



Concentração plasmática de progesterona durante o ciclo estral de Jumentas (*Equus asinus*) com ovulações simples e duplas¹

[Plasma concentration of progesterone during the estrous cycle in Jennies (*Equus asinus*) with single and double ovulations]

"Artigo Científico/Scientific Article"

JC Conceição^{A(*)}, LM Freitas Neto^B, CR Aguiar Filho^B, GHM Araújo^A,
JV Oliveira^C, CC Bartolomeu^B, E Oba^A, C Meira^A

^ADepartamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Rubião Júnior, 18618-000, Botucatu-SP/Brasil.

^BLaboratório de Biotécnicas Reprodutivas do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE/Brasil.

^CPólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico da Alta Mogiana – E.E.Z., Colina-SP/Brasil.

Resumo

Dez ciclos estrais de sete jumentas da raça Marchador Brasileiro localizadas na Estação Experimental de Zootecnia – Colina no Estado de São Paulo foram monitorados e a concentração plasmática de progesterona (P4) foi determinada por meio do método de Radioimunoensaio (RIA) em fase sólida, utilizando "Kits" comerciais (DPC). Para o cálculo da concentração de P4 e do diâmetro do corpo lúteo (CL) foram excluídos os animais que apresentaram ovulação no diestro. Os CL formados a partir de ovulações simples e duplas apresentaram diâmetros de $26,2 \pm 4,4$ e $22,1 \pm 2,7$ mm, respectivamente, representando 66,1% e 64,1% do tamanho do folículo pré-ovulatório. A presença de dois CL nos ovários das jumentas que apresentaram ovulações duplas não refletiu em aumento significativo da concentração de P4.

Palavras-chave: equídeo, ovário, corpo lúteo.

Abstract

Ten estrous cycles of seven Machador Brasileiro jennies located at Estação Experimental de Zootecnia – Colina – São Paulo were monitored and the plasmatic progesterone concentration determined by the radioimmunoassay method in solid phase, employing commercial kits (DPC). For progesterone concentration determination and CL diameter there were excluded the animals which presented diestrus ovulations. The corpora lutea formed from single ovulations or double ovulations presented a mean diameter of 26.2 ± 4.4 and 22.1 ± 2.7 mm, respectively, which represented 66.1% and 64.1% of the preovulatory follicle diameter. The presence of two CLs from double ovulations was not reflected by a significant increase on progesterone concentrations.

Key-words: equidae, ovary, corpus luteum.

Introdução

A progesterona (P4) é produzida, principalmente, no ovário pelas células do corpo lúteo (CL), pela glândula adrenal e pela placenta nos animais gestantes. A

determinação de sua concentração na circulação periférica permite conhecer a atividade ovariana durante o ciclo estral e também identificar a prenhez (KNICKERBECKER et al., 1988; ROBERTS,

⁽¹⁾Trabalho extraído da Dissertação de Mestrado da primeira autora apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu.

^(*)Autora para correspondência/Corresponding author (juzuppi@yahoo.com.br).

^(S)Recebido em 12/05/2009 e aceito em 27/08/2009.

1980).

A P4 exerce um efeito inibitório sobre a secreção e liberação pulsátil do GnRH no hipotálamo e consequentemente sobre os hormônios gonadotrópicos da hipófise durante o ciclo estral (PAMELA et al., 1995). Durante a gestação, a P4 desempenha um papel preponderante no estabelecimento da prenhez e na implantação do embrião no útero e do mesmo modo favorece o desenvolvimento da glândula mamária (PEPE e ALBRETCH, 1995).

Durante o ciclo estral ocorre uma extensiva angiogenese no CL (HANSEL; BLAIR, 1996), sendo esta neovascularização essencial para o suprimento do substrato necessário para a biossíntese da P4 e para a secreção de outros hormônios esteróides pelas células luteais. Pode-se assumir que a circulação sanguínea exerça papel vital para o funcionamento apropriado do CL (CARR et al., 1982).

Nesta pesquisa teve-se o objetivo de estudar a concentração de P4 em jumentas, correlacionando-a ao diâmetro do corpo lúteo durante o diestro, e os animais que apresentaram ovulações simples e duplas.

Material e Métodos

Foram avaliados dez ciclos estrais de sete jumentas da raça Marchador Brasileiro pertencentes à Estação Experimental de Zootecnia, localizado no Município de Colina, Estado de São Paulo. Os animais, com idade variando entre oito e dez anos e peso corporal entre 280 e 300 kg apresentavam bom estado geral de saúde e históricos reprodutivos sem alteração.

Os animais foram mantidos em piquetes de 200 m², mas recebiam feno de coast-cross (*Cynodon dactylon*), ração comercial e suplementado com sal mineral, além de água à vontade.

O diâmetro do CL foi registrado desde o dia da ovulação até o momento em que a visualização nítida dos seus limites foi possível. A medição da estrutura foi feita pela média entre os diâmetros maiores e

intermediários, no sentido vertical e horizontal.

As amostras de sangue foram diariamente colhidas por meio de punção da veia jugular em tubos heparinizados, desde a detecção de um folículo ≥ 30 mm até a detecção da ovulação referência (D0). A partir de então, as amostras continuaram sendo colhidas uma vez por dia até dois dias após a ovulação subsequente. Imediatamente após a colheita, as amostras foram centrifugadas a 900 G por cinco minutos e o plasma armazenado a -20°C para posterior determinação da concentração de P4.

A concentração plasmática de P4 foi determinada por meio do método de Radioimunoensaio (RIA) em fase sólida, utilizando “Kits” comerciais (DPC). Para o cálculo da concentração de P4 e diâmetro do CL foram excluídos os animais que apresentaram ovulação no diestro.

A precisão intra-ensaio foi determinada por amostras constituídas de um “pool” de plasmas, sendo que o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 9,1%. O “pool” de plasmas foi realizado três vezes durante o ensaio, a cada 150 amostras dosadas.

O período progesterônico foi considerado quando a concentração de P4 se manteve >1 ng/mL e o período estrogênico quando a concentração de P4 esteve <1 ng/mL.

Para avaliação estatística das concentrações diárias de P4 e do diâmetro de CL utilizou-se o teste-t não pareado, todos a 5% de probabilidade de erro. O método de Regressão Linear foi utilizado para correlacionar a concentração de P4 comparado ao diâmetro do CL nas ovulações simples e duplas. A Regressão Quadrática foi utilizada para ajustar a comparação entre de P4 em função do tempo.

Resultados

O perfil da concentração plasmática de P4 (Figura 1) e a duração da fase progesterônica ou estrogênica foram similares para os ciclos com uma ou duas ondas foliculares maiores ($P < 0,05$).

A concentração de P4 para ovulações simples (n = 5) e duplas (n = 3) foi >1ng/ml no primeiro dia pós-ovulação, aumentando gradativamente até o sexto dia do ciclo, quando se verificou, a partir desse dia, um

platô que se manteve até o 14º dia pós-ovulação. Após o 14º dia, a concentração de P4 diminuiu rapidamente, atingindo níveis compatíveis à fase estrogênica (<1ng/mL), três dias mais tarde (Figura 2).

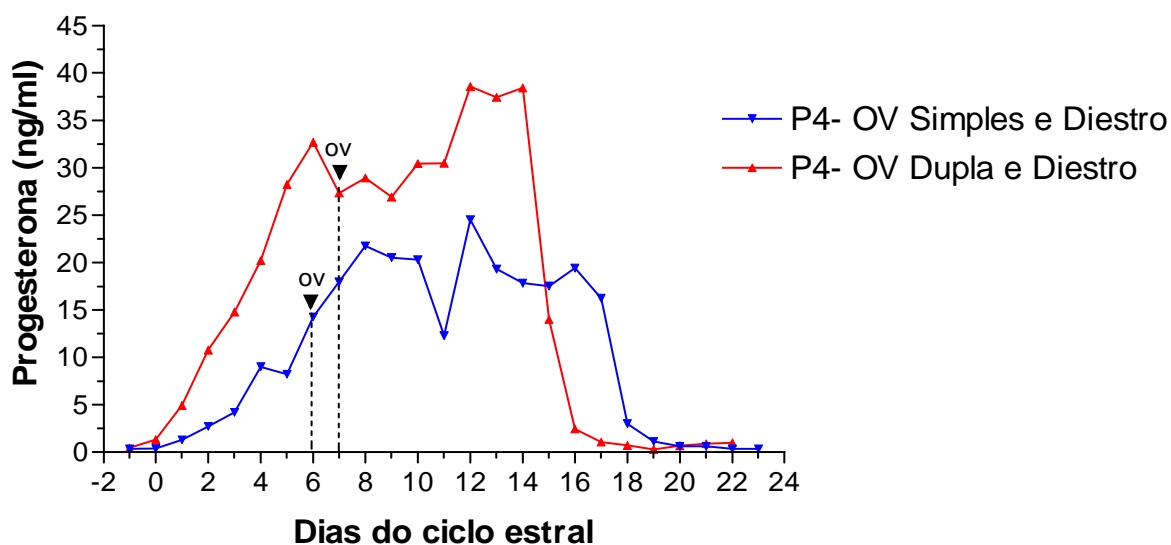


Figura 1 - Concentração plasmática de progesterona (P4) ao longo de dois ciclos estrais, cujos animais apresentaram ovulação (ov) durante o diestro. As setas indicam os dias que foram detectadas as ovulações de diestro.

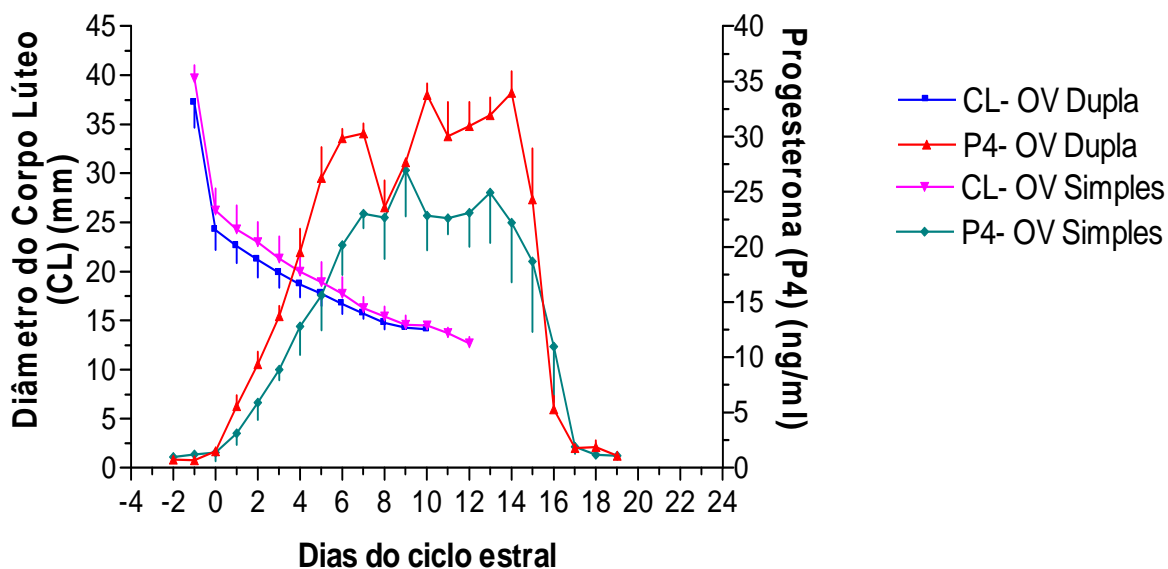


Figura 2 - Diâmetro do CL e concentração plasmática de progesterona (P4) em jumentas com ovulações simples (n = 5) e duplas (n = 3), observada a partir da ovulação referência (D0).

No caso de ovulações simples ou duplas, o diâmetro médio do CL foi $26,22 \pm 4,44$ mm e $22,08 \pm 2,67$ mm, representando 66,1% e 64,1% do diâmetro do folículo pré-ovulatório, respectivamente. Quando comparados dia-a-dia, o diâmetro médio do CL não apresentou diferença entre animais com ovulações simples ou duplas e a visualização dos mesmos pela imagem ultrassonográfica foi possível, em média, até $12,25 \pm 2,5$ dias para ovulações simples e $10,33 \pm 1,75$ dias para ovulações duplas ($P > 0,05$). Em alguns casos, o CL manteve-se visível até o 14^o dia pós-ovulação.

Foi observada correlação linear negativa entre a concentração de P4 e o diâmetro do CL, tanto para ovulações simples ($R = -0,86$) quanto para duplas ($R = -0,73$). Ao ajustar a regressão quadrática para a concentração plasmática de P4 em função do tempo, observou-se que esta equação apresentou maior coerência em relação ao seu papel ao longo do ciclo estral. Para as ovulações simples, a equação quadrática foi $y = -0,3185x^2 + 5,6408x - 1,7196$ ($R^2 = 0,91$) e para as ovulações duplas foi $y = -0,4296x^2 + 6,9364x - 0,4552$ ($R^2 = 0,90$). Nos dois casos, os resultados apresentaram correlação positiva entre a concentração plasmática de P4 em função do tempo.

O diâmetro do CL nas ovulações simples e duplas até o dia de sua última detecção está apresentado na Figura 2.

Nos dez ciclos estrais estudados, a duração média do estro foi de $5,9 \pm 1,37$ dias, do diestro foi de $18,2 \pm 1,62$ dias e o intervalo interovulatório foi de $24,1 \pm 2,23$ dias.

Considerando a concentração plasmática de P4, >1 ng/mL como sendo a fase progesterônica e <1 ng/mL a fase estrogênica, a duração média foi de $17,9 \pm 1,39$ e $5,9 \pm 2,02$ dias, respectivamente.

Em todos os ciclos ($n = 10$), os sete animais, quando em cio, manifestaram receptividade ao macho durante a rufiação, sendo que em nove (90%), a concentração plasmática de P4 encontrava-se <1 ng/mL. Uma jumenta apresentou níveis de P4

>1 ng/mL nos dois dias que antecederam a ovulação referência (2,2 e 3,8ng/ml, nos dias -2 e -1, respectivamente), bem como nos dois dias anteriores à ovulação subsequente (1,1ng/mL nos dias -2 e -1), porém, não interferiu na demonstração de receptividade ao macho.

Discussão

As concentrações plasmáticas de P4 detectadas neste estudo, após a ovulação, foram similares ao documentado em outros estudos (MEIRA et al., 1995; NAGY et al., 2004).

Pouco antes da ovulação observou-se um ligeiro aumento na concentração de P4 e é possível que este aumento seja devido à luteinização das células da granulosa. Nas éguas, o folículo pré-ovulatório, pouco antes da ruptura folicular, apresenta um aumento nos níveis de P4, que por sua vez, estimula a síntese de enzimas colagenases que exercem papel importante no processo ovulatório (MCKINNON e VOSS, 1993; HAFEZ, 1995). Outra espécie doméstica que também apresenta um aumento nos níveis plasmáticos de P4 antes da ovulação é a cadela. Segundo Noakes et al. (2001), este aumento ocorre de 60 a 70 horas antes da ovulação devido à luteinização das células da granulosa no folículo pré-ovulatório.

A relação existente entre o diâmetro do folículo pré-ovulatório e o diâmetro atingido pelo CL correspondente observado no presente estudo foi similar ao descrito na espécie equina, sendo esses valores 66,1% e 64,1% para ovulações simples e duplas, comparadas a 50 e 75% respectivamente, como relatado para a espécie equina. A presença de dois CL comparados às ovulações simples refletiu em um ligeiro aumento nas concentrações plasmáticas de P4, porém os níveis de P4 apresentam-se menores do que o dobro das ovulações simples. Estes achados são condizentes com o que se observa na espécie equina (GINTHER e BERGFELT, 1992).

As duas ovulações detectadas durante

o diestro foram observadas em dois ciclos diferentes, sendo que em um constatou-se ovulação simples e no outro, ovulação dupla. A presença de duas ovulações acompanhadas por uma ovulação no diestro foi responsável pelo aumento nas concentrações plasmáticas de P4, onde a presença de três CL, não interferiu no prolongamento da fase luteínica.

A visualização do CL pela imagem ultra-sonográfica foi detectada durante um período de tempo similar ao previamente documentado na espécie equina, assim como o relatado em jumentas (GINTHER e BERGFELT, 1992 DADARWAL et al., 2004). Tais eventos sugerem uma similaridade na estrutura luteal em ambas as espécies.

O aumento gradativo da concentração de P4 observado, desde a ovulação até atingir um platô após o 7º dia, é compatível com o relato dos estudos realizados por Bollwein et al (2002), os quais reportaram alta correlação entre as mudanças cíclicas do fluxo sanguíneo para o CL e os níveis plasmáticos de P4. Ambas as variáveis aumentaram notavelmente nos primeiros dias pós-ovulação, atingindo a circulação máxima para o CL por volta do 5º dia e a concentração máxima de P4 no 7º dia.

Os resultados permitem concluir que não existe diferença nas concentrações de P4 das jumentas que apresentam ovulações simples ou duplas e que as concentrações de progesterona aumentam gradativamente a partir da ovulação, permanecendo assim até atingir um platô após o sétimo dia da ovulação.

Referências

BOLLWEIN, H. et al. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v.65, p.2043-2051, 2002.

CARR, B.R. et al. The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the corpus luteum. **Fertility and Sterility**, v.38, p.303-311, 1982.

DADARWAL, D. et al. Ultrasonographic evaluation of uterine involution and postpartum

follicular dynamics in French Jennies (*Equus asinus*). **Theriogenology**, v.62, p.257-264, 2004.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Ultrasonic characterization of follicular waves in mares without maintaining identity of individual follicles. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.12, n.6, p.349-354, 1992.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. Philadelphia: Lea & Febiger, 6. ed.; 1995, 582p.

HANSEL, W.; BLAIR, R.M. Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. **Theriogenology**, v.45, p.1267-1294, 1996.

KNICKERBECKER, J.J. et al. Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. **Domestic Animal Endocrinology**, v.5, p.91-107, 1988.

MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, ed. Williams & Wilkins, 1993, 1115p.

MEIRA, C. et al. Study of the cycle in Donkeys (*Equus asinus*) using ultrasonography and plasma progesterone concentrations. **Biology of Reproduction, Monography**, v.1, p.403-410, 1995.

NAGY, P. et al. Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares. **Theriogenology**, v.61, n.2-3, p.203-214, 2004.

NOAKES, D.E. et al. **Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics**. W.B. Saunders; 8. ed. 2001. 850p.

PAMELA J.S. et al. Pulsatile gonadotropin secretion determined by frequent sampling from the intercavernous sinus of the mare, possible modulatory role of progesterone during luteolysis. **Biology of Reproduction**, v.53, p.438-446, 1995.

PEPE, G.J.; ALBRETCH, E.D. Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. **Endocrine Review**, v.16, n.5, p. 608-648, 1995.

ROBERTS, S.J. Gestation and pregnancy diagnosis in the mare. In: DAVID, M.A. **Current therapy in Theriogenology, Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals**. WB Saunders: London, 1980. pp. 736-745.