

AVALIAÇÃO DO CORPO LÚTEO, CONTRATILIDADE UTERINA E CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA E ESTRADIOL EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS

LUCIANA DA SILVA LEAL,¹ EUNICE OBA,² CARLOS ANTÔNIO DE CARVALHO FERNANDES³ E OCILON GOMES DE SÁ FILHO⁴

1. Doutoranda da FMVZ/UNESP

2. Professora doutora da FMVZ/UNESP

3. Professor titular da Universidade José do Rosário Vellano

4. Doutorando da UNESP

RESUMO

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar o corpo lúteo (CL), o tônus uterino e a concentração plasmática de progesterona (P_4) e estradiol ($17\beta E_2$) nas receptoras, no dia da transferência de embriões. Para isso, utilizaram-se sessenta novilhas mestiças como receptoras. A taxa de prenhez segundo o tamanho do CL à palpação transretal foi 70,0% (7/10 - pequeno), 38,9% (7/18 - médio) e 60,0% (15/25 - grande). Ao exame ultrassonográfico, 50,9% (29/57) dos CL detectados continham cavidade cística. O diâmetro médio do CL foi $17,8 \pm 6,3$ mm (n=57) e da cavidade cística $6,8 \pm 4,2$ mm (n=29). Os volumes médios foram para CL

$4,4 \pm 9,1$ cm³ (n=57), cavidade cística $0,4 \pm 1,0$ cm³ (n=29) e massa luteal $4,2 \pm 8,4$ cm³ (n=57). No dia da inovulação, a média da concentração de progesterona foi $4,9 \pm 3,0$ ng/mL (n=60) e estradiol $4,5 \pm 6,0$ pg/mL (n=60). Não houve diferença estatística entre as concentrações de progesterona e estradiol para receptoras prenhes ou não. Das sessenta receptoras avaliadas, 49 apresentaram útero flácido (grau 1) e onze útero em estágio intermediário (grau 2), apresentando índices de prenhez de 47,6% (20/42) e 81,8% (9/11) (p<0,05), respectivamente.

PALAVRAS-CHAVES: Estradiol e prenhez, progesterona, receptoras, transferência de embriões.

ABSTRACT

EVALUATION OF CORPUS LUTEUM, UTERINE CONTRACTILITY AND PROGESTERONE AND ESTRADIOL PLASMATIC CONCENTRATIONS IN RECIPIENTS OF BOVINE EMBRYOS

The aims of the present study were to evaluate the size of *corpus luteum* (CL), uterine contractility and plasma progesterone (P_4) and estradiol ($17\beta E_2$) concentrations in recipients, in the day of embryo transfer. For this, 60 cross-bred recipient heifers were used. The pregnancy rate of recipients according to the CL size by rectal palpation was 70.0% (7/10 - small), 38.9% (7/18 - medium) and 60.0% (15/25 - large). Ultrasonographic evaluation detected 50.9% (29/57) of the CL with a cystic cavity. The average diameter of the CL was 17.8 ± 6.3 mm (n=57) and of cystic cavity was 6.8 ± 4.2 mm (n=29). The mean volume of the CL was 4.4

± 9.1 cm³ (n=57), of cystic cavity was 0.4 ± 1.0 cm³ (n=29) and of luteal mass was 4.2 ± 8.4 cm³ (n=57). In the day of the inovulation, progesterone and estradiol concentrations were respectively 4.9 ± 3.0 ng/mL (n=60) and 4.5 ± 6.0 pg/mL (n=60) in average. There was no statistic difference between progesterone and estradiol concentrations for pregnant and non-pregnant recipients. Forty-nine of the 60 recipients presented flaccid uterus (grade 1) and 11 had uterus in intermediate stage (grade 2). Those presented pregnancy rates of 47.6% (20/42) and 81.8% (9/11) (p<0.05) respectively.

KEY WORDS: Embryo transfer, estradiol and pregnancy, progesterone, recipients.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das técnicas de ovulação múltipla e de transferência de embriões possibilitou o aumento dos índices reprodutivos em fêmeas bovinas, maior intensidade de seleção, diminuição do intervalo de gerações, maior disponibilidade de animais para reposição (PENNA, 1993) e, além disso, também permitiu que uma fêmea de elevado padrão zootécnico fosse utilizada de uma forma mais racional, fornecendo um grande número de descendentes, num curto espaço de tempo (FERNANDES, 1994). No entanto, apresentam custo elevado e variação nos resultados, por causa dos fatores que influenciam a resposta ovulatória de doadoras, afetando a fertilização e a viabilidade embrionária e aqueles relacionados ao programa e ao manejo animal (ARMSTRONG, 1993).

A caracterização do corpo lúteo (CL) fornece informações importantes sobre o estado reprodutivo da fêmea bovina e possibilita a adequação de procedimentos de manipulação ou sincronização do ciclo estral (VIANA et al., 1999). A seleção das receptoras no dia da transferência de embriões geralmente é realizada levando-se em consideração o tamanho do CL à palpação transretal. Este método, apesar da praticidade e facilidade de execução, apresenta limitação na avaliação, dada a sua baixa sensibilidade e especificidade (SPRECHER et al., 1989). O trabalho realizado por VIANA (1996) mostrou que a escolha das receptoras pela projeção do CL não é adequada. Um CL com projeção pequena pode apresentar uma grande porção embibida no estroma ovariano, enquanto que um CL com projeção maior pode apresentar massa luteal total pequena. Assim, a projeção nem sempre está relacionada ao tamanho do CL. Um método mais eficiente de estimar a massa luteal total por palpação transretal é pelo aumento de volume que o CL proporciona ao ovário no qual está presente (FERNANDES & VELÁSQUEZ, 1997).

A ultrassonografia é uma técnica que permite a completa visualização do tecido luteal, possibilitando maior precisão na identificação e na mensuração do CL (PIERSON & GINTHER, 1987; RIBADU et al., 1994). Nessa avaliação, a imagem do CL é uniforme, circunscrita e menos

ecogênica que o estroma ovariano (VIANA et al., 1999).

Durante o ciclo estral, os níveis de progesterona (P_4) refletem o crescimento, a manutenção e a regressão luteal (SPANNO & SILVA, 1992) e sua avaliação permite a associação das características morfológicas do CL ao ultrassom com o seu estado funcional. A concentração de P_4 circulante depende diretamente de sua produção, da liberação pelo tecido luteal e da taxa de *clearance* (VIANA et al., 1999). Fatores como o fluxo sanguíneo, presença de agentes luteotróficos ou luteolíticos e a disponibilidade de precursores para a sua biossíntese pelas células luteais interferem na produção deste hormônio (WILTBANK, 1994). Estes interagem determinando um padrão de secreção circadiana para os esteróides ovarianos (SPANNO & SILVA, 1992).

A concentração de estradiol ($17\beta E_2$) durante a sincronização do estro foi negativamente correlacionada ($r = -0,39$) com as taxas de prenhez após a inseminação artificial (WEHRMAN et al., 1993). Vacas mais velhas (com mais de doze anos) apresentaram concentrações circulantes de $17\beta E_2$, durante a fase folicular, maior do que vacas novas (BRYNER et al., 1990). A concentração de $17\beta E_2$ elevada nessa fase do ciclo estral foi associada a valores baixos de fertilização e implantação; e maior incidência de anormalidades embrionárias (BRYNER et al., 1990; BRUEL et al., 1993). Elevações prolongadas nas concentrações de $17\beta E_2$ durante o ciclo estral anterior podem alterar a função uterina do ciclo subsequente e, conseqüentemente, um ambiente intrauterino inadequado ou adverso, o qual pode aumentar as perdas embrionárias e diminuir as taxas de prenhez. A interação entre concentração baixa de P_4 e alta de $17\beta E_2$ durante a regulação da maturação oocitária e preparação da tuba uterina e/ou do útero para a manutenção do embrião pode influenciar negativamente as taxas de prenhez (BRYNER et al., 1990; BRUEL et al., 1993).

Sabendo-se da importância das biotecnologias de ovulação múltipla e transferência de embrião para a exploração mais efetiva de fêmeas geneticamente superiores, e da influência dos hormônios sobre a regulação do ciclo estral, no

processo de implantação embrionário e na manutenção da gestação, pretendeu-se, neste trabalho, avaliar o CL e o tônus uterino e determinar a concentração plasmática de P_4 e $17\beta E_2$ nas receptoras bovinas, no dia da transferência de embriões. Com vista a essas considerações, o presente trabalho teve como finalidade contribuir para um melhor entendimento, aperfeiçoamento e expansão dessa técnica para a obtenção de melhores resultados.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se sessenta novilhas receptoras, mestiças, com peso acima de 300 kg, escore corporal acima de três, numa escala de um a cinco (FERNANDES, 1994), pertencentes à Casa Branca Agropastoril, Fazenda Água Limpa e à Fazenda Santa Rosa, localizadas no município de Fama e Elói Mendes, respectivamente, região sul do Estado de Minas Gerais. Esses animais foram mantidos em piquetes de capim *Brachiaria decumbens* com suplementação mineral e água *ad libitum*.

As receptoras foram submetidas à quarentena, avaliação clínica geral, exames para a detecção de brucelose e tuberculose, administração de vermífugos e ectoparasiticidas, exame ginecológico completo (vaginoscopia e palpação transretal) para verificar a saúde genital e a fase do ciclo estral. Além disso, procurou-se selecionar receptoras de porte compatível com a raça do embrião a ser inovulado e capazes de produzir leite suficiente para amamentar e permitir que a cria se desenvolvesse normalmente.

A luteólise nas vacas doadoras de embriões foi induzida com duas aplicações de 0,53 mg de cloprostenol sódico (Ciosin® - Coopers Brasil S. A., Brasil) por via intramuscular, 96 e 108 horas após o início da administração de FSH, ou seja, no 12º dia do ciclo estral. Nas receptoras, induziu-se o estro mediante uma aplicação dessa droga, nas mesmas dose e via, 24 horas antes da primeira aplicação nas doadoras.

Após a aplicação do luteolítico, as receptoras foram mantidas em piquetes na presença de rufiões mestiços zebuínos, com mais de dois anos de idade (1:40). Além disso, realizou-se a observação visual do estro por um funcionário

treinado, três vezes ao dia, por um período não inferior a vinte minutos. O reflexo de imobilidade foi o sinal considerado para a determinação do estro. Consideraram-se inquietação, monta nas outras vacas, edema e descarga de muco pela vulva sinais secundários. Anotaram-se o dia e a hora em que o estro foi detectado (Dia 0).

No dia da inovulação dos embriões, os ovários foram avaliados por palpação transretal para identificar e localizar o CL e classificá-lo quanto ao tamanho em pequeno, médio e grande; levando-se em consideração a projeção e a assimetria ovariana. Para o CL ser considerado pequeno, a assimetria entre os ovários tinha de ser de 10,0 a 30,0%, médio 40,0 a 70,0% e grande > 80,0%.

O tônus uterino foi avaliado quanto à contratilidade, sendo classificado em grau 1 (flácido), grau 2 (estágio intermediário entre flácido e contraído) e grau 3 (contraído).

Transferiram-se os embriões classificados como grau I (excelente) ou grau II (bom) a fresco pelo método não cirúrgico (Dia 7), utilizando-se um inovulador apropriado. No momento desse procedimento foi realizada anestesia epidural baixa, aplicando-se 6,0 mL de lidocaína a 2% sem vaso constritor (Anestésico Lidovet® – União Química, Brasil). Nas receptoras em que não foi possível identificar o ovário que possuía o CL, não se realizou a inovulação. O diagnóstico de gestação foi determinado por palpação transretal 45 dias após a transferência dos embriões.

As avaliações ultrassonográficas (modelo Scanner 100 LC Pie Medical TM - Holanda; transdutor linear de 6.0 MHz) dos ovários foram realizadas no dia da transferência de embriões. As imagens do ovário que continha o CL foram gravadas em disquete para mensurações posteriores, utilizando-se o recurso do próprio aparelho.

Das novilhas inovuladas (n = 53), em cinquenta os CL foram mensurados ao exame ultrassonográfico. Para a determinação dos diâmetros do CL e da cavidade cística à ultrassonografia foi calculada a média dos valores encontrados para os dois maiores eixos (longitudinal e transversal). Para avaliar a frequência das receptoras que se tornaram ou não gestantes de acordo com os diâmetros dos CL, estes foram agrupados em três

categorias de medidas $< 15,0$; $\geq 15,0$ a $< 25,0$ e $\geq 25,0$ mm.

Calcularam-se os volumes do CL e da cavidade cística por meio da fórmula para volume de uma esfera ($V = 4/3\pi \times (D/2)^3$), em que D é o diâmetro médio do CL. Quando o CL avaliado era uma estrutura homogênea, considerou-se o volume do mesmo equivalente ao volume da massa luteal. Se o CL apresentava um centro anecoico, o volume da massa luteal foi calculado subtraindo-se o volume deste centro do volume total do CL. Para a análise da incidência de novilhas gestantes ou não de acordo com os volumes dos CL, agruparam-se estes em quatro classes de medidas $< 2,0$; $\geq 2,0$ a $< 4,0$; $\geq 4,0$ a $< 6,0$ e $\geq 6,0$ cm³.

As amostras de sangue foram colhidas pela punção da artéria ou veia coccígea, com auxílio de agulha 21G e depositadas em tubos de colheita de sangue a vácuo heparinizados (Vacutainer - BD, EUA). O volume obtido foi centrifugado a 2.500 x g por dez minutos para a obtenção do plasma que foi acondicionado em tubos plásticos previamente identificados, sendo armazenados em freezer a -20 °C.

As amostras foram quantificadas em suas concentrações plasmáticas de P₄ e 17βE₂, através de procedimento de radioimunoensaio, utilizando-se kits comerciais para P₄ fase sólida (Coat A-Count Diagnostics Products Corporation) e para 17β E₂ (3ª geração DSL- Gênese), no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ - UNESP - Campus de Botucatu.

Analisaram-se os dados foram mediante o sistema SAS versão 6.12 (1996). Os resultados foram submetidos aos tratamentos estatísticos da média, desvio-padrão e porcentagem. Calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson para as variáveis: diâmetros (DIAM) e volumes (VOL) do CL e cavidade cística (CC) e concentração de P₄ e 17β E₂ nas receptoras. Aplicou-se o teste do Qui-quadrado para as comparações que implicaram proporções (tamanho do CL à palpação transretal, CL cavitário ou não, contratilidade uterina). Para avaliar o DIAM CL e o VOL da massa luteal (ML) procedeu-se à análise de variância seguida pelo Teste T e Teste de Kruskal-Wallis. O Teste Exato

de Fisher avaliou DIAM CL, VOL CL, DIAM CC, VOL CC e VOL ML *versus* taxas de prenhez. Em todas as análises realizadas, consideraram-se diferenças significativas quando $p < 0,05$. As correlações foram consideradas quando $r \geq 0,60$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do corpo lúteo e produção de progesterona

Das sessenta fêmeas estudadas, a localização do CL ocorreu mais no ovário direito (n= 38; 63,3%) do que no ovário esquerdo (n= 22; 36,7%), coerente com a maior frequência de ovulações relatadas no ovário direito em bovinos. Para Jainudeen & HAFEZ (1995), a ovulação em vacas ocorre mais frequentemente no ovário direito (60,0%) que no ovário esquerdo (40,0%). Relatos de HASLER et al. (1987) indicaram diferença de 57,0% para o ovário direito e 43,0% para o esquerdo; DEMCZUK et al. (1998), VIANA et al. (1999) e SPELL et al. (2001) observaram 64,0%; 57,1% e 60,0% para o lado direito e 36,0%; 42,9% e 40,0% para o lado esquerdo respectivamente (não existe discussão destes resultados apresentados).

Com relação ao tamanho do CL à palpação transretal, 18,3% (11/60) foram considerados pequenos, 33,3% (20/60) médios e 48,3% (29/60) grandes. Nesse aspecto, observou-se que houve uma predominância de estruturas grandes, contrariando os achados de DEMCZUK et al. (1998), que observaram incidência maior de estruturas médias. Estes autores registraram 19,2% (n= 144) para CL1 (“menor CL”), 51,6% (n= 387) CL2 (“tamanho médio”) e 29,1% (n= 218) CL3 (“maior CL”). SPELL et al. (2001) classificaram os CL como: “excelentes ou bons” (66,0%) (diâmetro palpável $> 10,0$ mm ou consistência moderadamente firme); e “ruins” (33,0%) (diâmetro palpável $< 10,0$ mm ou textura macia). Valores divergentes foram registrados por SILVA et al. (2003) que classificaram os CL como “evidentes” (35,3%) e “pouco evidentes” (64,7%). Confrontando a classificação e os resultados desses dois últimos estudos com o presente experimento verificou-se que a proporção de CL pequenos encontrada foi menor, provavelmente em virtude dos diferentes

padrões utilizados para a classificação do CL pelo examinador.

Das receptoras utilizadas (n= 60) apenas 53 (83,3%) receberam embrião e, destas, 29 (54,7%) tornaram-se prenhes, sendo que 15 (51,7%) mostraram CL grande, 7 (24,1%) médio e 7 (24,1%) pequeno. Com relação à taxa de prenhez segundo o tamanho do CL à palpação transretal, as taxas foram de 70,0% (7/10), 38,9% (7/18) e 60,0% (15/25) para pequeno, médio e grande respectivamente. Não foi observada diferença entre as taxas de prenhez de acordo com o tamanho do CL à palpação transretal, segundo o Teste do Qui-quadrado ($p > 0,05$). Com isso foi possível verificar que a seleção das receptoras pela projeção do CL não foi efetiva em estimar a taxa de gestação nos diferentes grupos.

Outros autores também não observaram influência do tamanho do CL à palpação transretal nas porcentagens de gestação. FERNANDES & VELÁSQUEZ (1997) observaram uma maior taxa de gestação naquelas receptoras em que a assimetria ovariana foi média ou grande, porém sem diferença estatística. DEMCZUK et al. (1998) observaram índices de prenhez de 36,0% (n = 52); 48,8% (n = 189) e 51,2% (n = 112) para CL1, CL2 e CL3, respectivamente. SPELL et al. (2001), comparando as porcentagens de prenhez com as duas classificações de CL (“excelentes ou bons” e “ruins”), encontraram valores elevados – 70,0% e 80,0% respectivamente. SILVA et al. (2003) não encontraram diferenças significativas entre os valores de prenhez para “ausência de CL à palpação transretal”, sendo a presença do CL confirmada pela ultra-sonografia (50,0%), CL “pouco evidente” (51,5%) e CL “evidente” (52,7%). A palpação transretal é um método fácil e prático para a identificação do CL, porém apresenta baixa sensibilidade e especificidade, porque a projeção nem sempre está relacionada ao tamanho do CL. Além do mais, trata-se de técnica que depende diretamente da experiência do examinador.

Ao exame ultrassonográfico constatou-se que 50,9% (29/57) dos CL detectados continham cavidade cística. Porém esse achado, quando comparado às porcentagens de prenhez, não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$; Teste do

Qui-quadrado). TOM et al. (1998), VIANA et al. (1999) e SPELL Et al. (2001) visualizaram cavidades luteais em 40,0; 37,1 e 79,0% dos CL, entre os dias 7 e 16 do ciclo estral, respectivamente. A Figura 1 ilustra CL com e sem cavidade cística.

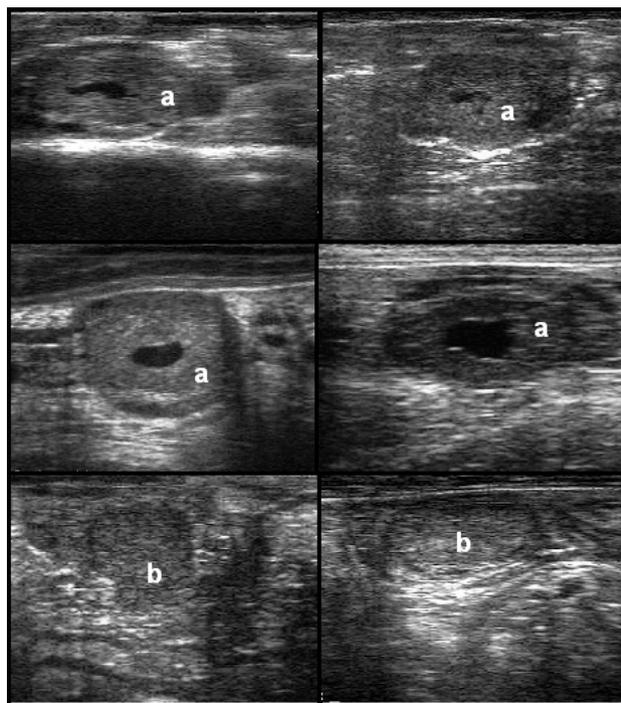


FIGURA 1. Imagens ultrassonográficas de corpos lúteos das receptoras. Corpo lúteo cavitário (a) e sem cavidade (b).

Os valores médios averiguados para diâmetro do CL e cavidade cística foram de $17,8 \pm 6,3$ mm (n = 57) e $6,8 \pm 4,2$ mm (n = 29), respectivamente. Os diâmetros médios dos CL quanto ao tamanho à palpação transretal foram $16,4 \pm 5,4$ mm (pequeno), $15,1 \pm 2,9$ mm (médio) e $20,2 \pm 7,4$ mm (grande). Ao se utilizar a análise de variância seguida pelo Teste T, observou-se diferença ($p = 0,015$) entre a média do diâmetro dos CL (Tabela 1), porém não houve diferença na taxa de prenhez entre os três intervalos de diâmetro ($p = 1,00$), segundo o Teste Exato de Fisher.

Ao exame ultrassonográfico notou-se que as estruturas consideradas grandes apresentaram os maiores diâmetros, enquanto que os diâmetros dos CL pequenos e médios foram próximos. Com

base nesses resultados, verificou-se que a palpação transretal foi satisfatória para distinguir CL médios de grandes, porém perdeu a sensibilidade ao avaliar CL pequenos. Além disso, concluiu-se que a ultrassonografia é a técnica que possibilita maior precisão na identificação e mensuração do CL, conforme afirmado por PIERSON & GINTHER (1987) e RIBADU et al. (1994). Esse mesmo fato foi evidenciado por SPELL et al. (2001), que encontraram diâmetro médio do CL de $23,6 \pm 0,3$ e $25,0 \pm 0,5$ mm para “excelentes ou bons” e “ruins” respectivamente.

TABELA 1. Diâmetros dos CL à ultrassonografia (mm) segundo o tamanho dos CL à palpação transretal

Classificação do CL à palpação transretal	Diâmetro do CL ao exame ultra-sonográfico (mm)
Pequeno	$16,35 \pm 5,40$ ^{ab}
Médio	$15,12 \pm 2,94$ ^b
Grande	$20,17 \pm 7,37$ ^a

a,b indica diferença estatística ($p = 0,015$)

O valor médio para volumes do CL foi $4,4 \pm 9,1$ ($n = 57$), da cavidade cística $0,4 \pm 1,0$ ($n = 29$) e da massa luteal $4,2 \pm 8,4$ cm^3 ($n = 57$). GRYGAR et al. (1997) e SPELL et al. (2001) registraram medidas superiores; os diâmetros e volume médios dos CL estudados por GRYGAR et al. (1997) foram de 24,4 mm e 6,9 cm^3 . Já os valores do diâmetro e volume da cavidade cística e volume do tecido luteal foram de 9,4 mm, 0,6 e 6,7 cm^3 , respectivamente, e os verificados por SPELL et al. (2001) para o diâmetro médio do CL e volume da massa luteal foram de 24,0 mm e 7,0 cm^3 , respectivamente. Os resultados menores obtidos neste experimento podem ser explicados pela utilização de novilhas mestiças, uma vez que existe evidência de que as fêmeas zebuínas apresentam menor CL do que as fêmeas taurinas (SEGERSON et al., 1984).

Observou-se que não houve influência do volume do CL nas taxas de prenhez ($p = 0,49$) segundo o Teste Exato de Fisher.

Para avaliar a frequência das receptoras de acordo com os volumes das massas luteais,

agruparam-se estes em quatro categorias de medidas: $< 2,0$; $\geq 2,0$ a $< 4,0$; $\geq 4,0$ a $< 6,0$ e $\geq 6,0$ cm^3 . No total de 27 animais gestantes (54,0%), em 13 (26,0%), sete (14,0%), cinco (10,0%) e duas (4,0%) os volumes das massas luteais foram $< 2,0$, $\geq 2,0$ a $< 4,0$, $\geq 4,0$ a $< 6,0$ e $\geq 6,0$ cm^3 . Dos 23 animais não gestantes, sete (14,0%), dez (20,0%), um (2,0%) e cinco (10,0%) apresentaram volumes similares aos descritos para as fêmeas prenhes, respectivamente. Não houve diferença na taxa de prenhez entre os quatro intervalos de volumes das massas luteais ($p = 0,12$), segundo o Teste Exato de Fisher.

Os volumes médios da massa luteal foram para CL considerados, à palpação transretal, pequeno ($2,9 \pm 2,8$; $n = 10$), médio ($2,0 \pm 1,0$; $n = 19$) e grande ($6,1 \pm 11,7$; $n = 28$). Segundo o Teste de Kruskal-Wallis houve diferença ($p = 0,001$) nos volumes da massa luteal para médio e grande (Tabela 2).

TABELA 2. Medianas e primeiro e terceiro quartis para o volume da massa luteal e tamanhos do CL à palpação transretal

Tamanho do CL à palpação transretal	Medianas (1°; 3° quartis)
Pequeno	2,31 (1,57; 2,84) ^{ab}
Médio	1,81 (1,14; 2,95) ^b
Grande	3,56 (1,94; 5,82) ^a

a,b indica diferença estatística ($p = 0,001$)

Para SPELL et al. (2001), os valores encontrados para volume luteal foram $6,8 \pm 0,3$ cm^3 de CL “excelentes ou bons” e $7,4 \pm 0,4$ cm^3 de CL “ruins” à palpação transretal.

Considerando-se que o volume médio da massa luteal está relacionado ao diâmetro do CL ($V = 4/3\pi \times (D/2)^3$), era esperado encontrar diferença significativa entre os dados analisados (CL médio e grande).

A concentração plasmática média de P_4 no dia da inovulação dos embriões foi de $4,9 \pm 3,0$ ng/mL ($n = 60$). Este concorda com os descritos na literatura (VIANA et al., 1997; BATTOCHIO et al. 1999; SOLANO et al., 2003). Para BATTOCHIO

et al. (1999), a taxa de P_4 sete dias após o estro foi de 4,0 ng/mL e para SOLANO et al. (2003) esta variou de 0,4 a 4,4 ng/mL.

Os níveis plasmáticos médios de P_4 para as receptoras gestantes e não gestantes foram de $4,8 \pm 3,0$ (29/53) e $5,8 \pm 2,9$ ng/mL (24/53), respectivamente. Os resultados indicaram que a taxa de P_4 no dia da inovulação dos embriões não influenciou os índices de prenhez obtidos ($p = 0,39$; Teste Exato de Fisher). GALIMBERTI et al. (2001) e SILVA et al. (2002) também não observaram diferença nas taxas médias deste hormônio para as fêmeas gestantes e não gestantes ($3,4 \pm 1,1$ e $2,8 \pm 1,3$; $2,9 \pm 0,1$ e $2,9 \pm 0,1$ ng/mL, respectivamente).

As taxas médias de P_4 para os CL considerados pequenos, médios e grandes à palpação transretal foram de $4,2 \pm 2,7$; $4,4 \pm 3,1$ e $5,5 \pm 3,0$ ng/mL, respectivamente. Os CL considerados grandes à palpação transretal produziram maior quantidade de P_4 do que os CL pequenos e médios, porém isto não afetou as porcentagens de prenhez.

As taxas médias de P_4 para os CL considerados pequenos, médios e grandes à palpação transretal foram de $4,2 \pm 2,7$; $4,4 \pm 3,1$ e $5,5 \pm 3,0$ ng/mL, respectivamente. Conforme demonstrado na Tabela 3, observaram-se diferenças ($p < 0,05$)

entre a concentração plasmática de P_4 e o diâmetro do CL, o volume do CL e o volume da massa luteal, porém as correlações ficaram abaixo de $r = 0,60$.

SPELL et al. (2001) não observaram diferenças significativas entre o diâmetro do CL, volume luteal ou concentração plasmática de P_4 entre receptoras que se tornaram ou não prenhes após a transferência de embrião. Ainda segundo esses autores, houve uma correlação simples positiva e significativa, apesar de baixa, entre diâmetro do corpo lúteo ou volume do tecido luteal e concentração plasmática de P_4 ($r = 0,15$, $p < 0,01$ e $r = 0,18$, $p < 0,01$, respectivamente), assim como demonstrada no presente estudo. A concentração de P_4 circulante depende diretamente da sua produção, liberação pelo tecido luteal e da taxa de *clearance* (VIANA et al., 1999). É esperado que a concentração desse hormônio seja maior em animais que apresentam CL com maior massa luteal, porém fatores como o fluxo sanguíneo, presença de agentes luteotróficos ou luteolíticos e a disponibilidade de precursores para a biossíntese pelas células luteais interferem na produção da P_4 (WILTBANK, 1994). Outro aspecto que pode ser considerado é que a correlação poderia ser alta se o número de animais avaliado fosse maior também.

TABELA 3. Matriz de correlações de Pearson referentes às variáveis concentração plasmática de progesterona (CONC P_4), concentração plasmática de estradiol (CONC $17\beta E_2$), diâmetro do CL (DIAM CL), volume do CL (VOL CL), diâmetro da cavidade cística (DIAM CC), volume da cavidade cística (VOL CC) e volume da massa luteal (VOL ML) nas receptoras no dia da inovulação dos embriões

Variáveis	CONC P_4	CONC E_2	DIAM CL	VOL CL	DIAM CC	VOL CC	VOL ML
CONC P_4	1,00	0,19	0,46*	0,36*	0,13	0,29	0,37*

* $p < 0,05$ CONC P_4 concentração plasmática de progesterona; CONC E_2 concentração plasmática de estradiol; DIAM CL diâmetro do CL; VOL CL volume do CL; DIAM CC diâmetro da cavidade cística; VOL CC volume da cavidade cística; VOL ML volume da massa luteal

A Tabela 4 apresenta a frequência das novilhas receptoras ($n = 57$) segundo o volume da massa luteal (cm^3) ao exame ultrassonográfico e a concentração plasmática de P_4 (ng/mL). Dentre os animais com volume da massa luteal $< 2,0 cm^3$, foi constatada diferença entre a porcentagem de animais que apresentaram concentração plasmática de $P_4 < 5,0$ (83,3%) e aqueles que apresentaram $\geq 5,0$ a $< 10,0$ (16,7%) e $\geq 10,0$ (0) ng/mL ($p = 0,025$)

conforme o Teste Exato de Fisher. Esse achado corrobora com a ideia de que CL com volume de massa luteal menor produz menos progesterona.

Presença do folículo dominante e produção de 17β estradiol

Das sessenta receptoras de embriões, 55 (91,7%) apresentaram um folículo dominante,

três (5,0%) dois folículos e em dois (3,3%) foram identificados vários folículos pequenos (diâmetros $\cong 5,0$ mm) ao exame ultrassonográfico realizado no dia da involução. O diâmetro médio dos folículos foi de $11,4 \pm 2,2$ mm. Em 37/55 animais, o folículo dominante localizou-se no ovário direito (63,8%) e nos 21/55 no ovário esquerdo (36,2%).

Em 41 receptoras (70,7%), visualizou-se o folículo no mesmo ovário que continha o CL e em 17 (29,3%) no ovário contralateral. SPELL et al. (2001) também verificaram predominância do folículo dominante no ovário direito (59,0%), porém a presença deste e do CL em ovários opostos foi maior (56,0%).

TABELA 4. Distribuição da frequência das novilhas receptoras (n = 57) segundo o volume da massa luteal (cm³) e concentração plasmática de progesterona (ng/mL)

Volume da massa luteal (cm ³)	Concentração plasmática de progesterona (ng/mL)							
	<5,00		$\geq 5,00$ a <10,00		$\geq 10,00$		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
< 2,00	20	83,33 ^a	4	16,67 ^b	0	0 ^b	24	100,00
$\geq 2,00$ a < 4,00	9	47,37 ^a	8	42,11 ^a	2	10,53 ^a	19	100,00
$\geq 4,00$ a < 6,00	4	57,14 ^a	2	28,57 ^a	1	14,29 ^a	7	100,00
$\geq 6,00$	2	28,57 ^a	3	42,86 ^a	2	28,57 ^a	7	100,00

Letras a e b nas linhas diferem estatisticamente (p = 0,025)

A concentração plasmática média de $17\beta E_2$ no dia da involução dos embriões foi de $4,5 \pm 6,0$ pg/mL (n= 60). Para as receptoras nas quais foi confirmada a prenhez, a taxa média deste hormônio foi de $5,3 \pm 7,4$ pg/mL e para aquelas que apresentaram diagnóstico negativo foi de $3,9 \pm 4,9$ pg/mL. Não houve influência da concentração plasmática de $17\beta E_2$ nas porcentagens de prenhez (p= 1,0) segundo o Teste Exato de Fisher.

Relatos na literatura sobre a concentração plasmática de $17\beta E_2$ em vacas receptoras de embrião no dia da involução são pouco descritos. MANN et al. (1995) obtiveram nível plasmático de $17\beta E_2$ no oitavo dia do ciclo de 1,1 e 1,3 pg/mL para as fêmeas com diagnóstico de gestação positivo e negativo respectivamente. Valor semelhante foi descrito por WEHRMAN et al. (1997), em estudo com vacas receptoras de embrião no sexto dia do ciclo ($1,8 \pm 0,2$ pg/mL). HIRAKO et al. (2002) acompanharam o perfil hormonal dos estrógenos durante a gestação de vacas Holandesas que receberam um ou dois blastocistos produzidos *in vitro* e constataram que em média as concentrações de todos os estrógenos situaram-se entre 1,0 e 6,0 pg/mL até o dia 50 da gestação. Contudo, a

estrona e o $17\beta E_2$ permaneceram em níveis basais até o dia 80 da gestação.

No presente experimento, o nível plasmático de $17\beta E_2$ no dia da involução dos embriões foi mais elevado do que os descritos na literatura. Segundo BRYNER et al. (1990) e BRUEL et al. (1993), a concentração elevada de $17\beta E_2$ na fase folicular prejudica a fertilização, implantação, e o desenvolvimento embrionário por produzir um ambiente intrauterino inadequado. Além disso, concentração baixa de P_4 e alta de $17\beta E_2$ durante a regulação da maturação oocitária e preparação da tuba uterina e do útero para a manutenção do embrião pode decrescer as taxas de prenhez (BRYNER et al., 1990; BRUEL et al., 1993).

Contratilidade uterina no momento da involução

Das fêmeas avaliadas quanto à contratilidade do útero no momento da involução, 49/60 (81,7%) apresentaram útero flácido (grau 1), 11/60 (18,3%) útero em um estágio intermediário entre flácido e contraído (grau 2) e 0/60 útero contraído (grau 3). Com relação à prenhez segundo os graus 1 e 2, os índices foram de 47,6% (20/42) e 81,8%

(9/11) respectivamente. Estes índices foram diferentes ($p < 0,05$) segundo o Teste do Qui-quadrado, indicando que receptoras cujos úteros se classificaram como grau 2 (intermediário) apresentaram os melhores resultados de gestação.

No experimento realizado por FERNANDES (1999), o índice de gestação obtido nos animais que apresentaram útero de difícil manipulação (31,0%) **mostrou-se** inferior aos resultantes das inovulações cuja manipulação uterina foi fácil ou regular (58,8 e 45,6% respectivamente). Segundo esse autor, em inovulações não cirúrgicas, variáveis como tempo necessário para transpor a cérvix, possibilidade de inoculação de microorganismos no lúmen uterino, local de deposição do embrião e grau de lesão interna do útero, afetam a taxa de gestação. Além da experiência do operador, estas variáveis podem ser influenciadas pela contenção das receptoras no momento da inovulação, por cuidados com higiene, características morfológicas da cérvix e manipulação uterina durante o processo.

CONCLUSÕES

Os diâmetros e volumes do CL e da cavidade cística e o volume da massa luteal não interferiram nas taxas de prenhez. A palpação transretal foi satisfatória para distinguir CL médios de grandes, porém perdeu a sensibilidade ao avaliar CL pequenos. As concentrações plasmáticas de P_4 e $17\beta E_2$, no dia da inovulação dos embriões, não interferiram nas taxas de gestação das receptoras. As receptoras cujos úteros foram classificados como grau 2 (intermediário) apresentaram os melhores resultados de gestação.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pelo auxílio financeiro, e às propriedades Casa Branca Agropastoril-Fazenda Água Limpa e Fazenda Santa Rosa, pela disponibilização dos animais.

REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, D. T. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, v. 93, p. 7-24, 1993.

BATTOCHIO, M.; GAVIA, G.; MOLLO, A.; VERONESI, M. C.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. *Theriogenology*, v. 51, p. 1059-1069, 1999.

BRUEL, K. F.; LEWIS, P. E.; SCHRICK, F. N.; LISHMAN, A. W.; INSKEEP, E. K.; BUTCHER, R. L. Factors affecting fertility in the postpartum cow: role of the oocyte and follicle in conception rate. *Biology of Reproduction*, v. 48, p. 655-661, 1993.

BRYNER, R. W.; WINDER, M. G.; LEWIS, P. E.; INSKEEP, E. K.; BUTCHER, R. L. Changes in hormonal profiles during the estrous cycle in old lactating beef cows. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 7, p. 181-190, 1990.

DEM CZUK, E.; KOZICKI, L. E.; PONTELLI, E. S.; SALLES, J. O. Transferência de embrião em vacas da raça Simental na região noroeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 35, n. 4, p. 174-177, 1998.

FERNANDES, C. A. C. **Efeito do tratamento com hormônio folículo estimulante (FSH) sobre a taxa de gestação de novilhas mestiças usadas como receptoras de embriões.** Viçosa, 1994. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.

FERNANDES, C. A. C.; VELÁSQUEZ, L. F. U. Características do corpo lúteo e taxa de gestação de receptoras de embrião. *Archivos de Reproduction Animal*, v. 1, n. 2, p. 28-31, 1997.

FERNANDES, C. A. C. Inovulações não cirúrgicas e taxa de gestação de receptoras de embrião. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 3, p. 263-266, 1999.

GALIMBERTI, A. M.; FONSECA, F. A.; ARAÚJO, M. C. C.; COSTA, E. P.; FREITAS, C.; GUIMARÃES, J. D.; FERREIRA, A. M. Taxa de gestação e níveis plasmáticos de progesterona, em receptoras de embrião bovino, tratadas com busserelina após a inovulação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, n. 2, p. 353-359, 2001.

GRYGAR, I.; HUDLAC, E.; DOLEZEL, R.; NEDBALKOVA, J. Volume of luteal tissue and concentration of serum progesterone in cows bearing homogeneous corpus luteum with cavity. *Animal Reproduction Science*, v. 49, p. 77-82, 1997.

HASLER, J. F.; MCCAULEY, A. D.; LATHROP, W. F.; FOOTE, R. H. Effect of donor-embryo-recipient interactions

- and pregnancy rate in a large-scale-bovine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 139-168, 1987.
- HIRAKO, M.; TAKAHASHI, T.; DOMEKI, I. Peripheral changes in estrone sulfate concentration during the first trimester of gestation in cattle: comparison with unconjugated estrogens and relationship to fetal number. **Theriogenology**, v. 57, p. 1939-1947, 2002.
- JAINUDEEN, M. R., HAFEZ, E. S. E. Bovinos e bubalinos. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 1995. p. 319-334.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 1-5, 1995.
- PENNA, V. M. Núcleos MOET em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 4, p. 82-104, 1993.
- PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v. 29, p. 21-37, 1987.
- RIBADU, A. Y.; WARD, W. R.; DOBSON, H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. **Veterinary Record**, v. 135, p. 452-457, 1994.
- SAS Institute Inc.. **SAS user's guide: statistics**. Version 6.12 Cary, N.C., 1996.
- SEGERSON, E. C.; HNASSEN, T. R.; LIBBY, D. W. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 59, p. 1026-1046, 1984.
- SILVA, J. C.; COSTA, L. L.; SILVA, J. R. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 58, p. 51-59, 2002.
- SILVA, R. C. P.; LUERSEN, F.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. Transferência de embriões em tempo fixo: incremento no aproveitamento de receptoras através da avaliação ultra-sonográfica. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 31, p. 584, 2003.
- SOLANO, R. F.; SOUSA, A. O.; PEREIRA, S. H.; SOLANO, G.; ZAYNETTE, T. F.; CHOW, L. A. Avaliação das perdas embrionárias em receptoras através do retorno ao estro, ultra-sonografia e mensuração dos níveis plasmáticos de progesterona. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 31, p. 600, 2003.
- SPANO, A. A.; SILVA, A. A. M. R. Níveis plasmáticos de progesterona durante o ciclo estral e na fase inicial da gestação em bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*). **Ars Veterinária**, v. 8, p. 131-141, 1992.
- SPELL, A. R.; BEAL, W. E.; CORAH, L. R.; LAMB, G. C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 287-297, 2001.
- SPRECHER, D. J.; NEBEL, R. L.; WHITMAN, S. S. The predictive value, sensitivity and specificity of palpation per rectum and transrectal ultrasonography for the determination of bovine luteal status. **Theriogenology**, v. 31, p. 1165-1172, 1989.
- TOM, J. W.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. **Theriogenology**, v. 49, p. 1345-1352, 1998.
- VIANA, J. H. M. **Avaliação ultra-sonográfica de estruturas ovarianas em doadoras e receptoras de embrião**. Viçosa, 1996. 120 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Zootecnia, Viçosa, MG. Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.
- VIANA, J.H.M.; TORRES, C.A.A.; FERNANDES, C.A.C.; FERREIRA, A.M. Relação do diâmetro folicular com a resposta à sincronização de estro em novilhas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, p.15-20, 1997.
- VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 251-256, 1999.
- WEHRMAN, M. E.; ROBERSON, M. S.; CUPP, A. S.; KOJIMA, F. N.; STUMPF, T. T.; WERTH, L. A. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 β -estradiol and increases conception in cows. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 214-220, 1993.
- WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E.; MELVIN, E. J.; KOJIMA, F. N.; KINDER, J. E. Development of a persistent ovarian follicle and associated elevated concentrations of 17 β estradiol preceding ovulation does not alter the pregnancy rate after embryo transfer in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1413-1421, 1997.
- WILTBANK, M. C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid cycle corpus luteum function. **Journal Animal Science**, v. 72, p. 1873-1883, 1994.