

Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões eqüinos?

Are there relationships between the luteal size, luteal morphoechogenicity by ultrasound and plasmatical progesterone concentrations in recipient mares?

Rubens Paes de ARRUDA¹; José Antonio VISINTIN¹; João Junqueira FLEURY²; Alexandre Rossetto GARCIA¹; Ed Hoffmann MADUREIRA¹; Eneiva Carla Carvalho CELEGHINI¹; José Rodrigues NEVES NETO³

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Rubens Paes de Arruda
Centro de Biotecnologia em Reprodução
Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da USP
Av. Duque de Caxias Norte, 225
Caixa Postal 23
13630-000 – Pirassununga – SP
e-mail: arrudarp@usp.br

1- Departamento de Reprodução Animal
da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP – SP
2- Faculdade de Medicina Veterinária
Otávio Bastos
3- Médico Veterinário Autônomo

RESUMO

O corpo lúteo (CL) é a glândula produtora de progesterona (P_4), hormônio cuja secreção contínua é essencial para o início e a manutenção da gestação em fêmeas eqüinas, e, conseqüentemente, para a aplicabilidade de inúmeras biotécnicas de reprodução. Considerando-se a importância do CL para a manutenção de uma gestação normal e suas características anatomofisiológicas, objetivou-se determinar por ultra-sonografia (US) o tamanho e a morfoecogenicidade (ME) do CL em receptoras de embriões eqüinos desde a ovulação (D0) até nove dias após (D9), bem como os níveis plasmáticos de P_4 produzida no mesmo período. Para tanto, 57 éguas receptoras de um programa de transferência de embriões foram examinadas diariamente por US transretal desde a primeira detecção dos sinais de estro até o D9. A cada exame, os CL foram mensurados e sua ME registrada segundo escore de 1 a 6 (1=anecóico; 6=hiperecócico). Amostras de sangue foram colhidas diariamente e a P_4 dosada por radioimunoensaio. O diagnóstico de gestação foi realizado por US aos 13 e 25 dias após a ovulação. Houve uma tendência de os corpos lúteos apresentarem ME crescente (de 1 a 5) desde o dia da ovulação até o D9. Os níveis de P_4 foram $\leq 2,16$ ng/ml até o D3, com conseqüente elevação e manutenção em níveis de diestro entre D4 e D9 (3,41 a 4,33 ng/ml). O tamanho luteínico não diferiu, com exceção das médias extremas durante o período (D2 = 31,54 mm versus D8 = 25,95mm; $p < 0,05$). Assim, o aumento da ME média dos CLs avaliados por US é acompanhado por aumento na concentração plasmática de P_4 em receptoras de embriões, mas este evento parece não ser dependente do tamanho da glândula luteínica. Não existe diferença na ME, no tamanho dos corpos lúteos, nem nos níveis de P_4 circulante do D0 ao D9 em receptoras de embriões eqüinos que se tornaram gestantes ou não após a transferência de embriões.

UNITERMOS: Eqüinos; Corpo lúteo; Progesterona; Morfoecogenicidade.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas possibilitou o melhor aproveitamento dos animais, tornando possível acelerar o aprimoramento das raças e seus cruzamentos. A inseminação artificial foi uma das primeiras a se destacar e, mais recentemente, a transferência de embriões (TE) pode ser definida como a mais promissora. Especialmente em eqüinos, a TE pode contribuir decisivamente para a multiplicação de reservas genéticas superiores, para a preservação de raças exóticas ou em extinção e para a formação de rebanhos a partir de um número reduzido de animais superiores. A TE possibilita ainda a obtenção de descendentes de animais que se tornaram subférteis por problemas adquiridos, o melhor aproveitamento de éguas que possuam alto valor zootécnico e sejam idosas ou estejam em atividade esportiva, o maior controle de doenças quando da transferência de material genético entre estados ou países, bem como a obtenção de divisas para o país através de exportações de embriões congelados.

Uma técnica segura, barata e eficiente para a transferência de embriões em eqüinos há tempos tem sido buscada. Entretanto, vários são os fatores que podem interferir nos índices de prenhez após a TE, como a habilidade do técnico, o método de transferência de embriões, a qualidade dos embriões transferidos, a sincronia da ovulação entre doadora e receptora, o grau de alterações patológicas do endométrio uterino de receptoras e a funcionalidade da glândula luteínica da receptora.

O corpo lúteo (CL) é o local de produção da progesterona (P_4). A P_4 promove o encerramento dos sintomas de estro, mantém a fêmea não receptiva ao macho e também prepara o útero para a recepção do embrião. Quando a fêmea se encontra gestante, há a manutenção do corpo lúteo, mediada pela presença do embrião no lúmen uterino; caso contrário, o corpo lúteo regride sob a ação luteolítica da prostaglandina $F_{2\alpha}$ produzida pelas glândulas endometriais. A secreção contínua de progesterona é essencial para o início e a manutenção da gestação em fêmeas eqüinas^{1,2,3}. Após a ovulação, que ocorre devido ao aumento prolongado nos níveis do hormônio luteinizante ao final do diestro e durante o

estros, as células da granulosa são estimuladas a se transformar em células luteínicas. Estas células invadem o coágulo sangüíneo originado após a ovulação e nele se proliferam para formar o corpo hemorrágico. Entre os dias 1 e 2 após a ovulação, esta estrutura começa a produzir progesterona e, quando a concentração plasmática supera 1 ng/ml, inicia-se o diestro, desaparecendo as características e o comportamento associados ao estro⁴. A concentração de progesterona aumenta rapidamente, atingindo o pico aproximadamente no dia 6 do ciclo, quando mantém um platô⁵. Com a maturação do corpo lúteo, o sangue coagulado é absorvido e substituído por células luteínicas, causando diminuição no tamanho do corpo lúteo. Por volta de 8 a 10 dias, o corpo lúteo decresce de tamanho e aparece no ovário anatomicamente como uma área firme e esponjosa dentro do estroma ovariano. O corpo lúteo maduro produz de 8 a 10 ng/ml de progesterona até aproximadamente 14 e 15 dias após a ovulação, quando sofre luteólise. Após a lise do CL, o nível de progesterona diminui rapidamente em 1 a 2 dias para menos de 1 ng/ml e a égua retorna ao estro⁵.

Diferentes níveis plasmáticos de progesterona durante o ciclo estral em éguas têm sido reportados. A produção de P₄ durante o estro ocasiona níveis inferiores a 1 ng/ml⁶. Segundo Vivo et al.⁷, os níveis plasmáticos durante o estro estão baixos, sendo inferiores a 2 ng/ml. Fathalla et al.⁸ demonstraram que os valores alcançam de 0,18 a 1,05 ng/ml no estro. Oba et al.⁹ citam que os valores médios durante o cio são de $0,89 \pm 0,11$ ng/ml, ou seja, abaixo de 1 ng/ml. Níveis plasmáticos $\leq 1,0$ ng/ml são aceitos como normais para animais em estro¹⁰.

Para os animais em diestro, são demonstrados pelas pesquisas níveis de P₄ acima de 4 ng/ml 48 horas após o final dos sintomas de estro⁷, 5,49 ng/ml no 5º dia¹¹ e 7,7 ng/ml no 6º dia¹² ou 10 ng/ml⁶ no 6º dia do ciclo. Há relato de um segundo pico de P₄ com níveis de 7,8 ng/ml no 10º dia do ciclo estral e 9,36 ng/ml no 8º dia¹³. Segundo Fathalla et al.⁸, a média de progesterona da fase luteínica é de 10,29 ng/ml, com variações nos níveis entre os dias 11 e 14 do ciclo estral de 13,95 ng/ml e 12,09 ng/ml. Romano¹⁴ constatou níveis máximos de progesterona durante o diestro em éguas Puro sangue Árabe (PSA) de $6,68 \pm 4,56$ ng/ml e em éguas mestiças de $6,56 \pm 1,83$ ng/ml. São aceitos como normais os níveis de 4,0 a 12,0 ng/ml para animais em diestro e 9,0 a 30,0 ng/ml para animais entre 15 e 30 dias de gestação¹⁰.

Apesar da evidente importância da existência e funcionalidade do CL durante o ciclo estral e a gestação, a presença e o estágio da glândula luteínica não podem ser avaliados com precisão através de palpação retal. As dosagens de progesterona representam um meio eficiente para indicar a atividade da glândula luteínica, porém não podem ser utilizadas para uma avaliação imediata. Já a ultra-sonografia pode ser empregada imediatamente para a detecção e avaliação do desenvolvimento tanto de folículos quanto de corpos lúteos, os quais são reconhecidos via exame ecográfico pelo tamanho, forma e características de ecogenicidade^{15,16}. A relativa hipocogenicidade do CL contrasta com o cinza-brilhante do parênquima ovariano. Imediatamente após a ovulação, o tecido luteínico em formação não pode ser bem reconhecido, passando a ser sonograficamente detectável depois de 2 a 4 dias.

“Cavidades” em corpos lúteos foram diagnosticadas ultra-sonograficamente por Pierson e Ginther¹⁵; Reeves et al.¹⁷;

Kito et al.¹⁸ e Kähn¹⁶. Estas estruturas luteínicas foram chamadas primordialmente de cistos do corpo lúteo e apresentam-se como cavidades que variam de tamanho e com ecogenicidade semelhante à apresentada por folículos (anecóicas). Kito et al.¹⁸ não encontraram diferenças nos níveis de progesterona para as fêmeas que apresentavam ou não as cavidades luteínicas e sugeriram que estas cavidades não causam nenhum efeito sobre a fertilidade. As cavidades luteínicas parecem também não desempenhar papel funcional importante sobre o ciclo estral e gestação¹⁹. Em bovinos, os corpos lúteos com ou sem cavidade não têm efeito no comprimento do ciclo estral, nos níveis de progesterona e na fertilidade¹⁶.

Em éguas, aproximadamente 50% das glândulas desenvolvem coágulo sangüíneo central²⁰. Os coágulos se organizam e diminuem de volume no período compreendido entre a ovulação e a regressão luteínica^{20,21}. Os corpos hemorrágicos centrais, aparentemente, não são funcionalmente importantes, pois são encontrados em 50% de todos os corpos lúteos, tampouco alteram o tempo de visualização ultra-sonográfica ($17 \pm 0,6$ dias) durante o período interovulatório ($21 \pm 0,5$ dias). Nas ovulações subsequentes de um mesmo animal, o CL pode apresentar ou não o centro anecóico, segundo a probabilidade aproximada de 50% de ocorrência. O corpo hemorrágico central ocorre por acaso e não é peculiaridade de algumas éguas ou de certo período ovulatório. A extensão das rupturas dos componentes vasculares na parede folicular durante a ovulação é que determina, ao acaso, a formação ou não do corpo hemorrágico central^{20,21}. Não existem diferenças significativas nos níveis de progesterona produzida por corpos lúteos com centro não-ecogênico ou ecogênico²².

Uma forma alternativa de avaliação dos corpos lúteos através da utilização da ecografia é a medida da ecogenicidade da glândula em diferentes fases após a ovulação. Escalas subjetivas de cinza, com notas que variam de 1 a 5, medem a densidade pela quantidade de brilho apresentada na tela do aparelho. A quantidade de tecido luteínico pode afetar a produtividade da glândula. Similarmente, a intensidade da ecogenicidade luteínica pode refletir a qualidade hemodinâmica e a funcionalidade luteínica. O período de diminuição da produção de progesterona que ocorre no começo e no final do diestro coincide, temporariamente, com o alto escore na escala de ecogenicidade luteínica. Por outro lado, o período de maior produção de progesterona (meio do diestro) coincide com o baixo escore na escala de ecogenicidade luteínica^{20,21,23}. A análise de imagens luteínicas através de sistema computadorizado usando diferentes tonalidades em escala de cinza também tem se mostrado uma forma segura para mensurar a ecogenicidade luteínica²³.

Portanto, é patente que os fenômenos envolvidos no desenvolvimento folicular, na ovulação e no período compreendido entre a formação do corpo lúteo e o momento da transferência embrionária são imprescindíveis para o estabelecimento da gestação. Considerando a importância da presença do corpo lúteo para a manutenção de uma gestação normal e com atenção especial às características anatômicas e fisiológicas do CL, foram objetivos deste trabalho: 1) Determinar e comparar a morfoecogenicidade ultra-sonográfica de corpos lúteos em receptoras de embriões eqüinos entre os dias zero (D0 = ovulação) e nove (D9) após a ovulação; 2) Avaliar os níveis plasmáticos de

progesterona em receptoras de embriões entre o D0 e o D9; 3) Mensurar os corpos lúteos em receptoras de embriões entre o D0 e o D9; 4) Estimar a relação entre morfoecogenicidade e tamanho do corpo lúteo com os níveis plasmáticos de progesterona; 5) Comparar os níveis plasmáticos de progesterona, morfoecogenicidade e tamanho dos corpos lúteos entre o D0 e o D7, em receptoras que se tornaram gestantes ou não após a transferência de embriões.

MATERIAL E MÉTODO

Local

O trabalho foi desenvolvido no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, unidade do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga (SP).

Animais

Como doadoras de embriões foram utilizadas 30 fêmeas puras e 20 mestiças da raça Mangalarga com idades entre 3 e 18 anos e, como receptoras, 90 fêmeas sem raças definidas com idades entre 3 e 14 anos. As fêmeas foram avaliadas clinicamente e preencheram os seguintes requisitos: ausência de alterações de útero e de ovários detectáveis à palpação retal e à ultra-sonografia, ciclicidade regular após observações de dois ciclos estrais consecutivos, condição corporal satisfatória e ausência de alterações clínicas que pudessem comprometer o desempenho reprodutivo.

Controle da ovulação e do desenvolvimento do corpo lúteo

As 57 receptoras utilizadas foram examinadas diariamente através de ultra-sonografia transretal com probe de 5 e 7,5 MHz (Scanner 480 Vet – Pie Medical® – Holanda). Cada animal foi acompanhado desde a primeira detecção dos sinais de estro até 9 dias após a ovulação.

Os exames ultra-sonográficos diários foram realizados até no máximo o 9º dia após a ovulação, com o intuito de acompanhar a morfologia e a ecogenicidade dos corpos lúteos. As mensurações dos corpos lúteos foram realizadas após a congelamento da imagem, medindo-se os dois maiores diâmetros para determinação do tamanho médio. Os corpos lúteos mensurados foram identificados, detalhadamente escaneados e classificados segundo a variação de morfologia e ecogenicidade, do dia da ovulação (D0) até, no máximo, o nono dia do ciclo (D9). As informações diárias de morfoecogenicidade foram compiladas e os dados organizados em um escore de notas que variou de 1 a 6 (Quadro 1).

Transferência de embriões

Foram realizadas 115 transferências de embriões. Foram inovuladas as receptoras que ovularam dois dias antes (assincronia +2); um dia antes (assincronia +1); no mesmo dia (sincrônicas) e até três dias após (assincronia -1, -2, -3) a doadora²⁴.

Quadro 1

Escore de morfoecogenicidade (1 a 6) detectada por ultra-sonografia de corpos lúteos em receptoras de embriões eqüinos (D0 a D9). Pirassununga, 1995.

Escore	Descrição
1	Pontos ecogênicos e anecóicos com visualização disforme
2	Pontos ecogênicos e anecóicos com visualização definida
3	Levemente ecogênico ou trabeculado
4	Com centro anecóico ou trabeculado
5	Ecogênico
6	Hiperecogênico (com centro anecóico ou não)

Dosagem hormonal

As amostras de sangue para as dosagens de progesterona foram colhidas diariamente (9 horas) por punção venosa em tubos providos com anticoagulante. Após a colheita do sangue, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente até a centrifugação e extração do plasma, que foi armazenado a -18°C em tubos modelo Ependorff para as avaliações hormonais.

Os ensaios de progesterona foram realizados no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelo método de radioimunoensaio (RIA), utilizando kits Progesterone Maia^a.

Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado através de ultra-sonografia aos 13 e 25 dias após a ovulação da receptora.

Receptoras gestantes X Receptoras vazias

Para avaliar se existe diferença na morfoecogenicidade e na produção de progesterona dos corpos lúteos entre receptoras que se tornaram gestantes ou não após a transferência de embriões, uma subamostra (n=16) da população experimental foi utilizada. Após o diagnóstico de gestação, fêmeas gestantes e fêmeas vazias foram escolhidas aleatoriamente e suas características luteínicas e de produção de P₄ foram avaliadas entre o D0 e o D9.

Análise estatística

Os resultados que envolvem frequência foram apresentados em tabelas de frequência, com número absoluto e a proporção dos casos observados. As comparações entre as proporções foram efetuadas utilizando-se o teste de X² (Qui-quadrado)²⁵. As características de níveis plasmáticos de progesterona, o tamanho e a morfoecogenicidade dos corpos lúteos foram estudados através de análises de variância pelo método dos quadrados mínimos, enquanto comparações entre médias foram realizadas pelo teste de Tukey. As análises de variância foram realizadas pelo procedimento General Linear Model (GLM) contido no Statistical Analysis System²⁶, bem como a obtenção de correlações inerentes à metodologia. A hipótese testada foi significativa quando p < 0,05.

RESULTADOS

Os resultados de distribuição e freqüência das características morfológicas e de ecogenicidade dos corpos lúteos entre o dia da ovulação (D0) e o nono dia após a ovulação (D9) são apresentados na Tab. 1.

Nota-se que houve uma tendência de os corpos lúteos apresentarem morfoecogenicidade crescente (de 1 a 5) desde o dia da ovulação até o D9. Corpos lúteos com morfoecogenicidade de escore 6 foram detectados entre os dias 1 e 7 após a ovulação, porém em baixa freqüência.

As médias de morfoecogenicidade, tamanho e níveis plasmáticos de progesterona de acordo com os dias após a ovulação estão expressos na Tab. 2. Os níveis plasmáticos de progesterona foram significativamente mais baixos até o terceiro dia após a ovulação, a partir do qual a produção de progesterona se elevou e esse se manteve relativamente constante até o último dia de observação. A morfoecogenicidade luteínica também apresentou diferenças significativas no período de observação. As diferenças estatísticas na morfoecogenicidade durante os três primeiros dias após a ovulação são reflexo da dinâmica de estruturação e organização do tecido luteínico e coincidem com o período de mais baixa produção de P₄. A ausência de diferença nas morfoecogenicidades médias, principalmente após o quinto dia da ovulação, dá idéia da maturidade anatômica atingida pelo corpo lúteo. Não houve diferença estatística significativa quanto ao tamanho do corpo lúteo, com exceção das médias extremas durante o período (maior tamanho no D2 = 31,54 mm; menor tamanho no D8 = 25,95mm), que diferiram entre si.

A relação entre a morfoecogenicidade luteínica, tamanho do CL e a produção média de progesterona pode ser visualizada na Fig. 1. As características de morfoecogenicidade luteínica, tamanho do CL e produção de P₄ entre o D0 e o D7, considerando a confirmação ou não de prenhez das receptoras, estão demonstradas nas Fig. 2, 3 e 4. Ao se realizar a análise de variância, não houve diferenças estatísticas significativas (p > 0,05) nas médias diárias observadas de morfoecogenicidade do CL para receptoras

Tabela 2

Médias estimadas ± erro padrão (E.P.) do nível plasmático de progesterona (P₄), do tamanho (CL) e da morfoecogenicidade (ME) do corpo lúteo, desde o dia da ovulação (D0) até o nono dia (D9) após a ovulação. Pirassununga, 1995.

Dia Pós-ovulação	(n)	Média ± E.P.		
		ME (1 a 6)	tamanho (mm)	P ₄ (ng/ml)
0	(36)	1,00 ± 0,13 ^d	(23) 29,32 ± 0,77 ^{ab}	(55) 0,02 ± 0,19 ^c
1	(36)	2,87 ± 0,13 ^c	(36) 29,56 ± 0,60 ^{ab}	(55) 0,24 ± 0,19 ^c
2	(36)	3,56 ± 0,13 ^b	(35) 31,54 ± 0,61 ^a	(55) 0,98 ± 0,19 ^{bc}
3	(36)	3,93 ± 0,13 ^{ab}	(35) 30,29 ± 0,61 ^{ab}	(55) 2,16 ± 0,19 ^b
4	(36)	4,15 ± 0,13 ^{ab}	(36) 30,12 ± 0,60 ^{ab}	(55) 3,41 ± 0,19 ^a
5	(36)	4,35 ± 0,14 ^a	(39) 29,13 ± 0,61 ^{ab}	(54) 4,26 ± 0,19 ^a
6	(34)	4,38 ± 0,14 ^a	(40) 27,51 ± 0,63 ^{ab}	(54) 4,23 ± 0,19 ^a
7	(32)	4,40 ± 0,14 ^a	(39) 29,86 ± 0,67 ^{ab}	(50) 4,37 ± 0,21 ^a
8	(12)	4,34 ± 0,24 ^a	(14) 25,95 ± 1,14 ^b	(30) 4,21 ± 0,19 ^a
9	-	-	-	(24) 4,33 ± 0,19
Geral		3,66 ± 0,04	29,01 ± 0,22	2,46 ± 0,06

(a, b, c) Médias seguidas de letras diferentes dentro do mesmo item e da mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

gestantes ou vazias do D0 ao D7. Também não foram observadas diferenças estatísticas na análise de variância (p > 0,05) das médias de tamanho do CL e do nível plasmático de progesterona em receptoras prenhes ou vazias dentro do mesmo período.

DISCUSSÃO

Os trabalhos de Ginther e Pierson²⁰ e Pierson e Ginther²¹ referem-se ao estudo da ecogenicidade dos corpos lúteos eqüinos através da ultra-sonografia. A medida da ecogenicidade da glândula em diferentes fases varia de densidade em função da quantidade de brilho apresentada na tela do aparelho. Townson et al.²²

Tabela 1

Distribuição e freqüência (em %) da morfoecogenicidade (ME) de corpos lúteos à ultra-sonografia, em receptoras de embriões eqüinos, desde o dia da ovulação (D0) até o nono dia (D9) após a ovulação. Pirassununga, 1995.

ME	n	Dias após a ovulação									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	36	36 (100,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	22	-	19 (52,8)	02 (05,6)	01 (02,8)	-	-	-	-	-	-
3	77	-	11 (30,5)	21 (58,3)	16 (44,5)	09 (25,0)	07 (19,4)	06 (17,7)	05 (15,6)	02 (16,7)	-
4	70	-	-	05 (13,9)	07 (19,4)	16 (44,5)	14 (38,9)	12 (35,3)	11 (34,4)	04 (33,3)	01 (25,0)
5	74	-	04 (11,1)	07 (19,4)	08 (22,2)	08 (22,2)	11 (30,6)	13 (38,2)	14 (43,7)	06 (50,0)	03 (75,0)
6	19	-	02 (05,6)	01 (02,8)	04 (11,1)	03 (08,3)	04 (11,1)	03 (08,8)	02 (06,3)	-	-
Total	298	36	36	36	36	36	36	34	32	12	04

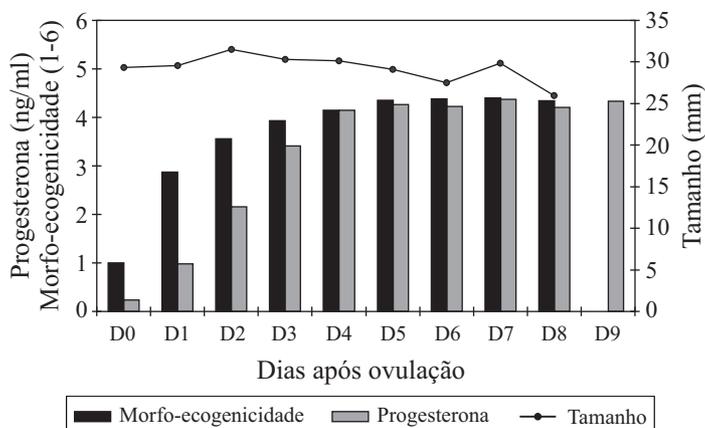


Figura 1

Médias observadas de morfoecogenicidade, tamanho do corpo lúteo e do nível plasmático de progesterona em receptoras de embriões eqüinos. Pirassununga, 1995.

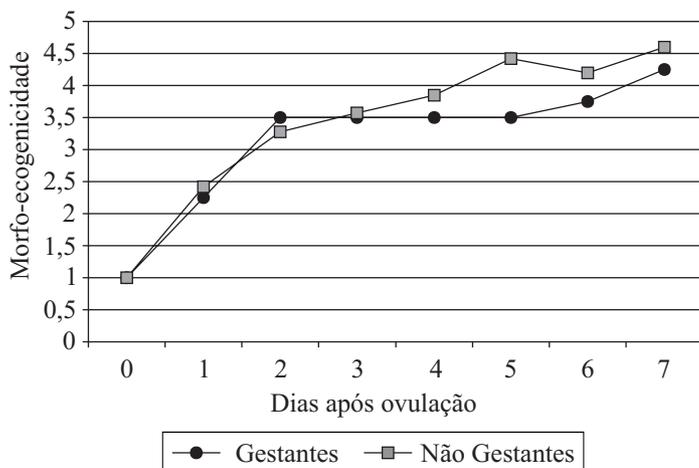


Figura 2

Médias observadas da morfoecogenicidade luteínica em receptoras de embriões eqüinos, de acordo com os grupos de prenhez. Pirassununga, 1995.*
* ANOVA, $p > 0,05$ entre D0 e D7.

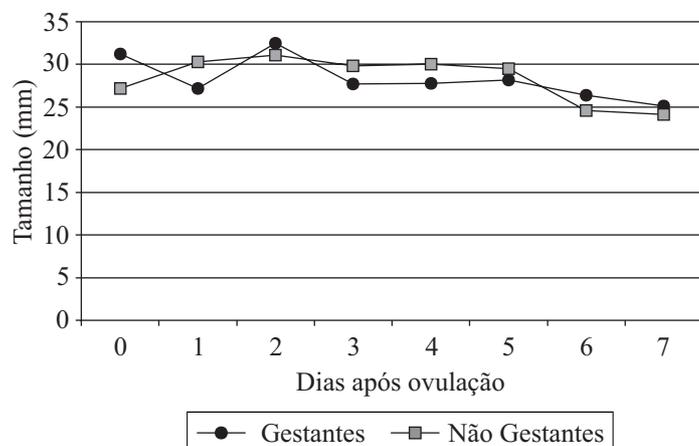


Figura 3

Médias observadas do tamanho do corpo lúteo em receptoras de embriões eqüinos, de acordo com os grupos de prenhez. Pirassununga, 1995.*
* ANOVA, $p > 0,05$ entre D0 e D7.

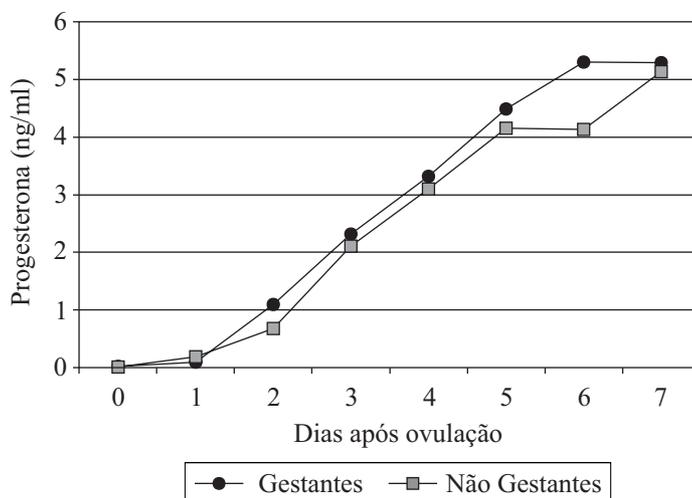


Figura 4

Médias observadas do nível plasmático de progesterona em receptoras de embriões eqüinos, de acordo com os grupos de prenhez. Pirassununga, 1995.*
* ANOVA, $p > 0,05$ entre D0 e D7.

estudaram também a morfologia dos corpos lúteos e seus efeitos sobre os níveis de progesterona.

Ao analisar os resultados do acompanhamento diário de morfoecogenicidade luteínica (Tab. 1), nota-se que um dia após a ovulação 52,8% dos corpos lúteos apresentaram pontos ecogênicos e anecóticos com visualização definida (escore 2) e 30,5% dos corpos lúteos apresentaram imagem com pontos levemente ecogênicos ou trabeculados (escore 3). Isto sugere que neste período há organização do corpo hemorrágico, mas, apesar desta organização, a produção de progesterona não é suficiente para elevar os níveis de progesterona acima de 1 ng/ml (Tab. 2). Ao segundo dia após a ovulação, observa-se que 90% dos corpos lúteos avaliados apresentam escore entre 3 e 5 (escore 3 = 58,3%, escore 4 = 13,9% e escore 5 = 19,4%), o que indica franca organização glandular em termos anatômicos. Apesar do aumento numérico nos níveis de P_4 entre os dias zero e dois (0,02 x 0,98 ng/ml) e dois e três (0,98 x 2,16 ng/ml), a produção de progesterona até o D2 ainda se manteve em níveis menores que 1 ng/ml. No terceiro dia após a ovulação houve pequena mudança na proporção de corpos lúteos com morfoecogenicidade entre 3 e 5, mas houve um leve aumento na freqüência de corpos lúteos com escore entre 4 e 5. Neste dia, houve um aumento significativo nos níveis de progesterona, os quais alcançaram 2,16 ng/ml ($p < 0,05$); contudo, o tamanho dos corpos lúteos não apresentou variação significativa. Nos dias 4 a 8 após a ovulação, a maior porcentagem de corpos lúteos apresentou centros anecóticos ou trabeculados (escore 4) ou eram totalmente ecogênicos (escore 5). Neste período, os níveis plasmáticos de progesterona alcançaram 3,41 ng/ml no dia 6, atingindo o pico de 4,37 ng/ml no dia 7, fenômeno acompanhado por uma pequena diminuição não significativa no tamanho dos corpos lúteos. No dia 9 após a ovulação, embora o número de animais avaliados seja restrito, manteve-se a tendência de os corpos lúteos apresentarem morfoecogenicidade de escore 4 ou 5, como havia ocorrido desde o dia 4 após a ovulação.

Níveis plasmáticos de progesterona têm sido determinados por vários pesquisadores^{1,2,3,4,8}. Os níveis plasmáticos de progesterona obtidos dentro do período estudado estão de acordo com os aumentos diários após a ovulação encontrados por Townson et al.²², porém diferem dos valores máximos de progesterona obtidos (4,37 x 11,6 ng/ml). Os resultados obtidos estão de acordo com as citações de Smith et al.¹²; Stabenfeldt et al.⁶; Plokta et al.¹³; Plokta et al.¹¹; Allen e Hadley²⁷; Vivo et al.⁷; Lopate e Therelfall¹⁰; Oba et al.⁹ e Romano¹⁴, que registraram níveis de $P_4 \leq 1,0$ ng/ml para animais em estro e entre 4,0 e 12,0 ng/ml para éguas em diestro. Portanto, os níveis plasmáticos de progesterona apresentados e avaliados no presente trabalho podem ser aceitos como normais para fêmeas eqüinas.

Segundo a Fig. 1, há uma relação de paralelismo entre o aumento da morfoecogenicidade do CL e o aumento da produção de P_4 , decorrente da ovulação e o estabelecimento da fase de diestro. No dia da ovulação (D0), os níveis de progesterona estão baixos em função da presença do corpo hemorrágico (detectado por pontos ecogênicos e anecóicos com visualização disforme), mas se elevam gradualmente. Este aumento na P_4 é acompanhado por aumento de morfoecogenicidade, principalmente do D4 em diante. Entretanto, esta elevação nos níveis de progesterona parece não ser decorrente do tamanho do CL (e indiretamente do volume de tecido luteínico), como se poderia esperar. Considerando o quadro de classificação da morfoecogenicidade proposto e utilizado no presente trabalho, os resultados obtidos estão em perfeito acordo com pesquisas anteriores de Ginther e Pierson²⁰; Pierson e Ginther²¹ e Townson e Ginther²³. Há concordância no aspecto de que a intensidade da ecogenicidade do corpo lúteo pode refletir a qualidade hemodinâmica, bem como a funcionalidade luteínica abre uma perspectiva de análise sobre o CL até então não discutida. Baseadas nessas informações, as avaliações ultra-sonográficas realizadas isoladamente passam a ter uma informação adicional sobre a provável atividade luteínica em termos de produção de progesterona. Este tipo de análise reveste-se não somente de importância científica, mas em termos práticos pode ser usada, por exemplo, no momento de avaliação de receptoras em programas de transferência de embriões. Neste caso específico, em que pese a necessidade de avaliação rápida de um grande número de animais, a classificação luteínica pode surgir como ferramenta de auxílio na escolha das éguas mais aptas à TE naquele instante. Por certo, a classificação da ecogenicidade luteínica não tem o intuito nem o poder de substituir a dosagem hormonal em situações em que a informação precisa sobre os níveis de P_4 se faz necessária.

Comparativamente, para receptoras que conceberam ou não após a TE, a morfoecogenicidade, o tamanho do CL e os níveis plasmáticos de progesterona não foram diferentes desde o D0 até o D7 ($p > 0,05$) (Fig. 2, 3 e 4). As médias dos níveis plasmáticos de progesterona observadas nas receptoras que se torna-

ram gestantes mostram-se compatíveis com os níveis normais de progesterona citados na literatura. Desta forma, uma vez apresentando corpos lúteos dentro da mesma faixa de morfoecogenicidade à ultra-sonografia e, indiretamente, níveis de progesterona semelhantes, as chances de concepção para éguas dentro de uma população de receptoras é igual. É certo que vários fatores podem desempenhar papel importante na manutenção da gestação após o procedimento da TE. Entretanto, ao que parece, nenhum desses fatores é possível de ser detectado através do exame de morfoecogenicidade luteínica no período estudado do ciclo estral. Estudos sobre a morfoecogenicidade do CL do D9 ao final do diestro e luteólise em fêmeas vazias e também durante as semanas iniciais de gestação são necessários para o estabelecimento de parâmetros ecogênicos e, por sorte, parâmetros fisiológicos durante estas fases, as quais compreendem boa parte dos casos de mortalidade embrionária precoce.

CONCLUSÕES

- 1) A morfoecogenicidade dos corpos lúteos em receptoras de embriões eqüinos aumenta rápida e significativamente durante os três primeiros dias após a ovulação. Do quinto dia em diante, apesar de haver um aumento numérico na morfoecogenicidade luteínica, este aumento não é significativo e há uma estabilização na ecogenicidade do corpo lúteo;
- 2) Os níveis plasmáticos de progesterona do D0 até o D9 são mais baixos que 1 ng/ml durante os três primeiros dias pós-ovulação; do D3 em diante, há aumento significativo na produção, a qual se estabiliza em torno de 4 ng/ml até o D9;
- 3) O corpo lúteo eqüino atinge dimensão média de 29,01 mm entre os dias 0 e 9 após a ovulação, com variações detectadas de 25,90 a 31,50 mm dentro do mesmo período;
- 4) O aumento da morfoecogenicidade média dos corpos lúteos avaliados por ultra-sonografia é acompanhado por aumento na concentração plasmática de progesterona em éguas receptoras de embriões, mas estes parâmetros parecem não ser dependentes do tamanho da glândula luteínica;
- 5) Não existe diferença na morfoecogenicidade e no tamanho dos corpos lúteos, nem nos níveis de progesterona circulante do D0 ao D9 em receptoras de embriões eqüinos que se tornaram gestantes ou não após o procedimento da transferência de embriões.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo para a realização do trabalho.

SUMMARY

Corpus luteum (CL) synthesizes progesterone (P₄), which has a major function in maintenance of pregnancy in equine females and also enables the application of biotechnologies of reproduction. Considering the importance of the CL and its anatomical and physiological features to achieve normal pregnancy, our aims were to determine the size and morphoecogenicity (ME), as well as plasma P₄ concentrations of corpus luteum from recipient mares for nine days after ovulation (D0). Therefore, 57 recipient mares were examined daily by transrectal ultrasonography (US) from early signals of estrus to D9. CLs were measured and their ME classified according to a 1 to 6 scale (1=anechogenic; 6=hiperechogenic). Blood samples were collected daily and progesterone concentrations assessed by radioimmunoassay. Pregnancies were checked by US 13 and 25 days after ovulation. Corpus luteum echogenicity had a tendency to increase from D0 to D9. Progesterone concentrations were ≤ 2,16 ng/ml until D3, but there was a significant elevation from D4 to D9 (3,41 to 4,33 ng/ml). There were no differences in CL size, except between D2 (31,54 mm) and D8 (25,95 mm); p < 0,05). Thus, an increase in mean luteal ME is accompanied by an increase in plasmatic P₄ concentration, but this event seems independent of luteal size. There were no differences between ME, size and P₄ levels from D0 to D9 in recipient mares that became pregnant or not after embryo transfer.

UNITERMS: Equine; Corpus luteum; Progesterone; Morphoecogenicity.

REFERÊNCIAS

- 1- PARRYWEEKS, L. C.; HOLTAN, D. W. Effect of altrenogest on pregnancy maintenance in unsynchronised equine embryo recipients. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 433-843, 1987. Supplement 35.
- 2- POOL, K. F.; WILSON, J. M.; WEBB, G. W.; KRAEMER, D. C.; POOTER, G. D.; EVANS, J. W. Exogenous hormone regimens to utilize successfully mares in dioestrus (Days 2-14 after ovulation) as embryo transfer recipients. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 429-432, 1987. Supplement 35.
- 3- WAELCHLI, R. O.; KÄNZIG, M.; DÖBELI, M.; RÜSCH, P. Condition of the uterine cervix in relation to cycle stage, plasma progesterone and estradiol - 17β concentrations in the mare. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 29, n. 6, p. 404-410, 1994.
- 4- NEELY, D. P.; KINDAHL, H.; STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. E.; HUGHES, J. P. Prostaglandin release patterns in the mares. Physiological, pathophysiological and therapeutic responses. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 181-189, 1979. Supplement 27.
- 5- HUGHES, J. P.; STABENFELDT, D. H.; EVANS, J. W. Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, p. 119-152, 1972.
- 6- STABENFELDT, G. H.; HUGHES, J. P.; EVANS, J. W. Studies on the oestrus cycle of the mare. **Federation Proceedings**, v. 30, p. 419, 1971.
- 7- VIVO, R.; SANTISTEBAN, R.; TOVAR, P.; CASTEJON, M. F. Valores de progesterona en plasma de yeguas españolas y arabs durante el ciclo reproductor. **Archivos de Zootecnia**, Madrid, v. 35, n. 131, p. 59-67, 1986.
- 8- FATHALLA, M.; YOUNIS, L.; JAWAD, N. Progesterone concentration and ovascan reading during the estrous cycle in Arabian mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 8, n. 4, p. 326-328, 1988.
- 9- OBA, E.; MOREIRA, A. F.; MAMPRIM, M. J. Progesterone and LH serum concentration in adult mares during oestrus. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12., 1992, Netherlands. **Free communications**. Hague, p. 1900-1902.
- 10- LOPATE, C.; THERELFALL, W. R. Assessment of luteal function with progesterone enzyme immunoassays in the horse mare. **Theriogenology**, v. 35, n. 3, p. 583-590, 1991.
- 11- PLOKTA, E. D.; WITHERSPOON, D. M.; FOLEY, C. W. Luteal function in the mare as reflected by progesterone concentrations in peripheral blood plasma. **American Journal Veterinary Research**, v. 35, n. 5, p. 917-920, 1972.
- 12- SMITH, I. D.; BASSETT, J. M.; WILLIAMS, T. Progesterone concentrations in the peripheral plasma of the mare during the oestrus cycle. **Journal of Endocrinology**, v. 47, n. 4, p. 523-524, 1970.
- 13- PLOKTA, E. D.; WITHERSPOON, D. M.; GOETSCH, D. D. Peripheral plasma progesterone levels during the estrus cycle of the mare. **Federation Proceedings. Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 30, p. 419, 1971.
- 14- ROMANO, M. A. **Níveis de progesterona no ciclo estral, duração de estro, intervalo entre partos e momento de ovulação em eqüinos árabes**. 1993. 93 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 15- PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, v. 21, n. 3, p. 495-504, 1984.
- 16- KÄHN, W. **Veterinary reproductive ultrasonography**. 2.ed. London, Mosby-Wolfe. 1994, 256 p.
- 17- REEVES, J. J.; RANTANEN, N. W.; HAUSER, M. Transrectal real-time ultrasound scanning of the cow reproductive tract. **Theriogenology**, v. 21, n. 3, p. 485-494, 1984.
- 18- KITO, S.; OKUDA, K.; MIYAZAWA, K.; SATO, K. Study on the appearance of the cavity in corpus luteum of cows by using ultrasonic scanning. **Theriogenology**, v. 25, n. 2, p. 325-333, 1986.
- 19- 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, n. 3, p. 487-498, 1990.
- 20- GINTHER, O. J.; PIERSON, R. A. Ultrasonic anatomy of equine ovaries. **Theriogenology**, v. 21, n. 3, p. 471-483, 1984.
- 21- PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic evaluation of the corpus luteum of the mare. **Theriogenology**, v. 23, n. 5, p. 795-806, 1985.
- 22- TOWNSON, D. H.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Characterization of plasma progesterone concentrations for two distinct luteal morphologies in mares. **Theriogenology**, v. 32, n. 2, p. 197-204, 1989.
- 23- TOWNSON, D. H.; GINTHER, O. J. Ultrasonic characterization of follicular evacuation during ovulation and fate of the discharged follicular fluid in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 20, n. 2, p. 131-141, 1989.
- 24- SQUIRES, E. L.; COOK, V. M.; VOSS, J. L. Collection and transfer of equine embryos. **Animal Reproduction Laboratory**, Fort Collins: Colorado State University, Fort Collins: 1985. v. 1, 38 p.
- 25- SEIGEL, S. **Estatística não paramétrica**. São Paulo, McGraw-Hill, 1975, 350 p.
- 26- SAS Institute Raleigh, USA. **SAS User's guide statistics 89**. Raleigh, 1989.
- 27- ALLEN, W. A.; HADLEY, J. C. Blood progesterone concentrations in pregnant and non-pregnant mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 6, n. 2, p. 87-93, 1974.

Recebido para publicação: 20/09/2000
Aprovado para publicação: 31/01/2002