, todas estas alternativas de indução para a ovulação em éguas, apresentam eficiência semelhante a do hCG, variando basicamente no intervalo de ação (McCUE et al., 2004).

2.4.2 Deslorelina

A deslorelina já é difundida na atividade reprodutiva veterinária trata-se de um agonista do GnRH, que tem como ação provocar o aumento nas concentrações de LH e induzir a ovulação em éguas cíclicas (MUMFORD et al., 1995) e em período transicional (McKINNON et al., 1997). Sua primeira apresentação comercial foi na forma de implantes subcutâneos como Suprelorin® e o Ovuplant®, sendo o segundo, que foi registrado para uso nos EUA e na Austrália, o mais conhecido (MUMFORD et al., 1995). Este implante atua liberando 2,2 mg a cada dois a três dias e tem demonstrado ser eficiente em aumentar as concentrações de LH e induzir a ovulação em éguas cíclicas com folículos a partir de 35mm (SQUIRES et al., 1994). As principais vantagens deste tipo de implante é a facilidade em seu uso, sua biocompatibilidade e o baixo custo (FRARES, 2010). Como desvantagem, foi observado que o tratamento a longo prazo com deslorelina (5 mg), administrada através de um implante subcutâneo, suprime o crescimento do folículo em vacas leiteiras (SILVESTRE et al., 2009) e, quando aplicado uma ou duas vezes durante 6 semanas, leva a um aumento significativo

na proporção de vacas que apresentaram ciclos estrais anormais (PADULA e MACMILLAN, 2005). No entanto, em éguas, o implante tem sido utilizado com boa resposta na indução da ovulação quando há, pelo menos, um folículo com diâmetro a partir de 35mm (McKINNON et al., 1993).

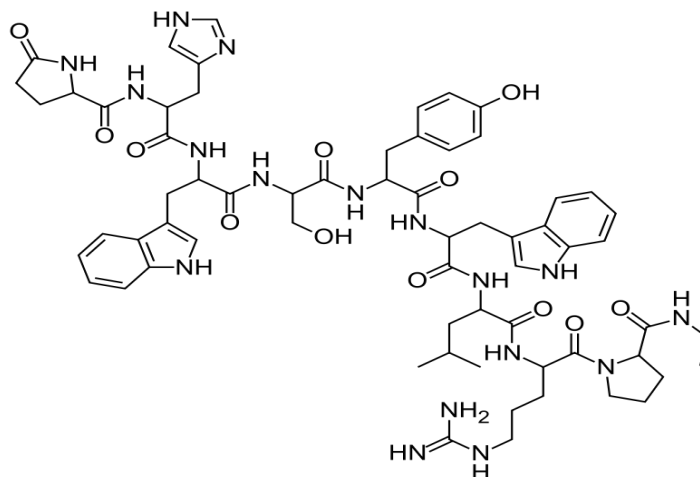


Figura 1 – Fórmula química do acetato de deslorelina. Fonte: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ADeslorelin.svg>. Por Alison (Own work) [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)].

O acetato de deslorelina é um peptídeo sintético DTrp6-Pro9-des-Gly10 (Fig. 1) análogo do GnRH, com duas substituições de aminoácidos (KUTZLER, 2007). A deslorelina vem sendo usado com diferentes intuitos na medicina veterinária, seu uso é bastante abrangente e engloba desde método contraceptivo reversível em felinos domésticos (ACKERMANN, 2012), na prevenção da atividade cíclica em cães (TRIGG et al., 2006), na supressão do crescimento do folículo em vacas leiteiras (SILVESTRE et al., 2009), no tratamento do anestro sazonal em ovelhas (SCHNEIDER e REHBOCK, 2003) e, principalmente, como indutor de ovulação de éguas em estro (SQUIRES et al., 1994).

A substituição do uso dos implantes subcutâneos por aplicações intramusculares deu fim a um dos principais problemas relacionados ao uso dos implantes que é a necessidade de retirada dos mesmos, depois de confirmada a ovulação. A permanência do implante resultava em supressão do crescimento folicular e maior intervalo interestrual em éguas que falharam na concepção, um atraso que pode variar de três até mais de 30 dias (McCUE et al., 2002).

Por ser um peptídeo não imunogênico, a deslorelina pode ser utilizada em estros consecutivos em um mesmo indivíduo, sem que ocorra a formação de anticorpos observada em compostos como o hCG (WILHELM et al., 1994). Seu mecanismo de ação se dá por estímulo nas células da hipófise anterior para sintetizar e liberar LH, este por sua vez, se liga a seus receptores específicos e induz a maturação folicular e a ovulação (McCUE et al, 2004).

Vários estudos indicam a eficiência da deslorelina em induzir a ovulação em éguas, e vêm sendo demonstrado que o tempo médio da aplicação à ovulação variou de 41 a 46 horas (MUMFORD et al., 1995. LINDHOLM et al., 2010).

2.5 Ultrassonografia Doppler

2.5.1 Histórico e princípio

A ultrassonografia Doppler é um método que vem ganhando espaço recentemente na Medicina Veterinária. A ferramenta Doppler, associada à ultrassonografia convencional, fornece informações em tempo real sobre a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos em diversos órgãos (CARVALHO et al, 2008). A técnica foi descrita, em 1842, por Christian Johann Doppler, que explicou seu efeito a partir de uma fonte emissora de ondas (sonoras ou eletromagnéticas), que estando em movimento em relação a um receptor, vai alterar a frequência de onda durante este processo, aumentando assim a frequência durante a aproximação da fonte e diminuindo com o seu distanciamento (KAWAKAMA et al., 1993). Assim, gera uma diferença entre a frequência do som transmitido e o refletido que, quando usado em vasos sanguíneos, onde as hemácias atuam como corpos refletivos, resulta no deslocamento de frequência Doppler (SZATMARI et al., 2001). Portanto, se o sentido do fluxo sanguíneo for em direção do transdutor, a frequência Doppler será positiva, se for no sentido contrário ao transdutor, será negativa (CERRI et al., 1998).

Fatores como o ângulo de incidência do feixe e o calibre e tamanho do vaso, influenciam na determinação da velocidade do fluxo sanguíneo assim, é importante determinar o ângulo e a posição adequada do transdutor no momento do exame (MURTA et al, 2002).

Esta técnica vem se mostrando uma ferramenta muito eficiente na avaliação do fluxo sanguíneo, de forma não invasiva e indireta, existindo, atualmente, quatro diferentes métodos: o Doppler contínuo, o pulsátil, o Doppler colorido e, mais recentemente, o "power" Doppler. (MURTA et al, 2002).

O Doppler contínuo permite a auscultação de batimentos cardíacos fetais e fluxo em vasos periférico (SATOMURA, 1956). O Doppler pulsátil dispõe de apenas um cristal, que emite o ultra-som em pulsos, e no intervalo dessa emissão recebe o eco, ou seja, o som refletido. Com a evolução da técnica, passou-se a utilizar os cristais vibráteis, que, acoplado a uma unidade Doppler, proporcionou o surgimento do modo "color" (colorido) (PERONNEAU e LEGER, 1969, citado por MATIAS, 2000). O "power" Doppler, corresponde ao processamento do sinal Doppler emitido pelo fluxo em movimento com a vantagem de ser ângulo independente, permitindo a detecção de vasos de menor calibre, no entanto, é mais sensível, gerando mais ruído (RUBIN et al., 1994).

2.5.2 Utilização na reprodução equina

A aplicabilidade do uso da ultrassonografia Doppler na reprodução equina é bastante vasta, este método vem sendo utilizado para detecção de prenhez, para diferenciação de cistos, gestação com avaliação da circulação embrionária (BOLLWEIN et al., 2003), como auxílio na escolha de receptoras cíclicas (IGNÁCIO, 2013), para avaliar o padrão de vascularização de folículos (ACOSTA et al., 2004), em folículos pré-ovulatórios (GASTAL et al., 2007), para avaliação da vascularização do útero e do CL (ALONSO, 2013) e para diagnóstico auxiliar de endometrites bacterianas (PEREIRA et al., 2014).

Esta ferramenta permitiu elucidar pontos que a ultrassonografia convencional não deixava claro (GINTHER et al, 2007) com isso vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos no intuito de que este equipamento possa cada vez mais dar suporte e auxiliar nas biotécnicas de reprodução assistida, bem como, a detecção e diagnóstico de problemas envolvendo o trato reprodutivo das éguas.

2.5.3 Doppler em corpo lúteo de éguas

A ultrassonografia convencional (modo-B) permite, através dos recursos de medida, a avaliação do tamanho do CL com bastante segurança (KASTELIC et al., 1990). Apesar de existir relação entre a concentração de progesterona e a massa e o volume do CL, não está claro que o tamanho de CL sirva como um parâmetro seguro para avaliar a produção de progesterona (VERONESI et al., 2002). Com o advento da ultrassonografia Doppler, surgiu o questionamento quanto à relação entre o padrão de vascularização e a produção de progesterona, com isto estudos vêm sendo realizados com esta finalidade, isso somado ao fato de se tratar de um exame não-invasivo que possibilita a avaliação da função vascular no CL, já que os níveis de P₄ aparentemente dependem do fluxo sanguíneo do mesmo (ARÊAS, 2012).

2.6 Receptores do Hormônio Luteinizante (LHR)

Em várias espécies mamíferas incluindo suínos, bovinos e humanos, sítios de receptores para hormônio luteinizante (LHR) vêm sendo demonstrados e em todas as espécies estudadas sua expressão está ligada, diretamente, à fase do ciclo estral (SHEMESH, 2001). O FSH tem papel estimulatório sobre as células da granulosa e entre suas ações está a promoção da expressão de receptores do LH na superfície destas células. O LH tem receptores nas duas camadas celulares, a teca e a granulosa, e no CL com funções distintas em cada uma delas (ROSA e SILVA, 2006). As células murais apresentam um número progressivamente maior de receptores para o LH ao longo do desenvolvimento folicular, a expressão destes receptores e a produção de fluido folicular para preencher o antro ocorrem em resposta à ação do FSH. Com o crescimento e desenvolvimento dos folículos, os receptores de LH vão sendo expressos na superfície das células murais dos folículos com capacidade para dominância, e a seleção do folículo dominante aparenta está relacionado com a expressão destes receptores na superfície das células da granulosa (WEBB et al., 2003), enquanto isso, o oócito segue seu processo de desenvolvimento até a ovulação. Os folículos que entram

em atresia, não expressam receptores para o LH nas células da granulosa com isso, os baixos níveis de FSH não são suficientes para seu completo desenvolvimento (ZELEZNIK, 2004). Segundo Rosa e Silva (2006), a capacidade de produção hormonal do corpo lúteo está relacionada à expressão de receptores para o LH desenvolvida ao longo da fase folicular, conseqüente à ação do FSH, por isso uma fase folicular ruim produz uma fase lútea ruim.

As células do folículo possuem mRNA que traduzem o LHR em fases distintas do desenvolvimento folicular (BERISHA et al., 2000) e também estimulam o aumento do número de receptores para LH nas células da granulosa. A seleção do folículo dominante está associada à queda nas concentrações de FSH sanguíneo, pois o folículo dominante não precisa de altos níveis de FSH para evitar a regressão folicular devido aos receptores de LH das células da granulosa. Assim, os folículos dependentes de gonadotrofinas entram em atresia (BERISHA et al., 2000). Evans et al. (2004), utilizando PCR quantitativo (tempo real), verificaram maior expressão gênica do LHR em células da granulosa de folículos dominantes quando comparados aos subordinados. Ereno (2008) verificou 50% (2/4) e 63,6% (7/11) de expressão de LHR em células da granulosa de folículos dominantes de novilhas coletados nos dias 2,5 e 3 após a ovulação, respectivamente, reforçando a ideia que os receptores de LH são característicos de folículos dominantes e assim, justificar a sua presença em CLs.

Além dos folículos e CLs, em um estudo realizado no trato reprodutor de éguas, foram observados receptores para LH no oviduto, útero e cérvix (ESMERALDINO et al., 2010).

2.7 Fator de Crescimento Vascular Endotelial

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um dos principais fatores no processo da angiogênese (FOLKMAN, 1995). Segundo Ferrara et al. (1998), o VEGF é um mitogênico específico que atua nas células endoteliais estimulando a proliferação e a migração nestas células. Nos estudos realizados por Campos (2005), em células da placenta bovina cultivadas sob influência do VEGF, foi observado um aumento da produção de progesterona aos 210 dias de gestação, o que sugere que o VEGF também é capaz de estimular a produção de progesterona em células placentárias cultivadas.

Assim como o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o VEGF também pode ser encontrado nas células da teca, no fluido folicular, nas células da granulosa e nas células luteinizadas (PHILLIPS et al., 1990). Nas células da granulosa e da teca, a expressão do VEGF promove uma maior permeabilidade dos vasos sanguíneos um pouco antes da ovulação (KAMAT et al., 1995). A expressão luteínica do VEGF alcança seu ápice no início da fase luteínica e diminui drasticamente com o início da luteólise, assim, o VEGF é indispensável para a angiogênese luteínica (FERRARA et al., 1998).

A supressão do VEGF leva a inibição do desenvolvimento do CL e da liberação de progesterona, levando também a ocorrência de pontos de necrose e isquemia no tecido luteínico afetando diretamente a fertilidade (FRASER et al., 2000). A presença do VEGF já foi confirmada no CL de bovinos, tanto no ciclo estral como na prenhez e sua concentração foi significativamente mais alta na fase inicial e decresceu no final da fase luteolítica (BERISHA et al., 2000).

2.8 Fator de Crescimento Fibroblástico Básico

O fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), junto com o VEGF, possui um importante papel no processo de desenvolvimento e maturação dos folículos, na ovulação e na formação inicial do CL (SCHAMS e BERISHA, 2004). Salles e Araújo (2010), em seus estudos realizados em bovinos, demonstraram que a secreção de VEGF e bFGF é estimulada principalmente por ação do LH. O bFGF está relacionado com a proliferação e permeabilidade de capilares sanguíneos, os quais são fundamentais para o desenvolvimento e maturação folicular, bem como no processo da luteogênese (BERISHA et al., 2000).

Para um desenvolvimento e funcionamento normal do CL, é necessário que uma densa rede de capilares se forme, contribuindo de maneira parácrina e autócrina para a produção de progesterona (SCHAMS e BERISHA, 2002; NEEDLE et al., 2007). Daí a importância destes fatores angiogênicos atuarem no CL.

Como o bFGF é um dos principais responsáveis no auxílio da angiogênese do CL, em bovinos, a presença deste gene foi observada nas células vasculares em fase luteínica inicial, onde a expressão do mRNA é máxima, sendo encontrado em proporções mínimas na fase luteínica média (PRADO, 2004). Com isto, entende-se que sua expressão tende a diminuir quando não há embrião ou quando há falha no reconhecimento fetal, possibilitando a luteólise e o início de um novo ciclo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da indução da ovulação sobre o padrão de vascularização e função do corpo lúteo em éguas.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a vascularização do corpo lúteo utilizando a ultrassonografia Doppler entre os dias 4 e 12 após a ovulação.
- Avaliar a concentração de progesterona sérica em éguas induzidas a ovular com deslorelina.
- Avaliar a expressão de genes relacionados a angiogênese (VEGF e bFGF) e receptor de LH no corpo lúteo, no período de 4 a 12 dias após a ovulação induzida ou não por acetato de deslorelina.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, C.L. **Uso de acetato de deslorelina como contraceptivo em gatos domésticos**. 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2012.

ACOSTA, T.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. 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, 2004.

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.

ALONSO, M.A. **Efeito da aplicação de hCG em diferentes dias do ciclo estral sobre a concentração sérica de progesterona e fluxo sanguíneo uterino e ovariano em éguas**. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2013

ALVARENGA, M.A.; FARINASSO, A.; RUMPF, R. Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equino (EPE) para indução de ovulações múltiplas em éguas. **Acta Scientiae Veterinae**, v.33, supl. 1, p.135-138, 2005.

ALVARENGA, M.A.; MACHADO, M.S.; ARANTES, M.; PERES, K.R.; LEÃO, K.M.; OLIVEIRA, J.V.; ROSER, J.F. Avaliação da resposta superovulatória em éguas tratadas com FSH equino purificado. **Acta Scientiae Veterinae**, v.31, p.216, 2003.

ARÊAS, V.S. **Uso do doppler colorido para avaliação funcional do corpo lúteo em bovinos**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. 2012.

BERISHA, B.; SHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPANIER, R. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. **Journal of Endocrinology**, v.167, p.371-382, 2000.

BERTAN, C.M. **Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina F_{2α} no endométrio de fêmeas bovinas**. 2004. 185f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 597–605, 2003.

BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; WEBER, R.; STOLLA, R. Luteal blood flow during estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 57, p. 2043–2051, 2002.

CAMPOS, D.B. **Imunolocalização do VEGF, bFGF e seus receptores na placenta bovina e influência destes fatores sobre a produção de progesterona pelas células placentárias em cultura**. 2005. 193p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2005.

CARVALHO, C.F.; CHAMMASII, M.C.; CERRIII, G.G. Princípios físicos do Doppler em ultra-sonografia. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.872-879, 2008.

CERRI, G.G.; Mólnar, L.J.; Paranaguá-Vezozzo, D.C. Avaliação dúplex do fígado, sistema portal e vasos viscerais. In: _____. Doppler. São Paulo: Sarvier, 1998. cap.6, p.120-121.

DAVIS, J.S.; RUEDA, B.R. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p.1949-1978, 2002.

DIAZ, F.J.; ANDERSON, L.E.; WU, Y.L.; RABOT, A.; TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C. Regulation of progesterone and prostaglandin F2 α production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.191, p.65-68, 2002.

ERENO, R.L. **Expressão gênica do receptor do hormônio luteinizante (LHR), em células da granulosa de folículos de novilhas Nelore antes, durante e após a divergência folicular**. 2008. 65p. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

ESMERALDINO, A.T.; MALSCHITZKY, E.; FIALA, S.M.; SANTARÉM, L.; WOLF, C.A.; JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Immunohistochemical identification of luteinizing hormone receptors in the extra-gonadal reproductive tract of the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 38-39, 2010.

EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.L.H.; WINN, M.E.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; COUSSENS, P.M.; IRELAND, J.J. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1475-84, 2004.

FARIN, C.E.; MOELLER, C.L.; SAWYER, H.R.; GAMBONI, F.; NISWENDER, G.D. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.35, p.1299-1308, 1986.

FERRARA, N.; CHEN, H.; DAVIS-SMYTH, T.; GERBER, H-P.; NGUYEN, T-N.; PEERS, D.; CHISHOLM, V.; HILLAN, KJ.; SCHWALL, RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. **Nature Medicine**, v. 4, p. 336-340, 1998.

FERRIS, R.A.; HATZEL, J.N.; LINDHOLM, A.R.G.; SCOFIELD, D.B.; McCUE, P. Efficacy of deslorelin acetate (SucroMate) on induction of ovulation in American Quarter Horse mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 285-288, 2012.

FRARES, L.R. **Uso do acetato de deslorelina como indutor da ovulação na inseminação artificial em tempo fixo em búfalas durante a estação reprodutiva desfavorável.** 2010. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná. 2010.

FRASER, H.M.; DICKSON, S.E.; LUNN, S.F.; WULFF, C.; MORRIS, K.D.; CARROLL, V.; BICKNELL, R. Suppression of luteal angiogenesis in the primate by neutralization of vascular endothelial growth factor. **Endocrinology**, v. 141, p. 995–1000, 2000.

GASTAL, E.L. Recent advances and new concepts on follicle and endocrine dynamics during the equine periovulatory period. **Animal Reproduction Science**, v.6, p.144-158, 2009.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; DONADEU, F.X.; ACOSTA, T.J.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J., Temporal relationships among LH, estradiol, and follicle vascularization preceding the first compared with later ovulations during the year in mares. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.314–321, 2007.

GAYTÁN, 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 of Reproduction*, v. 60, p. 914- 919, 1999.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; UTT, M.D.; BEG, M.A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Animal Reproduction Science*, v. 99, p. 213–220, 2007.

GINTHER, O.J.; UTT, M.D.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 95, n. 144–150, 2006

GIOMETTI, I.N.; CASTILHO, A.C.S.; SÁ FILHO, O.G.; PAPA, P.C.; BURATINI JR, J. Controle local e endócrino do desenvolvimento e da regressão do corpo lúteo bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.1, p.34-52, 2009.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal.** 7a.ed. Barueri: Manole, 2004. 513p

HEMBERG, E.; LUNDEHEIM, N.; EINARSSON, S. Successful timing of ovulation using deslorelin (Ovuplant®) is labour-saving in mares aimed for single ai with frozen semen. **Reproduction in Domestic Animal**, v.41, p.535-537, 2006.

IGNÁCIO, F.S. **Avaliação funcional de estruturas luteais formadas após aspiração folicular em éguas.** 2013. 107p Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2013.

JONES, L.S.; OTTOBRE, J.S.; PATE, J.L. Progesterone regulation of luteinizing hormone receptors on cultured bovine luteal cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.85, p.33-39, 1992.

KAMAT, B.R.; BROWN, L.F.; MANSEAU, E.J.; SENGER, D.R.; DVORAK, H.F. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 157-165. 1995.

KASTELIC, J.P.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. **Theriogenology**, v.34, p.487-498, 1990.

KAWAKAMA, J. et al. Física. In: CERRI, G.G.; ROCHA, D.C. **Ultra-sonografia abdominal**. São Paulo: Sarvier, 1993. cap.1, p.1-14.

KUTZLER, M. A. Estrus induction and synchronization in canids and felids. **Theriogenology**, v. 68, p. 354-374, 2007.

LEY, W.B. **Reprodução em éguas para veterinários de equinos**. São Paulo:Roca, 2006. 205 p.

LIEBERMANN, J.; SCHAMS, D. Actions of somatotrophin on oxytocin and progesterone release from the microdialysed bovine corpus luteum in vitro. **Journal of Endocrinology**, v.143, p.243-250, 1994.

LINDHOLM, A.R.; BLOEMEN, E.H.; BROOKS, R.M.; FERRIS, R.A.; McCUE, P.M. Comparison of deslorelin and buserelin in mares: LH response and induction of ovulation. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 68-70, 2010.

LUCY, M.C.; COLLIER, R.J.; KITCHELL, M.L.; DIBNER, J.J.; HAUSER, S.D.; KRIVI, G.G. Immunohistochemical and nucleic acid analyses of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1219-1227, 1993.

MATIAS, A. **Retorno venoso na avaliação da função cardíaca fetal**. 2000. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2000.

McCUE, P. M.; FARQUHAR, V. J.; CARNEVALE, E. M.; SQUIRES, E.L. Removal of deslorelin (Ovuplant®) implant 48h after administration results in normal interovulatory intervals in mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 865-870, 2002.

McCUE, P.; HUDSON, J.J.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. In: 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. 2004. Denver, CO. Proceedings. 2004. p. 510-513.

McKINNON, A.O.; NOBELLIIUS, A. M.; TARRIDA, D.E.L.; MARMO, L. FIGUEROA, S.; SKIDMORE, J.; VASEY, J.R.; TRIGG, T.E. Predictable ovulation in mares treated with an implant of the GnRH analogue deslorelin. **Equine Veterinary Journal**, v.25, p.321-323, 1993.

McKINNON, A.O.; VASEY, J.R.; LESCUN, T.B.; TRIGG, T.E. Repeated use of a GnRH analogue deslorelin (Ovuplant) for hastening ovulation in the transitional mare. **Equine Veterinary Journal**, v.29, p.153-155, 1997.

MILVAE, R.A.; HINCKLEY, S.T.; CARLSON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 45, n. 7, p.1327-49, 1996.

MOURA, C.E.B. **Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em búfalos**. 2003. 123f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.

MUMFORD, E.L.; SQUIRES, E.L.; JÖCHLE, E.; HARRISON, L.A.; NETT, T.M.; TRIGG, T.E. Use of deslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares during three consecutive estrous cycles. **Animal Reproduction Science**, n. 39, p. 129-140, 1995.

MURTA, C.G.V.; BATISTUTA, P.N.; CUNHA FILHO, J.S. Dopplerfluxometria no estudo da circulação fetal: revisão do aspecto segurança. **Radiologia Brasileira**, v 35, n.6, p. 365-370, 2002.

NEEDLE, E.; PIPARO, K.; COLE, D.; WORRALL, C.; WHITEHEAD, I.; MARON, G.; GOLDSMITH, L.T. Protein kinase A independent cAMP stimulation of progesterone in luteal cell model is tyrosine kinase dependent but phosphatidylinositol-3-kinase and mitogen-activated protein kinase independent. **Biology of Reproduction**, v.77, p.147-155, 2007.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYSON, M.K.; MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v.80, p.1-28, 2000.

OKUDA, K.; UENOYAMA, Y.; NAITO, C.; SAKABE, Y.; KAWATE, N. Luteinizing hormone receptor in the bovine corpus luteum during the oestrous cycle and pregnancy. **Reproduction Fertility and Development**, v.11, p.147-151, 1999

PADULA, A.M.; MACMILLAN, K.L. Observations on the reproductive effects of once or twice weekly injections for 6 weeks of the GnRH agonist deslorelin in the cow. **Animal Reproduction Science**, n.85, p.223-230, 2005

PEREIRA, R.R.; SILVA, E.S.M.; IGNÁCIO, F.S.; LACERDA, T.F.; MEIRA, C.; COELHO, C.S. Utilização de ultrassonografia modo doppler como diagnóstico complementar da endometrite em éguas: relato de caso. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, v. XII, n. 23, p. 1-14, 2014.

PHILLIPS, H.S.; HAINS, J.; LEUNG D.W.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. **Endocrinology**, v.127, n. 2, p.965-967, 1990.

PRADO, C. **Imunolocalização do bFGF em corpo lúteo de búfalas em diferentes estágios do ciclo estral**. 2004. 88f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2004.

REYNOLDS, L.P.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; KILLILEA, S.D.; REDMER, D.A. Mitogenic factors of corpora lutea. **Progress in Growth Factor Research**, v.5, p.159-175, 1994.

ROSA E SILVA, A.C.J.S.; ROSA E SILVA, J.C.; GOMES, M.K.O.; REIS, R.M.; FERRIANI, R.A.; SÁ, M.F.S. Aspectos fisiológicos do LH na foliculogênese. **Femina**, v. 34, n 7, p. 469 – 476, 2006.

RUBIN, J.M.; BUDE, R.O.; CARSON, P.L.; BREE, R.L.; ADLER, R.S. Power Doppler US: a potentially useful alternative to mean frequency-based color Doppler US. **Radiology**, v. 190, p. 853-856, 1994;

SALLES, M.G.F.; ARAÚJO, A.A. Corpo lúteo cíclico e gestacional. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.3, p.185-194, 2010.

SANTOS, E. M.; ALMEIDA, F. Q.; VIEIRA, A. A.; PINTO, L. F. B.; CORASSA, A.; PIMENTEL, R. R. M.; SILVA, V. P.; GALZERANO, L. Lactação em Éguas da Raça Mangalarga Marchador: Produção e Composição do Leite e Ganho de Peso dos Potros Lactentes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.627-634, 2005.

SATOMURA, S. A study on examining the heart with ultrasonics. I. Principles; II. Instruments. **Japanese Circulation Journal**, v. 20, p. 227-30., 1956.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle - an overview. **Reproduction of Domestic Animals**, v.39, n.1, p.241-251, 2004.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.53-65, 2002.

SCHNEIDER, F.; REHBOCK, F. Induction of fertile cycles in the Blackhead sheep during the anoestrus period. **Archives Animal Breeding**, n.46, p.47-61, 2003.

SHEMESH, M. Actions of gonadotrophins on the uterus. **Reproduction**, v. 121, p. 835-842, 2001.

SILVA, E.S.M.; PUOLI FILHO, J.N.P.; MEIRA, C. Aspectos relacionados à formação, função e regressão dos corpos lúteos suplementares em éguas. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 3, p. 283-293. 2012

SILVESTRE, F.T.; KAMIMURA, S.; ARTECHE, A.C.; BARTOLOME, J.; PANCARCI, S.M.; THATCHER, W.W. Reproductive responses following postpartum suppression of ovarian follicular development with a deslorelin implant during summer heat stress in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.111, p.320-337, 2009.

SMITH, M.F.; MCINTUSH, E.V.; RICKE, W.A.; KOJIMA, F.N.; SMITH, G.W. Regulation of ovarian extracellular matrix remodelling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: effects on follicular development, ovulation and luteal function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p.367-381, 1999.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus : insights from domestic animals. *Biology of Reproduction*, v.71, p.2-10, 2004.

SQUIRES, E.L.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; JASKO, D. J.; KEEFE, T. J.; MEYERS, S. A.; FIGUEIREDO, E.; McCUE, P. M.; JÖCHLE, W. Effect of dose of GnRH analog on ovulation in mares. **Theriogenology**, v.41, p.757-769, 1994.

SUZUKI, T.; SASANO, H.; TAKAYA, R., FUKAYA, T., YAJIMA, A., NAGURA, H: Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. **Human Reproduction**, v.13, p.953-959, 1998

SZATMARI, V.; SÓTONYI, P.; VÖRÖS, K. Normal duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a review. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v.42, n.2, p.93-107, 2001.

TAMANINI, C.; DE AMBROGI, M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, p.206-216, 2004.

TRIGG, T.E.; DOYLE, A.G.; WALSH, J.D.; SWANGCHAN-UTHAI, T. A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction **Theriogenology**, n.66, p.1507–1512, 2006.

VERONESI, M.C.; GABAI, G.; BATTOCCHIO, M.; MOLLO, A.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Ultrasonographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows. **Theriogenology**, v.58, p.61-68, 2002.

XAVIER, P.R. **Características morfológicas do corpo lúteo de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) nos terços inicial, médio e final da gestação**. 2011. 55 p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. 2011.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; GUTIERREZ, C.G.; GARVERICK, H.A.; ARMSTRONG, D.J. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction (Cambridge) Supplement**, v. 61, p. 71-90, 2003.

WEBB, R.; WOAD, K.J.; ARMSTRONG, D.J. Corpus luteum function: local control mechanisms. **Domestic Animals Endocrinology**, v.23, p.277-285, 2002.

WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L.; TRIGG, T.E.; JOECHLE, W. Repeated use of deslorelin STI for acceleration of ovulation in mares without loss of effectiveness. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 29, p. 247, 1994.

YAN, Z.; NEULEN, J.; RACZEK, S.; WEICH H.A.; KECK, C.; GRUNWALD, K.; BRECKWOLDT, M. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/ vascular permeability factor (VPF) production by luteinized human granulosa cells in vitro; a paracrine signal in corpus luteum formation. **Gynecological Endocrinology**, v.3, p.149-153, 1998.

ZELEZNIK, A.J. The physiology of follicle selection. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 31-37, 2004.

CAPÍTULO 1

5 CAPÍTULO 1¹

Avaliação por ultrassonografia Doppler de corpos lúteos em éguas com ovulação induzida

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

V.N. Maia¹, A.M. Batista², S. Cunha Neto³, D.M.F. Silva⁴, A. Wischral^{2*}

¹Doutorando - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical – UFRPE, Recife, PE

²Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE, Recife, PE

³Graduando em Medicina Veterinária – UNINASSAU, Recife, PE

⁴Doutorando - Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária – UFRPE, Recife, PE

* Autor para correspondência (*corresponding author*) - E-mail: aurea@dmv.ufrpe.br

RESUMO

Consideráveis esforços têm sido feitos para melhorar a aplicação das técnicas de reprodução assistida na espécie equina, no entanto ainda são escassos os estudos sobre vascularização do corpo lúteo (CL) e sua relação com a progesterona em éguas com ovulação induzida com acetato de deslorelina. Foram utilizadas éguas (n=5) com ovulação natural (GC) e induzida (GT) com acetato de deslorelina (folículos 35 mm). Os CLs foram analisados, nos dias 4, 8 e 12 após a ovulação, quanto a sua vascularização, usando ultrassonografia Doppler com transdutor de 6,5 MHz, e gravação das imagens em vídeo. A análise dos vídeos considerou o percentual de área do parênquima luteal que estava apresentando sinais coloridos. A concentração de progesterona foi analisada por enzima-imunoensaio, nos mesmos dias das avaliações dos CLs. Os resultados foram apresentados em média \pm erro padrão da média. As médias de vascularização foram no GC: $76,25 \pm 8,98$; $70,00 \pm 8,16$ e $57,50 \pm 13,31\%$ e no GT: $85,00 \pm 5,40$; $90,00 \pm 0,00$ e $58,75 \pm 9,24\%$, respectivamente para os dias 4, 8 e 12 após a ovulação. As concentrações de progesterona foram no GC: $6,21 \pm 0,61$; $5,82 \pm 1,44$ e $4,63 \pm 0,79$ ng/mL e no GT: $6,10 \pm 1,18$; $4,67 \pm 1,06$ e $4,49 \pm 1,37$ ng/mL respectivamente para os dias 4, 8 e 12 após a ovulação. Os percentuais de vascularização apresentaram valores superiores nos dias 4 e 8 comparados ao D12 do

¹ Artigo formatado de acordo com as normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

GT ($P < 0,05$), não havendo diferença nos dias do GC, nem entre os grupos a cada momento estudado. As concentrações de progesterona não apresentaram diferenças significativas entre grupos ou momentos estudados. Conclui-se que a indução de ovulação com a deslorelina, foi eficiente para a indução de ovulação em éguas e que não alterou as respostas fisiológicas do corpo lúteo no que diz respeito a produção de progesterona, mas afetou a vascularização do parênquima luteal.

Palavras chave: Desrorelina, progesterona, equino, vascularização

ABSTRACT

Considerable efforts have been made to improve the application of assisted reproduction techniques in equine species, however there are still few studies in vascularization of the corpus luteum (CL) and its relation to progesterone in mares induced with deslorelin acetate. Mares with natural ovulation (GC) and induced with deslorelin acetate (follicles ≥ 35 mm) (GT) were used. The CLs vascularization was analyzed using Doppler ultrasonography (6.5 MHz) on days 4, 8 and 12 days after ovulation and images were recorded in video. The analysis of the videos was in the percentage of luteal parenchymal area with color signals. The concentration of progesterone was analyzed by ELISA, in the same time points. The results were presented as mean percentage of vascularization and progesterone concentration (ng/mL). The average vascularization was in GC: 76.25 ± 8.98 ; 70.00 ± 8.16 and 57.50 ± 13.31 % and in GT: $85.00 \pm 5,40$, $90.00 \pm 0,00$ and 58.75 ± 9.24 % respectively for the days 4, 8 and 12 after ovulation. Progesterone concentrations were in GC: 6.21 ± 0.61 ; 5.82 ± 1.44 and 4.63 ± 0.79 ng/mL and GT: 6.10 ± 1.18 ; 4.67 ± 1.06 and 4.49 ± 1.37 ng/ml, respectively for the days 4, 8 and 12 after ovulation. The patterns of vascularization were higher in D4 and D8 compared to D12 of GT ($P < 0.05$). However, there were no differences between groups or days in GC. The concentration of progesterone didn't show significant differences between groups or studied days. It was concluded that ovulation induction with deslorelin acetate, were effective for the induction of ovulation in mares which does not alter the physiological responses of the corpus luteum in respect of its progesterone production, however affected luteal parenchyma vasculature.

Key words: Deslorelin, progesterone, equine, blood flow

INTRODUÇÃO

Uma vez que a utilização comercial da Inseminação Artificial (IA) e da Transferência de Embriões (TE), tem se tornado cada vez mais comum na reprodução de equinos, consideráveis esforços têm sido feitos para otimizar o manejo reprodutivo e melhorar a aplicação das técnicas de reprodução assistida nesta espécie (Gastal *et al.*, 2009).

Por ter como uma de suas principais características reprodutivas um cio longo, a capacidade de induzir a ovulação, de forma confiável, é de fundamental importância para a reprodução assistida em éguas (Ferris *et al.*, 2012). Assim, o acetato de deslorelina tem sido utilizado como indutor de ovulação para essas fêmeas, tendo em vista que o uso frequente da gonadotrofina coriônica humana (hCG) vem sendo associado à produção de anticorpos, reduzindo assim sua eficiência em induzir a ovulação em éguas com exposições contínuas a este protocolo (Ley, 2006). Por outro lado, o mecanismo de ação do acetato de deslorelina se dá através do estímulo das células da hipófise para sintetizar e liberar o LH, que vai se ligar aos receptores específicos no ovário e induzir a maturação folicular e a ovulação (McCue *et al.*, 2004).

A manutenção da gestação nas espécies domésticas se dá pela síntese de progesterona (P_4); nas éguas este hormônio tem origem inicialmente nos ovários, sendo secretada pelo corpo lúteo (CL) (Silva *et al.*, 2012), mas também é produzida pela placenta e pelas glândulas adrenais (Hafez e Hafez, 2004). Além da manutenção da gestação, a progesterona também prepara o endométrio para a implantação do embrião e atua sinergicamente com os estrógenos na indução do comportamento de cio (Hafez e Hafez, 2004).

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

Com a evolução tecnológica, o uso da ultrassonografia colorida Doppler vem crescendo cada vez mais e elucidando questões que a ultrassonografia convencional não

nos permite responder. A técnica é efetiva, prática, não invasiva e permite, em tempo real, uma avaliação da perfusão vascular do trato reprodutivo de éguas, principalmente ovários e suas estruturas (Palmer *et al.*, 2006; Ginther *et al.*, 2006), dando a possibilidade de uma avaliação mais precisa e consequente aumento nos índices de sucesso reprodutivo.

A relação entre fluxo de sangue luteal e produção de P₄ durante o ciclo estral, em éguas, foi demonstrada por Ginther *et al.* (2007) e Bollwein *et al.* (2002b). Ambos os estudos, de forma idêntica, mencionaram que a vascularização do CL reflete de forma confiável os níveis de P₄. Assim, o padrão de vascularização do CL, obtido pela ultrassonografia Doppler, pode ser uma ferramenta de avaliação e/ou escolha de receptoras em programas comerciais de transferência de embriões em éguas.

Neste trabalho objetivou-se avaliar, por ultrassonografia Doppler, a vascularização do CL de éguas, após ovulação espontânea ou induzida com acetato de deslorelina, e comparar com as concentrações séricas de progesterona (P₄).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre os meses de janeiro e abril de 2014, no haras Massaroca, localizado em Camaragibe, Pernambuco (08°01'18" S e 34°58'52" O). Foram utilizadas éguas (n = 5), sem raça definida, ciclando regularmente, com idade variando entre 3 e 14 anos, e peso entre 380-450 kg. As éguas foram mantidas a pasto em piquetes abertos, recebendo 2 Kg/dia de concentrado comercial para éguas em reprodução, além de água e sal mineral *ad libitum*. Antes do início do experimento, os animais foram submetidos a avaliação clínica-ginecológica, além de vermifugação. O experimento foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob licença nº 063/2014/CEUA.

As éguas foram expostas diariamente a um rufião para determinar o início da apresentação dos sinais externos de estro. A partir do primeiro sinal indicativo de cio, foram realizados exames ultrassonográficos diários, pela via retal. A partir da detecção de, pelo menos, um folículo ≥ 35 mm durante o estro, as éguas receberam 750 μ g de acetato de deslorelina por via intramuscular (Grupo GT) ou foram submetidas ao acompanhamento da dinâmica ovariana até a ovulação espontânea (Grupo GC). O

experimento foi realizado com cada égua sendo utilizada duas vezes, uma em cada grupo.

Tendo como base o dia da ovulação (D0), exames ultrassonográficos color-Doppler do CL foram realizados nos dias 4, 8 e 12 após a ovulação. Para o exame, foi utilizado um aparelho de ultrassom (M5-VET; Mindray, China) equipado com transdutor linear de 6,5 MHz. O modo color-Doppler foi utilizado para obter os sinais de fluxo sanguíneo nos vasos do CL. Após a identificação, o CL foi escaneado lentamente em toda a sua extensão, obtendo-se a gravação do exame para análise posterior (Ginther *et al.*, 2007).

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

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

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

$P > 0,05$ e $P \leq 0,1$ indicaram que a diferença se aproximou da significância (tendência). Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de progesterona sérica (P_4) variaram de $4,49 \pm 1,37$ (GT-D12) a $6,21 \pm 0,61$ (GC – D4), não diferiram ($P > 0,05$) significativamente entre os grupos GC e GT nos dias 4, 8 e 12 após a ovulação (Fig. 1). A concentração de progesterona (P_4) obtida nos grupos GC e GT não apresentaram diferença significativa entre os dias 4, 8 e 12 após a ovulação Fig. 1.

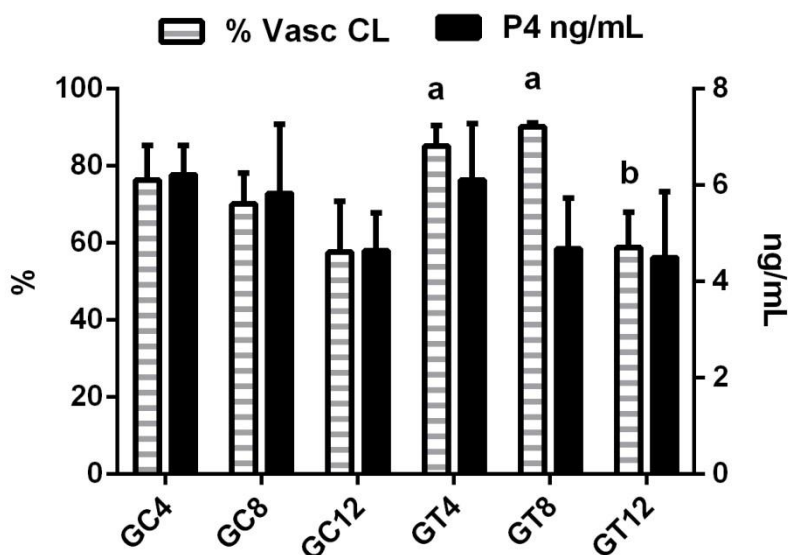


Figura 1. Média e erro padrão da média do percentual de vascularização do corpo lúteo (% Vasc. CL) e dosagem de progesterona sérica (P_4 ng/mL) conforme o tipo de ovulação e dia de avaliação após a ovulação. GC = ovulação natural. GT = ovulação induzida. Dias 4, 8 e 12 após a ovulação (dia zero). ab = letras diferentes entre colunas do mesmo grupo significa diferença estatística ($P < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Estes resultados, encontrados durante a fase luteal, está de acordo com resultados reportados previamente (Troedsson *et al.*, 1993; LeBlanc *et al.*, 2003;

Urquieta *et al.*, 2009). Tem sido demonstrado que as concentrações de progesterona aumentam gradativamente após a ovulação, atingindo 1,5 a 2,5 ng/mL dentro de 24h e 2,5 a 5,0 ng/mL em 48h após a ovulação, com pico (8 a 20 ng/mL) entre os dias 5 e 8 pós-ovulação, mantendo-se alto até o início da luteólise, ao redor dos dias 14 e 15 (LeBlanc *et al.*, 2003). Contudo, como demonstrado no presente estudo, as concentrações de progesterona sérica não apresentaram variações significativas entre os dias 4 e 12, após a ovulação corroborando os achados de Slough *et al.* (2011).

Kino *et al.*, reportaram que a administração intramuscular de acetato de deslorelina durante a fase luteal, promove aumento nas concentrações de LH e de progesterona em torno de 4 e 8 h após o tratamento, respectivamente, sugerindo ação luteotrófica da deslorelina por estimular secreção de LH. Estes autores afirmaram ainda que a dose de deslorelina (750 µg) foi incapaz de induzir ovulação ou formação de corpo lúteo secundário na fase luteal.

Em contraste, nossos resultados demonstraram que a administração de deslorelina foi capaz de induzir ovulação em todas as éguas tratadas. Além disso, as concentrações de progesterona nas éguas do grupo tratado apresentaram os mesmos níveis daqueles observado nas éguas do grupo controle. Estudos prévios demonstraram maior concentração de progesterona em éguas com dupla ovulação (Squires *et al.*, 1987; Nagy *et al.*, 2004). Entretanto, durante a realização deste estudo, nenhuma das éguas utilizadas apresentou dupla ovulação, garantindo a homogeneidade das amostras.

O percentual de vascularização mensurado nos CLs nos dias da avaliação (D4, D8 e D12) não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos (GC x GT). No entanto, foi possível observar uma redução do percentual de vascularização nos CLs do GT no dia 12 comparado aos dias 4 e 8 ($P < 0,05$) (Fig. 1 e 2).

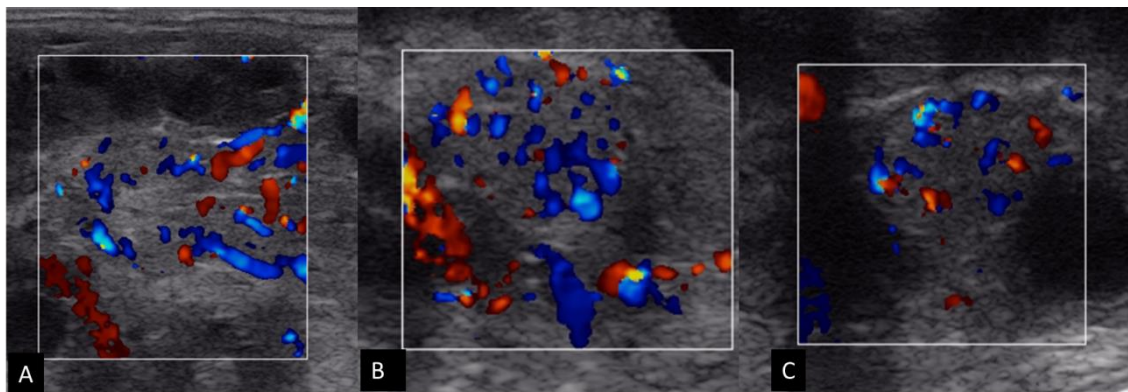


Figura 2. Imagens representativas da vascularização do corpo lúteo equino aos 4 (A), 8 (B) e 12 (C) dias após a ovulação, por ultrassonografia Doppler colorida.

A análise de correlação entre as variáveis P_4 e percentual de vascularização não apresentou resultado significativo ($r = -0,067$; $P = 0,09$). A ultrassonografia color Doppler tem sido considerada um método útil, não invasivo para avaliação do fluxo sanguíneo luteal (Bollwein *et al.*, 2002a). Além disso, foi relatado que as concentrações plasmáticas de progesterona e o fluxo sanguíneo ovariano foram positivamente correlacionado (Bolwein *et al.*, 2002a,b). No presente estudo, nenhuma correlação foi encontrada entre o padrão de vascularização e as concentrações de progesterona nos diferentes grupos, corroborando os relatos de Gomes (2008), que observou ausência de relação entre a concentração de progesterona e medidas luteais como diâmetro, área, volume e vascularização.

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas em relação ao padrão de vascularização dos CLs avaliados nos dias 4, 8 e 12 pós-ovulação natural. Entretanto, foi observado menor padrão de vascularização no D12 quando comparado aos dias 4 e 8 nas fêmeas do grupo tratado com deslorelina, sugerindo que a aplicação de deslorelina tenha efeito, ainda que mínimo, na vascularização do CL. Bollwein *et al.* (2002a) e Ginther *et al.* (2007) observaram máxima vascularização entre os dias 6 e 8 após a ovulação, estes achados reforçam os resultados deste estudo, onde não foi observada diferença entre os dias 4 e 8.

Estudos anteriores mostraram que os CLs apresentam um aumento na vascularização durante o período de sua formação (dias 0 a 8), quando a máxima vascularização foi atingida, momento em que também é observada a máxima

concentração de progesterona (Alonso, 2013). No presente trabalho, não observamos diferença significativa no mesmo período, provavelmente por que a estrutura vascular dos CLs analisados já estaria definida no dia 4 pós-ovulação, primeiro dia avaliado. Porém, a redução da vascularização no D12, observada no grupo tratado com acetato de deslorelina, difere dos relatos de Alonso (2013) que relatou decréscimo da vascularização do CL a partir do dia 13, assim como Ginther *et al.* (2007) que observaram uma queda lenta no período luteolítico (entre os dias 15 e 17 pós ovulação), ocorrendo em paralelo com a diminuição da concentração de progesterona.

Nas condições deste experimento, não é possível inferir que estes CLs sejam funcionais por menor tempo do que os resultantes da ovulação natural, principalmente por que não houve diferença na produção de progesterona ou nos padrões de vascularização observados entre os grupos no período estudado.

CONCLUSÕES

Tomando como base os resultados obtidos neste estudo podemos concluir que a indução de ovulação com acetato de deslorelina não altera as respostas fisiológicas do CL no que diz respeito a concentração sérica de progesterona; mas aumenta a vascularização no início da formação do CL. Além disso, não houve correlação entre padrão de vascularização luteal e concentrações de progesterona em éguas.

AGRADECIMENTOS

À Facepe pela concessão de bolsa de estudos para realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

ALONSO, M.A. *Efeito da aplicação de hCG em diferentes dias do ciclo estral sobre a concentração sérica de progesterona e fluxo sanguíneo uterino e ovariano em éguas*. 2013. 197f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; KOLBERG, B.; STOLLA, R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, v. 57, p. 2129–2138, 2002a.

BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; WEBER, R.; STOLLA, R. Luteal blood flow during estrous cycle in mares. *Theriogenology*, v. 65, p. 2043–2051, 2002b.

FERRIS, R.A.; HATZEL, J.N.; ALICIA, R.G. et al. Efficacy of deslorelin acetate (SucroMate) on induction of ovulation in American Quarter Horse mares. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 32, p. 285-288, 2012.

GASTAL, E.L. Recent advances and new concepts on follicle and endocrine dynamics during the equine periovulatory period. *Anim. Reprod. Sci.*, v.6, p.144-158, 2009.

GINTHER, O.J.; UTT, M.D.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 95, p. 144–150, 2006.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O. et al. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 99, p. 213–220, 2007.

GOMES, T.J.S. *Equine corpus luteum vascular evaluation by power-doppler ultrasound*. 2008. 66f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reprodução animal. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. 513p.

LeBLANC, S.J.; DIFFI ELD, T.F.; LESLIE, K.E. et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p.2223- 2236, 2003.

KINO, S.; OSAWA, T.; MIZUNO, S. et al. Effect of postbreeding intramuscular administration of deslorelin acetate on plasma LH and progesterone concentrations and conception rate in mares. *J. Equine Sci.*, v. 25, p. 23-27, 2014.

LEY, W.B. Reprodução em éguas para veterinários de equinos. São Paulo: Roca, 2006. 205p.

McCUE, P.; HUDSON, J.J.; BRUEMMER, J.E., SQUIRES, E.L. Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. In: 50TH ANNUAL CONVENTION OF

THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 2004, Denver. *Proceedings...* Colorado: 2004. p. 510–513.

NAGY, D.P.; HUZENICZA, G.; REICZIGEL, J. et al. Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares. *Theriogenology*, v. 61, p. 203-214, 2004.

PALMER, E.; CHAVATTE-PALMER, P.; VERDONCK, E. Field trial of Doppler ultrasonography of the preovulatory follicle in the mare. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 94, p. 182–185, 2006.

SILVA, E.S.M.; PUOLI FILHO, J.N.P.; MEIRA, C. et al. Aspectos relacionados à formação, função e regressão dos corpos lúteos suplementares em éguas. *Veterinária e Zootecnia*, v. 19, p. 283-293, 2012.

SLOUGH, T.L.; RISPOLI, L.A.; CARNEVALE, E.M. et al. Temporal gene expression in equine corpora lutea based on serial biopsies *in vivo*. *J. Anim. Sci.*, v. 89, p. 389–396, 2011.

SQUIRES, E.L.; MACKINNON, A.O.; CARNEVALE, E.M. et al. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. *J. Reprod. Fertil.*, v. 35, p. 399-403, 1987.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M. Multiple site electromyography recordings on uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. *J. Reprod. Fertil.*, v. 99, p. 307-312, 1993.

URQUIETA, B.; DURÁN, M.C.; COLOMA, I.; PARRAGUEZ, V.H. hCG-induced ovulation in Thoroughbred mares does not affect corpus luteum development and function during early pregnancy. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 44, p. 859-864, 2009.

CAPÍTULO 2

6 CAPÍTULO 2²

Expressão de fatores angiogênicos e LHR em corpos lúteos de éguas com ovulação espontânea e induzida por acetato de deslorelina

Victor N. Maia¹; André M. Batista¹; Sylvio Cunha Neto²; Diogo M.F. Silva³; Manoel Adrião³; Aurea Wischral¹

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dpto de Medicina Veterinária, Rua Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil, 52171-900.

² Haras Massaroca, Estrada de Aldeia, Km , Camaragibe, PE, Brasil

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dpto de Morfologia e Fisiologia Animal, Rua Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil, 52171-900.

Resumo

As consequências do uso do acetato de deslorelina como indutor da ovulação em éguas necessita ser melhor esclarecido a fim de aumentar os resultados da transferência de embriões equinos. A relação dos fatores angiogênicos e receptores de LH foi estudada em éguas com ovulação natural (GC) e induzida por acetato de deslorelina (GT) (foliculos ≥ 35 mm). Ultrassonografia transretal foi usada para acompanhar a ovulação e, nos dias 4, 8 e 12 após a ovulação (dia 0), foram obtidas amostras do CL através de biópsia guiada por ultrassom. A expressão do mRNA para os genes do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento do fibroblasto básico (bFGF) e receptor do hormônio luteinizante (LHR) foi avaliada por PCR em tempo real. Foi observada correlação positiva entre VEGF e LHR ($P < 0,00001$, $r = 0,78$). A expressão do LHR no D4 foi maior no GT do que no GC ($p < 0,05$). Também observou-se maior expressão nos D-4 e D-8 do que o D-12 do GT. A expressão do VEGF declinou no D12 comparado aos dias D4 e D8 do GT ($P = 0,06$). O bFGF foi expresso em todos os momentos dos dois grupos, porém sem diferença significativa. Conclui-se

² Artigo formatado de acordo com as normas da revista Theriogenology

que indução da ovulação com acetato de deslorelina em éguas, propiciou maior expressão de mRNA do gene dos receptores de LH, principalmente no quarto dia após a ovulação. Também a expressão do gene do VEGF foi influenciada pela indução da ovulação, tendo uma queda mais acentuada aos 12 dias após a ovulação, o que deve ser esperado em éguas não prenhes.

Palavras chave: indutor da ovulação, progesterona, equino, VEGF, bFGF

Abstract

The consequences of deslorelin acetate use as ovulation inducer needs be clarified in order to improve the results of equine embryo transfer. The relationship of angiogenic factors and LH receptor (LHR) was studied in mares with natural (GC) and induced ovulation with deslorelin acetate (GT) (follicles ≥ 35 mm). Transrectal ultrasonography was used to certify the ovulation day and on days 4, 8 and 12 after ovulation (day 0), corpus luteum (CL) samples were obtained through ultrasound guided biopsy. The mRNA expression for vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and LHR genes were analyzed by real time PCR. Was observed positive correlation between VEGF and LHR ($P < 0.00001$, $r = 0.78$), and it was possible to detect a higher mRNA expression for LHR in D4 of GT than GC ($p < 0.05$), moreover this expression was higher in D4 and D8 than D12 of the GT group. The VEGF expression decrease at D12 compared to D4 e D8 in GT ($P = 0,06$). bFGF was also expressed in luteal tissue in all days of both groups, however without statistical differences. In conclusion, deslorelin acetate was effective for induction of ovulation in mares, resulting in higher expression of LHR, especially in the fourth day after ovulation. Also VEGF expression was influenced by induced ovulation, with a lower level at D12, what must be expected in non-pregnant mares.

Key words: ovulation inducer, progesterone, equine, VEGF, bFGF

Introdução

As biotécnicas de reprodução assistida, sobretudo da transferência de embriões (T.E.) têm sido usadas com frequência no Brasil [1], onde, em 2013, foi relatada a coleta e transferência de 19.680 embriões equinos, seguido pela Argentina. Brasil e Argentina são os dois países que relatam as mais significantes atividades de TE equina [2].

Com o objetivo de melhorar os resultados em termos de prenhez positiva, os estudos sobre as éguas receptoras de embriões são muito importantes, incluindo a qualidade, vascularização do corpo lúteo (CL) e produção de progesterona. A qualidade e seleção das receptoras é o principal fator que pode ser manipulado para aumentar os índices de prenhez após a transferência de embriões [3].

O acetato de deslorelin, um agonista do GnRH, tem sido utilizado para acelerar e prever a ovulação de éguas, em 2 dias após o tratamento, sem suprimir o desenvolvimento da subsequente onda ovulatória [4]. A ovulação ocorre em consequência da secreção de LH da adenohipófise, induzida pelo agonista de GnRH, que atua no ovário através de receptores específicos, promovendo a maturação folicular e ovulação [5]. Embora este indutor da ovulação venha sendo rotineiramente utilizado para induzir a ovulação em éguas cíclicas [6] e em período transicional [7], não há estudos mais detalhados sobre a influência desta indução na formação e função do CL subsequente à ovulação.

O hormônio luteinizante (LH), é um dos principais hormônios envolvidos na formação do CL [8], sendo o número de receptores para LH no CL correlacionado com a produção de progesterona [9]. No entanto, a função do CL está relacionada com suprimento sanguíneo apropriado. A angiogênese é o processo no qual há a formação de

novos vasos sanguíneos pela proliferação e migração de células do endotélio de vasos remanescentes [10]. Este evento é indispensável para a formação e para a manutenção do CL, pois é a partir dele que ocorrerá uma adequada nutrição e, conseqüentemente desempenho de suas funções [11]. No CL, a vascularização está diretamente associada ao aumento do fluxo sanguíneo que vai aumentando de acordo com o crescimento do CL e a concentração plasmática de progesterona [12]. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento fibroblasto básico (bFGF) são alguns dos principais promotores da angiogênese [13, 14].

Com base no exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a expressão do mRNA para os fatores angiogênicos (VEGF e bFGF) e LHR em CL de éguas, após a ovulação induzida com acetato de deslorelina.

Material e Métodos

- Animais

Foram utilizadas éguas (n=5), sem raça definida, regularmente cíclicas, com idade compreendida entre 3 e 14 anos, pesando de 380 a 450 kg. Todas as éguas foram mantidas a pasto em piquetes abertos, recebendo 2 Kg/dia de concentrado comercial, água e sal mineral *ad libitum*. O período do experimento foi de janeiro e abril de 2014, no município de Camaragibe/PE. Foram realizados exames clínico-reprodutivos e vermifugação, antes do início do experimento, que foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob licença nº 063/2014/CEUA.

A rufiação das éguas foi realizada diariamente, utilizando um garanhão, para determinar o início do estro. Os exames ultrassonográficos iniciaram a partir do primeiro sinal externo de cio e foram realizados, diariamente, com aparelho portátil com transdutor linear de 6,5 MHz (M5-VET; Mindray, China) pela via transretal. À detecção de um folículo ≥ 35 mm, durante o estro, as éguas foram submetidas ao acompanhamento da dinâmica ovariana até a ovulação espontânea (Grupo GC) ou induzidas com 750 μ g de acetato de deslorelina por via intramuscular (Grupo GT). Cada égua foi utilizada duas vezes, uma em cada grupo.

- Biópsia guiada por ultrassonografia

As biópsias de tecido luteal foram realizadas nos 4, 8 e 12 dias após a ovulação, utilizando agulha de biópsia automática com 48 cm de comprimento, com trocater interno contendo uma depressão de 15 x 1,6 mm e um revestimento cortante de 16 ga (US Biopsy, Franklin, IN, USA) [15]. A biópsia foi realizada por via vaginal com a agulha inserida em uma guia montada com transdutor microconvexo (8 MHz) em seu interior. Antes da coleta, os animais foram sedados com cloridrato de detomidina (0,02mg/ml) e a agulha inserida na guia foi introduzida na vagina enquanto o ovário era manipulado pela via retal, para ser posicionado na frente do transdutor. Uma vez identificado o CL, a agulha com o trocater incluso foi inserida no ovário através da parede vaginal, e então a ponta do trocater foi exposta penetrando o CL e o dispositivo disparado fazendo com que o revestimento cortante avançasse até a ponta da agulha coletando o material, que ficava alojado na depressão da agulha. Após a coleta, o fragmento foi analisado, e eventuais debris e parte de estroma ovariano foram retirados. Em seguida, a amostra foi colocada em criotubos de 2ml e armazenadas imediatamente em botijão, contendo nitrogênio líquido, até transferência para freezer (-80 °C).

- Expressão dos genes

O RNA total foi extraído de cada amostra de CL, utilizando 500 µL de TRI® Reagente (Sigma, St. Louis, USA), deixado em repouso por 15 minutos, em seguida foram adicionados 100 µL de clorofórmio (P.A), ficando em repouso por mais 15 minutos. As amostras foram centrifugadas (12.000 g por 15 min) e retirados 500µL de sobrenadante. Ao sobrenadante coletado foi adicionada a mesma proporção (1:1) de Isopropanol (P.A) e deixado 12 horas em freezer (-20°C) para prosseguir a extração. As amostras foram centrifugadas (12.000 g por 15 min) e o sobrenadante foi descartado lentamente. Ao sedimento foram adicionados 500µL de etanol 70%, seguido de centrifugação (rotação máxima por 5 minutos), o sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento deixado em repouso por 15 minutos, em seguida foi adicionado água ultrapura para a eluição do RNA total. A concentração e pureza do RNA (A260: A280 razão) foram verificadas utilizando um espectrofotômetro Nano Vue Plus® (GE Healthcare Life Sciences).

A transcrição-reversa para cDNA foi realizada com 700 ng de RNA total, de cada amostra, utilizando o Kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega®). Foi adicionado 1 µL do Oligo(dT)15 ao volume de 4 µL do RNA total, incubado a 70 °C por 5 minutos e esfriado a 4 °C por 5 minutos. A essa mistura foi adicionado 4 µL do tampão Improm-II™ (5X), 2,4 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 1 µL dNTP (0,5mM de cada dNTP) e 1 µL da enzima transcriptase reversa Improm-II, água ultrapura para totalizar um volume final de 20 µL da reação, incubada a 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos e inativação da enzima em 70 °C por 15 minutos.

A concentração das amostras de cDNA total foi avaliada no espectrofotômetro (BioMate™₃ da Thermo®) na diluição 1:250. As amostras foram padronizadas na concentração de 100 ng/µL e estocadas em freezer à - 80 °C.

A expressão do mRNA para os genes VEGF, bFGF e LH-R foi avaliada a partir da amplificação de segmentos dos genes com os oligonucleotídeos iniciadores relacionados na Tabela 1, em reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

Tabela 1- Sequências de oligonucleotídeos utilizados para amplificar os fragmentos dos genes estudados em PCR em tempo real.

Gene	Sequência	GeneBank
VEGF	Fw – TTGCCTTGCTGCTCTACCTC	NM_001081821.1
	Rv – GTCCACCAGGGTCTCGATTG	
bFGF	Fw – CAAAAACGGGGGCTTCTTCC	NM_001195221.1
	Rv - TAACGGTTCGCACACTCC	
LH-R	Fw –TTGCCACATCATCCTATTCTC	AY271258
	Rv - TTCTTTTGTGGCAAGTTTCT	
GAPDH	Fw – ACCACTTTGGCATCGTGGAG	AF157626
	Rv – GGGCCATCCACGGTCTTCTG	

Com excessão do gene do LHR e do GAPDH [16], os iniciadores das amplificações dos genes do VEGF e bFGF foram construídos utilizando o programa Primer 3 Plus com base nas sequências nucleotídicas obtidas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

As reações de qPCR foram realizadas com o kit de amplificação Quantifast™ SYBR Green PCR (Qiagen), em termociclador (Rotor-Gene Q - Qiagen®), as reações foram realizadas em duplicadas, com controle negativo para identificar reações inespecíficas. Em cada reação foram utilizados 2,0 µL do cDNA (100ng/µL), 7,5 µL do SYBR Green, 0,5 µL de primer sense e anti-sense (10 pM) e 5,5µL de H₂O, totalizando um volume final de 15 µL. Os seguintes ciclos foram empregados: temperatura inicial de 95°C por 5 min (ativação da enzima), 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 30 segundos (captação da fluorescência). As condições do Melting foram: temperatura de 60 a 95°C, com incremento de 0,5°C/5segundos.

O gene de referência utilizado para normatizar as expressões dos genes em estudo foi o GAPDH. A quantificação relativa da expressão dos genes foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [17].

Resultados

A técnica de biópsia guiada por ultrassom foi eficiente para coletar fragmentos do corpo lúteo equino, suficientes para avaliar a expressão de mRNA para os três genes estudados. As médias e erro padrão da média (epm) estão apresentadas na Figura 1.

Os valores obtidos de LHR não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos avaliados (D4, D8 e D12) no grupo GC, porém os animais induzidos a ovular com deslorelina (GT) apresentaram maior expressão de mRNA do LHR aos 4 dias após a ovulação comparado aos 8 ($P < 0,05$) e 12 dias ($P < 0,01$). Por outro lado, aos 4 dias após a ovulação, foi observada maior expressão deste gene no grupo tratado comparado com o mesmo momento do grupo controle ($P < 0,01$).

Para o VEGF foi observada tendência ($P = 0,06$) de diferença apenas no GT sendo que foi observada menor expressão aos 12 dias comparada aos momentos anteriores (4 ou 8 dias). Os resultados obtidos para a expressão de VEGF apresentaram uma alta correlação positiva com a expressão de LHR ($P < 0,00001$, $r = 0,78$).

Foi observada expressão do bFGF nos CLs avaliados, no entanto, não encontrou-se nenhuma diferença ($P > 0,05$) entre grupos ou momentos após a ovulação.

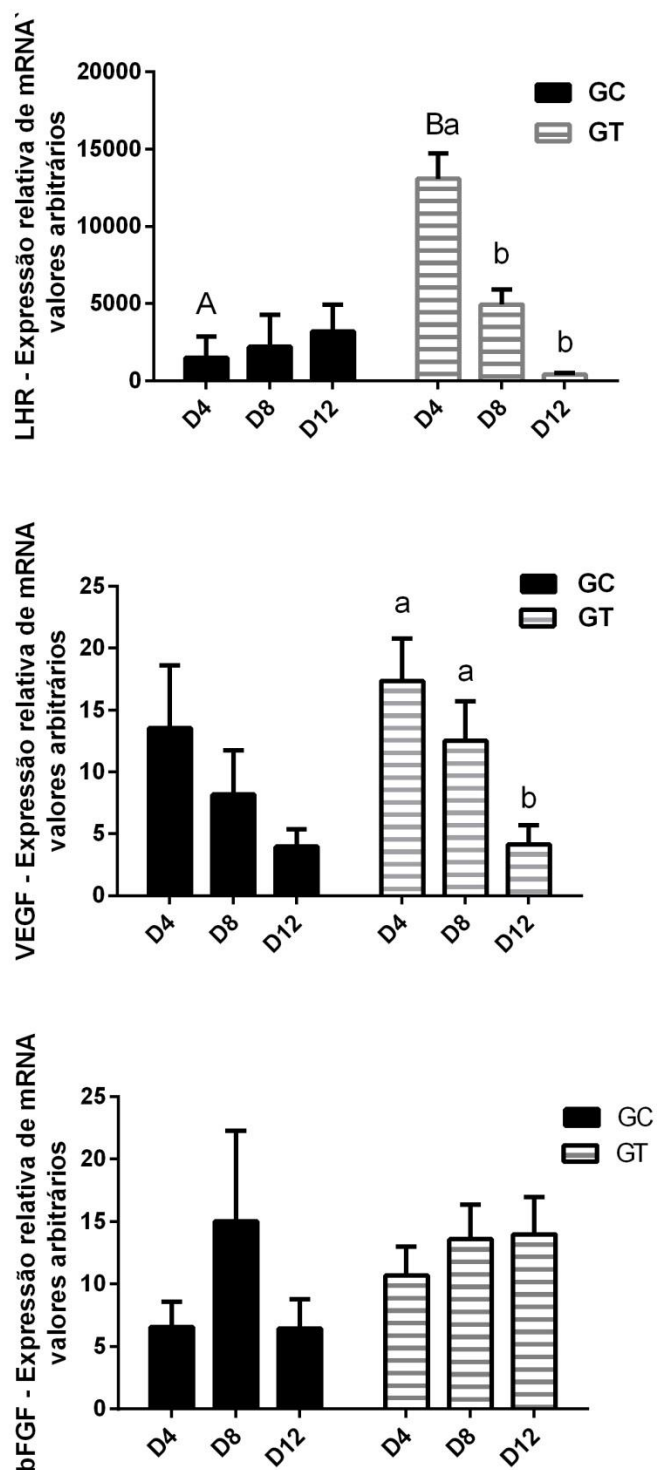


Figura 1 – Média e erro padrão da média da expressão relativa do mRNA dos genes do LHR, VEGF e bFGF em corpos lúteos de éguas com ovulação natural ou induzida com acetato de deslorelina, conforme o tempo pós-ovulatório. GC = grupo controle. GT = grupo tratado. D4 = 4 dias após ovulação. D8 = 8 dias após ovulação. D12 = 12 dias após ovulação. AB - significa diferença significativa entre grupos para o mesmo dia. ab - significa diferença significativa entre os dias de um mesmo grupo.

Discussão

Neste estudo foi utilizada a metodologia qPCR para avaliar, *in vivo*, a expressão de genes relacionados com a angiogênese em CL de éguas submetidas a indução da ovulação com deslorelina, 4, 8 e 12 dias após a ovulação. Foi demonstrada a expressão do mRNA para os genes estudados durante o período citado.

O CL é um órgão endócrino que se renova a cada ciclo estral, pelo remodelamento do folículo ovulado. A principal substância produzida pelo CL é a progesterona, hormônio essencial a implantação do embrião no útero e manutenção inicial da gestação. Para suprir esta produção, dois principais eventos ocorrem durante a formação do CL: luteinização das células da granulosa e neovascularização. As plaquetas, presentes no coágulo sanguíneo dentro do folículo rompido são potenciais estimuladoras da migração das células endoteliais para a formação dos novos vasos sanguíneos [18]. O leito vascular do folículo proporciona a base onde os capilares tecais irão se distribuir e as células endoteliais irão migrar [10]. Esses eventos são muito dinâmicos e rápidos pois irão proporcionar as condições para a produção da progesterona nos primeiros dias do CL [19].

A expressão do mRNA para LHR no tecido luteal observada neste estudo confirmou a importância que o LH tem no processo de luteinização. As ações que o LH tem na formação do CL incluem a quebra da membrana basal e reorganização dos vasos sanguíneos, efeito mediado por proteases incluindo a família das metaloproteinases da matriz celular (MMP) [20]. Assim, o bloqueio para a vascularização das células da granulosa é rompido e os componentes da matriz extracelular são espalhados, permitindo a mobilidade celular e a liberação de fatores angiogênicos (revisado por Galvão et al.[21]). Estes fatores estão relacionados com proliferação e permeabilidade dos capilares que contribuirão para o estabelecimento do CL [22]. Por outro lado, o LH

tem um papel mais intenso no CL equino até 8 dias após a ovulação, após o que sua ação reduz gradualmente até a luteólise [23]. Isto está relacionado à concentração de progesterona, assim, a maior expressão de mRNA para LHR nas células luteiais aos 4 dias após ovulação (GT) poderia estar representando a responsividade destas células ao LH e subsequente produção de progesterona.

Segundo Slough et al. [24], a expressão de LHR foi observada no CL até 14 dias após ovulação. No presente estudo, essa expressão foi observada em todos os dias estudados (D4, D8 e D12). Também foi identificada diferença entre ovulação natural e induzida, uma vez que o acetato de deslorelina provocou a maior expressão dos LHR no dia 4 quando comparado com o grupo controle e também com os dias subsequentes do grupo tratado. Essas diferenças podem ser explicadas por a deslorelina atuar como agonista do GnRH, com meia vida entre 6 e 24 hr., estimulando a ovulação, em 2 dias após a administração de uma única dose [4], por aumentar a liberação do LH da adenohipófise [25]. Fisiologicamente, a onda de LH em éguas ocorre de maneira bifásica; um lento aumento entre 10 a 2 dias antes da ovulação e um rápido aumento entre 2 dias antes e um dia depois da ovulação. Este padrão tem uma relação negativa com a produção de progesterona pelo CL, implicando no efeito negativo da progesterona sobre o LH [26]. No entanto, o LH tem efeito positivo sobre a produção de progesterona, conforme já demonstrado em éguas por estudos *in vitro* [27]. Além disso, receptores de LHR são estimulados pela progesterona, de acordo com estudos recentes em células luteinizadas de humanos [28]. Nos animais controle, a expressão de LHR não mostrou variação significativa entre os dias 4 a 12 após a ovulação, representando o padrão fisiológico do LH durante este período. Contudo, uma única dose de acetato de deslorelina teve o efeito de aumentar a liberação de LH em um padrão diferente que pode ter interferido na formação do novo CL e na expressão do LHR nas células luteais.

Vários fatores angiogênicos e mitogênicos têm sido implicados no desenvolvimento das células luteais [29]. As organelas, substratos e enzimas das células esteroidogênicas luteinizadas são responsáveis por determinar a capacidade celular em sintetizar progesterona [30]. Também, a aumentada vascularização do CL recém formado está relacionada ao aumento da utilização das gonadotrofinas séricas, como o LH, da mesma forma que é conhecido para os folículos dominantes em relação aos atresícos [31].

A correlação observada entre a expressão de LHR e VEGF no presente estudo, demonstrou a relação entre este fator angiogênico e o LH. É sabido que o LH estimula a produção de VEGF pelas células luteais, principalmente no início da formação do CL [32]. Estudos realizados em ratas estabeleceram uma estreita associação entre a expressão de mRNA para VEGF e LHR, sugerindo a possibilidade que a vascularização luteal induzida pelo VEGF seja direcionada pela expressão de LHR o qual estaria regulando a fisiologia ovariana [33].

Entre os fatores angiogênicos, o VEGF tem sido estudado em CLs das espécies domésticas. Em éguas, estudos tem demonstrado que a expressão deste fator em células luteais é mais acentuada nas fases inicial (até 4 dias) e mediana (10 dias), diminuindo na luteólise (dia14) [34], o que foi também observado neste estudo, mais significativamente no grupo com ovulação induzida, onde a tendência de redução foi observada já a partir do D12. Embora não significante, este padrão foi observado também no grupo controle. A expressão de VEGF e vascularização no CL também estão associadas à concentração plasmática de progesterona, como observado em búfalas [35], suportando a ideia de que a angiogênese do CI está estreitamente relacionada a sua função. A diminuição do VEGF observada aos 12 dias após a ovulação pode estar associada à proximidade da luteólise (dia 14).

Neste trabalho, ao conhecimento dos autores, foi demonstrada pela primeira vez a expressão de mRNA para bFGF em células luteais equinas. Em outras espécies, o bFGF é considerado como um dos principais fatores envolvidos na angiogênese do CL, ao lado do VEGF [36], ambos estimulados pelo LH [37, 38]. Apesar de não ter sido observada diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos e dias estudados, este dado corrobora com outros estudos que destacam o importante papel que este fator desempenha no processo de desenvolvimento e maturação folicular, ovulação e formação inicial do CL [39]. A ausência de diferenças entre os momentos avaliados, no presente estudo, pode ser explicado pelo período em que as observações foram realizadas (4 a 12 dias após ovulação) e como já foi demonstrado, neste período não há alterações marcantes na produção de progesterona e na área do CL [24, 26].

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que a indução da ovulação com acetato de deslorelina em éguas, propiciou maior expressão de mRNA do gene dos receptores de LH, principalmente no quarto dia após a ovulação. Também a expressão do gene do VEGF foi influenciada pela indução da ovulação, tendo uma queda mais acentuada aos 12 dias após a ovulação, o que deve ser esperado em éguas não prenhes.

Agradecimentos

A Facepe pela concessão de bolsa de estudos para realização desta pesquisa.

Referências Bibliográficas

[1] Squires EL, McKinnon A, Carnevale EM, Morris R, Nett TM. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. J Reprod Fert Suppl. 1987; 35:399-403.

- [2] Perry G. 2013 - Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. International Embryo Transfer Society - Data Retrieval Committee Reports; 2014:1-13.
- [3] Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, McCue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*. 2000; 54:965-79.
- [4] Stich KL, Wendt KM, Blanchard TL, Brinsko SP. Effects of a new injectable short-term release deslorelin in foal-heat mares. *Theriogenology*. 2004; 62:831-6.
- [5] McCue PM, Hudson JJ, Bruemmer JE, Squires EL. Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. *Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. 2004: 510-3.
- [6] Mumford EL, Squires EL, Jöchle E, Harrinson LA, Nett TM, Trigg TE. Use of deslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares during three consecutive estrous cycles. *Anim Reprod*. 1995; 39:129-40.
- [7] McKinnon AO, Vasey JR, Lescun TB, Trigg TE. Repeated use of a GnRH analogue deslorelin (Ovuplant) for hastening ovulation in the transitional mare. *Equine Vet J*. 1997; 29:153-5.
- [8] Milvae RA, Hinckley ST, Carlson JC. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*. 1996; 45:1327-49.
- [9] Jones LS, Ottobre JS, Pate JL. Progesterone regulation of luteinizing hormone receptors on cultured bovine luteal cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1992; 85:33-9.

- [10] Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim.* 2004; 39:206-16.
- [11] Yan Z, Neulen J, Raczek S, Weich HA, Keck C, Grunwald K, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) production by luteinized human granulosa cells in vitro; a paracrine signal in corpus luteum formation. *Gynecol Endocrinol.* 1998; 12:149-53.
- [12] Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction.* 2003; 125:759-67.
- [13] Woad KJ, Hunter MG, Mann GE, Laird M, Hammond AJ, Robinson RS. Fibroblast growth factor 2 is a key determinant of vascular sprouting during bovine luteal angiogenesis. *Reproduction.* 2012; 143:35-43.
- [14] Galvao A, Henriques S, Pestka D, Lukasik K, Skarzynski D, Mateus LM, et al. Equine luteal function regulation may depend on the interaction between cytokines and vascular endothelial growth factor: an in vitro study. *Biol Reprod.* 2012; 86:187.
- [15] Haag KT, Magalhaes-Padilha DM, Fonseca GR, Wischral A, Gastal MO, King SS, et al. Quantification, morphology, and viability of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. *Theriogenology.* 2013; 79:599-609.
- [16] Beg MA, Gastal EL, Gastal MO, Ji S, Wiltbank, MC, Ginther OJ. Changes in steady-state concentrations of messenger ribonucleic acids in luteal tissue during prostaglandin F_{2α} induced luteolysis in mares. *Anim Reprod Sci.* 2005; 90: 273–85.
- [17] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods.* 2001; 25:402-8.

- [18] Furukawa K, Fujiwara H, Sato Y, Zeng BX, Fujii H, Yoshioka S, et al. Platelets are novel regulators of neovascularization and luteinization during human corpus luteum formation. *Endocrinology*. 2007; 148:3056-64.
- [19] Davis JS, Rueda BR. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. *Front Biosci*. 2002; 7:d1949-78.
- [20] Kliem H, Welter H, Kraetzl WD, Steffl M, Meyer HH, Schams D, et al. Expression and localisation of extracellular matrix degrading proteases and their inhibitors during the oestrous cycle and after induced luteolysis in the bovine corpus luteum. *Reproduction*. 2007; 134:535-47.
- [21] Galvao AM, Ferreira-Dias G, Skarzynski DJ. Cytokines and angiogenesis in the corpus luteum. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013:420186.
- [22] Berisha B, Steffl M, Amselgruber W, Schams D. Changes in fibroblast growth factor 2 and its receptors in bovine follicles before and after GnRH application and after ovulation. *Reproduction*. 2006; 131:319-29.
- [23] Kozai K, Hojo T, Takahashi M, Acosta TJ, Nambo Y, Okuda K. Seasonal changes in luteal progesterone concentration and mRNA expressions of progesterone synthesis-related proteins in the corpus luteum of mares. *J Reprod Develop*. 2012; 58:393-7.
- [24] Slough TL, Rispoli LA, Carnevale EM, Niswender GD, Bruemmer JE. Temporal gene expression in equine corpora lutea based on serial biopsies in vivo. *J Anim Sci*. 2011; 89:389-96.
- [25] Kino S, Osawa T, Mizuno S, Watanabe G, Taya K, Izaike Y. Effect of Postbreeding Intramuscular Administration of Deslorelin Acetate on Plasma LH and Progesterone Concentrations and Conception Rate in Mares. *J Equi Sci*. 2014; 25:23-7.

- [26] Ginther OJ, Utt MD, Bergfelt DR, Beg MA. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Anim Reprod Sci.* 2006; 95:144-50.
- [27] Kelly CM, Hoyer PB, Wise ME. In-vitro and in-vivo responsiveness of the corpus luteum of the mare to gonadotrophin stimulation. *J Reprod Fertil.* 1988; 84:593-600.
- [28] Yung Y, Aviel-Ronen S, Maman E, Rubinstein N, Avivi C, Orvieto R, et al. Localization of luteinizing hormone receptor protein in the human ovary. *Mol Hum Reprod.* 2014; 20:844-9.
- [29] La Paz MN, Fonseca VU, Campos DB, Artoni LP, Sousa LMMC, Papa PC. [In vitro progesterone production from bovine corpus luteum throughout gestation]. *Pesq Vet Braz.* 2007; 27:370-6.
- [30] Salles MGF, Araújo AA. [Cyclic and gestational corpus luteum: review]. *Rev Bras Reprod Anim.* 2010;34:185-94.
- [31] Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE, Jr. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology.* 1981; 109:356-62.
- [32] Meidan R, Levy N, Kisliouk T, Podlovny L, Rusiansky M, Klipper E. The yin and yang of corpus luteum-derived endothelial cells: balancing life and death. *Domest Anim Endocrinol.* 2005; 29:318-28.
- [33] Harada M, Peegel H, Menon KM. Expression of vascular endothelial growth factor A during ligand-induced down-regulation of luteinizing hormone receptor in the ovary. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 328:28-33.

- [34] Al-zi'abi MO, Watson ED, Fraser HM. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. *Reproduction*. 2003; 125:259-70.
- [35] Papa PC, Moura CE, Artoni LP, Fatima LA, Campos DB, Marques JE, Jr., et al. VEGF system expression in different stages of estrous cycle in the corpus luteum of non-treated and superovulated water buffalo. *Domest Anim Endocrinol*. 2007; 33:379-89.
- [36] Gabler C, Plath-Gabler A, Killian GJ, Berisha B, Schams D. Expression pattern of fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) system members in bovine corpus luteum endothelial cells during treatment with FGF-2, VEGF or oestradiol. *Reprod Domest Anim*. 2004; 39:321-7.
- [37] Stirling D, Waterman MR, Simpson ER. Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. *J Reprod Fertil*. 1991; 91:1-8.
- [38] Koos RD. Increased expression of vascular endothelial growth/permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus: potential roles in follicle rupture. *Biol Reprod*. 1995; 52:1426-35.
- [39] Schams D, Berisha B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*. 2002; 23:53-65.

7 CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a indução da ovulação com acetato de deslorelina não altera a produção de progesterona pelo corpo lúteo, porém, proporciona maior vascularização e melhor atuação do LH, através de seus receptores, especialmente no início do desenvolvimento do corpo lúteo (4 dias). O CL equino expressa bFGF, embora este fator não apresente alterações no período estudado. A redução do fator angiogênico, como o VEGF, deve estar associada à vascularização do corpo lúteo e tendeu a ser reduzida a partir do 12^o dia após a ovulação, período próximo à luteólise.