

Laura Ribeiro Vargas

MORFOLOGIA E GRÂNULOS CITOPLASMÁTICOS DO
CORPO LÚTEO DA VACA ANELORADA (*Bos taurus indicus*)
GESTANTE E NÃO GESTANTE

Dissertação apresentada na Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal
Orientador: Antônio de Pinho Marques
Júnior

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2014

V297m Vargas, Laura Ribeiro, 1989-
Morfologia e grânulos citoplasmáticos do corpo lúteo da vaca anelorada (*Bos taurus indicus*) gestante e não gestante / Laura Ribeiro Vargas. – 2014.

56 p. : il.

Orientador: Antônio de Pinho Marques Júnior
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Vaca – Reprodução – Teses. 2. Corpo lúteo – Teses. 3. Histologia veterinária – Teses. 4. Ovários – Exames – Teses. I. Marques Júnior, Antônio de Pinho. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.208 926

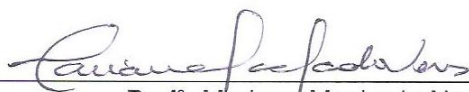
Dissertação defendida e aprovada em 28 de fevereiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Antônio de Pinho Marques Júnior
Presidente - Orientador



Prof. Leonardo Lara e Lanna
Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - IFNMG



Profª. Mariana Machado Neves
Universidade Federal de Viçosa



Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho
Escola de Veterinária - UFMG

Dedico esta dissertação aos meus
Pais, Hélio e Marta, aos meus irmãos, Hugo e Laís,
e ao André.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Hélio e Marta, pelo amor e por sempre me apoiarem e acreditaram em tudo o que faço;

Aos meus irmãos, Hugo e Laís, pela torcida;

Ao André pelo companheirismo, carinho e por toda a ajuda;

Ao meu orientador, Professor Antônio de Pinho Marques Júnior, por ter me ensinado o que é a academia e me orientado com grande sabedoria e experiência, pela oportunidade da realização deste trabalho e por sua amizade, atenção e carinho;

À Carolina Rezende, por todo o apoio e pela participação em todas as coletas de material no frigorífico;

À Patrícia pelos conselhos e apoio fundamental na realização da pesquisa e ao Rafael, pela ajuda e convívio agradável;

À professora Mariana Machado Neves e suas alunas, Stephanie e Mariana, da Universidade Federal de Viçosa por ter disponibilizado o laboratório, por toda a contribuição à pesquisa e pela atenciosa recepção em Viçosa;

Às minhas amigas, pelo companheirismo e amizade de muitos anos;

Às amigas da turma do mestrado, Ana Carolina, Cíntia e Mayara, pelo tempo de convívio muito agradável;

Ao frigorífico Santa Vitória pela cortesia de doação das peças para a realização do experimento, e aos funcionários;

À Escola de Veterinária da UFMG, minha segunda casa por muitos anos, e seu corpo docente, pela oportunidade de cursar o mestrado;

À Medicina Veterinária, profissão que me encanta e estimula a sempre estudar;

E aos órgãos financiadores da pesquisa, CAPES, FAPEMIG e CNPq.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Hipótese	15
1.2 Objetivos.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Ciclo estral bovino	16
2.2 Dinâmica folicular do ovário	17
2.3 Corpo lúteo: luteogênese e luteólise	18
2.3.1 <i>Volumetria dos componentes do corpo lúteo</i>	21
2.3.2 <i>Grânulos citoplasmáticos em células lúteas</i>	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Local do experimento e obtenção das amostras	25
3.2 Avaliação macroscópica e processamento do corpo lúteo	26
3.2.1 <i>Pré-fixação e avaliação macroscópica</i>	26
3.2.2 <i>Processamento histológico</i>	26
3.3 Avaliação microscópica.....	27
3.3.1 <i>Descrição histológica do corpo lúteo</i>	27
3.3.2 <i>Proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo</i>	28
3.3.3 <i>Diâmetro nuclear médio de células lúteas</i>	28
3.3.4 <i>Avaliação de grânulos citoplasmáticos de células lúteas</i>	28
3.4 Análise estatística	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Avaliação macroscópica.....	29
4.2 Descrição histológica do corpo lúteo.....	30
4.3 Proporção volumétrica do corpo lúteo	31
4.4 Diâmetro nuclear médio de células lúteas.....	32
4.5 Análise de grânulos citoplasmáticos em células lúteas.....	33
5. CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXOS	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Frequência de corpos lúteos nos ovários direito e esquerdo de vacas Nelore gestantes e não gestantes 29
- Tabela 2** - Características morfológicas do corpo lúteo de vacas Nelore gestantes e não gestantes..... 29
- Tabela 3** - Médias e desvios-padrão da proporção volumétrica do corpo lúteo de vacas Nelore gestantes e não gestantes 32
- Tabela 4** - Médias e desvios-padrão do diâmetro nuclear (μm) de células lúteas maiores e menores de vacas Nelore gestantes e não gestantes. 33
- Tabela 5** - Porcentagem de células lúteas maiores e menores com grânulos no citoplasma, de um total de duzentas células contadas, no corpo lúteo de vacas Nelore gestantes e não gestantes 35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Feto bovino: medição do comprimento ápico-caudal. 25
- Figura 2** - Esquema de cortes no corpo lúteo após a pré-fixação com formalina neutra tamponada a 10%. 26
- Figura 3** - Vaca Nelore. Fotomicrografias de corpo lúteo de animal gestante, mostrando em A) tecido lúteo aos 218 dias de gestação (3^o terço), evidenciando vasos sanguíneos (setas) e fibroblastos (cabeça de seta) e B) aos 110 dias de gestação (2^o terço), evidenciando células lúteas maiores (M), células lúteas menores (m), células endoteliais (setas) e fibroblastos entre as células lúteas (cabeça de seta). Coloração: H.E. 36
- Figura 4** - Vaca Nelore. Fotomicrografias de corpo lúteo de animal gestante, mostrando em A) tecido lúteo (CL) com septo de tecido conjuntivo (seta), aos 218 dias de gestação (3^o terço); em B) corpo lúteo no primeiro terço de gestação, destacando arteríolas em meio aos septos de tecido conjuntivo (seta); C) Tecido lúteo aos 133 dias de gestação (2^o terço), apresentando células lúteas maiores (M) e menores (m) e septo de tecido conjuntivo (TC) contendo pequenos vasos sanguíneos; D) Tecido lúteo aos 110 dias de gestação (2^o terço), contendo vasos sanguíneos (VS). Coloração: Tricrômico de Gomori. 37
- Figura 5** - Vaca Nelore. Fotomicrografias de corpo lúteo animal gestante, mostrando em A) tecido lúteo de gestação inicial (1^o terço) com células lúteas maiores (M) e menores (m), vasos sanguíneos (seta) e ausência de grânulos no citoplasma das células lúteas e em B) tecido lúteo aos 218 dias de gestação (3^o terço) com células lúteas maiores (M) e menores (m) e grânulos citoplasmáticos em células lúteas maiores (seta). Coloração: Tricrômico de Gomori. 38
- Figura 6** - Vaca Nelore. Fotomicrografia de corpo lúteo de animal gestante. Tecido lúteo aos 218 dias de gestação (3^o terço) com células lúteas maiores (M) e menores (m), grânulos citoplasmáticos em células lúteas maiores (seta) e fibroblastos circundando células lúteas (cabeça de seta). Coloração: Tricrômico de Gomori... 39
- Figura 7** - Vaca Nelore. Fotomicrografia de corpo lúteo de um animal aos 218 dias de gestação (3^o terço) mostrando células lúteas maiores (M) com citoplasma bem delimitado e mais claro que o das células lúteas menores (m) e vasos sanguíneos (seta). Coloração: Azul de toluidina. 40
- Figura 8** - Vaca Nelore. Fotomicrografia de corpo lúteo animal aos 257 dias de gestação (3^o terço), evidenciando grânulos citoplasmáticos em células lúteas maiores corados em vermelho (seta). Coloração: Xylidine Ponceau. 40
- Figura 9** - Vaca Nelore. Fotomicrografias de corpo lúteo de animal gestante, mostrando em A) tecido lúteo aos 303 dias de gestação (3^o terço) e em B) aos 218 dias de gestação (3^o terço), com células lúteas contendo grânulos citoplasmáticos (seta); Coloração: Azul de bromofenol. 41

RESUMO

Objetivou-se avaliar a proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo, o diâmetro nuclear médio de células lúteas e a distribuição de células lúteas com grânulos citoplasmáticos no corpo lúteo de animais Nelore ao longo da gestação e em animais não gestantes. Foram coletados ovários com corpos lúteos de 24 animais abatidos no frigorífico Santa Vitória (Contagem-MG). Os ovários foram divididos em quatro grupos de seis: animais em gestação de até 90 dias (1º terço); em gestação entre 91 e 180 dias (2º terço); em gestação entre 181 e 270 dias (3º terço); e não gestantes. A idade gestacional foi determinada a partir da medida do comprimento ápico-caudal do feto. Os corpos lúteos foram processados pela metodologia de rotina para inclusão em paraplast e foram feitas as colorações Hematoxilina e eosina, Tricrômico de Gomori, Azul de toluidina, Xylidine Ponceau e Azul de bromofenol para avaliação em microscópio de luz. Na proporção volumétrica do corpo lúteo os constituintes avaliados foram citoplasma e núcleo de células lúteas, tecido conjuntivo e fibroblastos, células endoteliais e pericitos e vasos sanguíneos. A frequência de corpos lúteos no ovário direito foi de 79,16% (19/24). A proporção volumétrica de citoplasma de células lúteas reduziu de 46,13±2,84% para 37,88±3,50% e a de núcleo de células lúteas reduziu de 9,16±1,03% para 6,21±1,02%, do primeiro para o segundo terço. A proporção de tecido conjuntivo e fibroblastos aumentou de 20,93±5,39% no primeiro terço, para 34,04±4,17%, no segundo terço. O diâmetro nuclear de células lúteas maiores aumentou de 23,66±1,73% no primeiro terço, para 26,27±1,33% no terceiro, enquanto o diâmetro nuclear das células menores não apresentou diferença entre grupos. Grânulos citoplasmáticos foram observados apenas em células maiores. A quantidade de células maiores com grânulos aumentou significativamente de 2,33±1,94% no primeiro terço, para 25,50±20,34% no segundo.

Palavras-Chave: Nelore, corpo lúteo, histologia, grânulos citoplasmáticos.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the volumetric proportion of the *corpus luteum*, the mean nuclear diameter of lutein cells and the distribution of lutein cells with cytoplasmic granules in the *corpus luteum* throughout pregnancy, and in cyclic Nelore cows. Twenty four ovaries with *corpus luteum* were collected in Santa Vitória slaughterhouse (Contagem-MG). The ovaries were divided into four groups of six: animals until 90 days of pregnancy (1st third), animals with gestation between 91 and 180 days (2nd third), animals with gestation between 181 and 270 days (3rd third) and cyclic animals. The *corpus luteum* were processed for inclusion in paraplast. The tissues were stained in Hematoxylin-eosin, Gomori's Trichrome, Toluidine blue, Bromophenol blue and Xylidine Ponceau for analysis in light microscope. In volumetric proportion the constituents analyzed were: lutein cells cytoplasm and nucleus, connective tissue and fibroblasts, endothelial cells and pericyte and blood vessels. The frequency of *corpus luteum* in the right ovary was 79,16% (19/24). The volumetric proportion of lutein cells cytoplasm decreased from 46,13±2,84% to 37,88±3,50% and the volumetric proportion of nucleus decreased from 9,16±1,03% to 6,21±1,02% between the first and the second third of pregnancy. The amount of connective tissue and fibroblasts significantly increased throughout gestation, with 20,93±5,39% on first third and 34,04±4,17% on second. An increase in the nuclear diameter of large lutein cells was observed between first (23,66±1,73%) and last third (26,27±1,33%) of pregnancy, and the nuclear diameter of small lutein cells was not different between groups. Cytoplasmic granules were found only in the large luteal cells. The amount of lutein cells with granules increased throughout gestation, but significant difference was observed only between the first (2,33±1,94%) and second third (25,50±20,34%).

Key-words: Nelore cow, *corpus luteum*, histology, cytoplasmic granules.

1. INTRODUÇÃO

A demanda da produção carne no Brasil e no mundo aumenta constantemente. Há 50 anos, o consumo de carne no Brasil representava 5,5% do consumo mundial e em 2011 alcançou 13,9%. O rebanho bovino brasileiro é o segundo maior do mundo, sendo composto por aproximadamente 254 milhões de cabeças, o que representa 19,3% do rebanho mundial (USDA, 2013). O Brasil é o maior exportador de carne bovina e o maior rebanho comercial (Brasil, 2006). A conquista por maior espaço no mercado externo depende do aumento da produtividade do rebanho de corte e acompanhamento do cenário mundial.

O rebanho brasileiro é composto por diversas raças de bovinos, as quais podem ser divididas em dois grandes grupos segundo a sua origem: taurinos (*Bos taurus taurus*) e zebuínos (*Bos taurus indicus*). Os zebuínos, originários da Índia, foram introduzidos no Brasil pelos portugueses por volta de 1870. Esses animais apresentam como principais características pele pigmentada e solta, pelos curtos e cupim. São ainda animais resistentes, precoces e adaptados ao clima tropical e sistema extensivo de produção predominante no Brasil, e por isso apresentam boas taxas de produção (Santiago, 1987).

Atualmente existem aproximadamente 136 milhões de zebuínos no rebanho brasileiro. No país, são exploradas quatro raças de zebuínos de origem indiana: Nelore, Gir, Guzerá e Sindi. Essas raças deram origem a outras: Indurasil, Nelore Mocho, Tabapuã e Gir mocho. Dentre essas, o Nelore tem maior relevância na pecuária de corte Nacional, pois é a raça com maior número de criadores e corresponde a 80% do total de zebuínos no Brasil (Santiago, 1987).

Um dos principais fatores da criação de bovinos de corte que influencia na

produtividade da carne é a reprodução animal. A utilização de biotecnias da reprodução, como a inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência de embriões (TE) e produção de embriões *in vitro* (PIV), possibilita a melhora dos índices reprodutivos dos rebanhos. A melhoria dos protocolos utilizados na aplicação dessas técnicas depende do avanço do conhecimento científico na área da fisiologia da reprodução animal.

Originalmente, os protocolos de biotecnias da reprodução não eram ideais para aplicação em zebuínos, pois foram criados com base na fisiologia reprodutiva dos taurinos. Mais tarde, houve a produção de protocolos a partir da fisiologia dos zebuínos, resultando em maior sucesso na produtividade do rebanho nacional. Apesar de os protocolos criados para zebuínos serem muito eficientes, pouco ainda se conhece sobre a morfologia do corpo lúteo. A ampliação do conhecimento sobre o corpo lúteo do Nelore pode aprimorar biotecnias reprodutivas que demandam o controle do corpo lúteo em zebuínos, com o objetivo de melhorar a eficiência reprodutiva do rebanho.

O corpo lúteo é uma glândula endócrina ovariana de caráter transitório, que secreta progesterona durante a fase lútea do ciclo estral e durante a gestação (Rodgers *et al.*, 1988). Nos bovinos, o corpo lúteo é o regulador do ciclo estral e é essencial para manter a gestação até 165 a 180 dias, quando torna-se importante na prevenção do parto prematuro (Estergreen *et al.*, 1967).

Considerando-se a literatura consultada, observa-se que existem diferenças fisiológicas entre o corpo lúteo cíclico e o gestacional na espécie bovina. Contudo, existe pouca informação sobre o corpo lúteo gestacional da vaca Nelore, o que motivou a realização do experimento que resultou na presente dissertação.

1.1 Hipótese

A morfologia e a morfometria dos constituintes do corpo lúteo de animais Nelore (*Bos taurus indicus*) difere no animal gestante, quando se compara os três trimestres da gestação, e quando se compara o animal gestante ao não gestante.

1.2 Objetivos

- Caracterização macroscópica do corpo lúteo de animais Nelore;

- Avaliar a proporção volumétrica de constituintes celulares do corpo lúteo de animais Nelore ao longo da gestação e de não gestantes;

- Comparar médias do diâmetro nuclear de células lúteas de animais Nelore ao longo da gestação e de não gestantes;

- Avaliar a presença e composição de grânulos citoplasmáticos em células lúteas de animais Nelore ao longo da gestação e em animais não gestantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo estral bovino

O ciclo estral é definido como o período entre dois estros de um animal (Binelli *et al.*, 2001). A fêmea bovina é poliestral não sazonal, apresentando ciclos estrais regulares a cada 21 dias durante todo o ano. O ciclo estral bovino é dividido em fase folicular e fase luteal. Na fase folicular observa-se crescimento de folículos e produção predominante de estradiol, enquanto na fase luteal, que ocorre da ovulação até a regressão do corpo lúteo, observa-se produção predominante de progesterona (Senger, 2003).

A fase folicular pode ser dividida em proestro e estro (Hafez e Hafez, 2004). O proestro se inicia após a regressão luteal e tem duração de três a cinco dias (Ferreira, 2010). Essa fase é marcada pelo aumento da concentração sérica de estradiol devido ao recrutamento de folículos, e redução da concentração de progesterona em decorrência do processo de luteólise. Com a redução da concentração de progesterona ocorre a retirada do *feedback* negativo desse hormônio sobre o hipotálamo e conseqüente aumento da amplitude e frequência de liberação de GnRH (Hafez e Hafez, 2004). O proestro é caracterizado pelo decréscimo contínuo da concentração sérica de FSH, devido a produção de estrógeno e inibina pelos folículos cada vez maiores, e aumento da concentração de LH (Ferreira, 2010).

Quando em baixa concentração na circulação sanguínea, o estradiol exerce *feedback* negativo sobre a liberação do GnRH pelo hipotálamo, o que ocorre durante o início e meio da fase folicular do ciclo estral. Ao final da fase folicular, esse hormônio apresenta-se em alta concentração devido ao estágio avançado de crescimento folicular e, quando atinge o pico de concentração, passa a exercer *feedback*

positivo sobre a liberação de GnRH pelo hipotálamo. Essa inversão do *feedback* negativo para positivo estimula a liberação do pico pré-ovulatório de LH pela adenohipófise, iniciando o processo de ovulação (Senger, 2003).

O Estro é a fase do ciclo estral em que a fêmea apresenta receptividade sexual e tem duração média de 12 a 30 horas (Hafez e Hafez, 2004). O pico pré-ovulatório de LH ocorre no início do estro e desencadeia a luteinização das células da teca e da granulosa e a ruptura do folículo ovulatório. Em decorrência desses processos correm a ovulação e a formação do corpo lúteo (Gonçalves *et al.*, 2008). Os bovinos ovulam 10 a 12 horas após o fim do estro, normalmente apenas um oócito, e a ocorrência de duplas ovulações é de 10% (Hafez e Hafez, 2004). Durante o estro, a alta concentração sanguínea de estradiol desencadeia o comportamento e as características comuns desse período: turgidez uterina, relaxamento cervical, hiperemia e edema de vulva e descarga vaginal de muco translúcido (Ferreira, 2010).

A fase luteal divide-se em metaestro e diestro. Durante essa fase a concentração plasmática de progesterona encontra-se elevada, os pulsos de liberação de LH são menos frequentes e de maior amplitude quando comparados à fase folicular e a secreção de FSH permanece constante (Hafez e Hafez, 2004). O metaestro tem duração de dois a cinco dias e é a fase em que ocorre a ovulação, 0 a 12 horas após seu início (Ferreira, 2010). Após a ovulação inicia-se a formação do corpo lúteo (Hafez e Hafez, 2004).

O diestro é a última fase do ciclo estral e ocorre do quinto ao 17º dia. Nessa fase o corpo lúteo encontra-se totalmente formado e funcional (Ferreira, 2010). A principal função do corpo lúteo é produzir e secretar progesterona, hormônio que atua em vários

tecidos relacionados a reprodução, preparando o útero para receber a gestação. Para que a progesterona atue nos órgãos reprodutivos, é necessário que esses tenham sido expostos ao estradiol, adquirindo receptores hormonais. A progesterona atua sobre o oviduto estimulando a produção de fluido, que participa do desenvolvimento inicial do embrião e, juntamente com o estradiol, regula o transporte do oócito após a ovulação, garantindo que o conceito alcance o útero no momento adequado. A progesterona secretada pelo corpo lúteo inibe a divisão celular da mucosa uterina e prepara as células para fornecer nutrientes e suporte ao embrião até o momento da implantação, além de atuar sobre o miométrio, bloqueando contrações uterinas e sobre a glândula mamária estimulando seu desenvolvimento (Niswender e Nett, 1994). Um novo ciclo estral se inicia após a regressão do corpo lúteo, quando um novo folículo selecionado pode tornar-se ovulatório (Ferreira, 2010).

2.2 Dinâmica folicular do ovário

A dinâmica folicular, processo que envolve crescimento e regressão de folículos, ocorre de forma contínua ao longo do ciclo estral (Hafez e Hafez, 2004). Ainda durante a fase fetal, a fêmea compõe seu estoque de folículos primordiais no ovário, os quais são formados por um oócito na prófase da segunda divisão meiótica e algumas células da pré-granulosa, envolvidos por uma membrana basal (Gonçalves *et al.*, 2008). Folículos antrais em crescimento são encontrados no ovário em qualquer momento do ciclo estral, sob influência dos hormônios FSH e LH (Senger, 2003).

O crescimento de folículos nos ovários bovinos ocorre em ondas, variando de uma a quatro ondas por ciclo, mas a ocorrência de três ondas é mais frequente (Hafez e Hafez, 2004). Cada onda folicular é precedida por um pico transitório de FSH (Moore e Tatcher, 2006) e desencadeia um pico de

estrógeno, devido ao recrutamento de alguns folículos, sendo que a última onda folicular, ovulatória, origina o pico de estrógeno de maior amplitude (Ferreira, 2010). Uma onda folicular é caracterizada pelo desenvolvimento de um grupo de folículos maiores que 4mm de diâmetro, do qual apenas um se torna dominante, inibindo o crescimento de folículos menores ou subordinados (Noseir, 2003).

A onda folicular pode ser dividida em quatro etapas: recrutamento, seleção, dominância e atresia. A fase de recrutamento se inicia quando um grupo de folículos primordiais passa a crescer dependentemente de gonadotrofinas, o que ocorre quando atingem 3-4mm de diâmetro (Moore e Tatcher, 2006). Folículos com diâmetro maior que 4mm passam a ter seu desenvolvimento dependente do hormônio folículo estimulante (FSH). Após atingirem diâmetros maiores, de 7 a 9mm, esses folículos passam a ter crescimento dependente do hormônio luteinizante (LH; Hafez e Hafez, 2004).

Na fase de seleção, alguns folículos anteriormente recrutados continuam a crescer, atingindo 6 a 10mm de diâmetro. Os folículos não selecionados sofrem atresia. Na divergência, momento em que ocorre diferença entre as taxas de crescimento dos dois maiores folículos da onda folicular, apenas um folículo continua a crescer, tornando-se dominante e inibindo o crescimento dos outros (Gonçalves *et al.*, 2008).

Na fase de dominância, o folículo maior adquire a capacidade de inibir os subordinados (Ferreira, 2010). O folículo dominante, segundo Driancourt (2001) é, provavelmente, o primeiro a apresentar receptores para LH nas células da granulosa, o que ocorre quando atinge 8 a 9mm de diâmetro. Nesta fase, a produção de inibina e estrógeno pelo folículo dominante é alta, inibindo a liberação de FSH pela

adenohipofise (Ferreira, 2010). Folículos dominantes, quando expostos a um ambiente favorável em relação as concentrações hormonais, podem tornar-se ovulatórios (Gonçalves *et al.*, 2008).

2.3 Corpo lúteo: luteogênese e luteólise

O corpo lúteo é uma glândula endócrina ovariana transitória, que secreta progesterona durante a fase lútea do ciclo estral e durante a gestação (Rodgers *et al.*, 1988). A progesterona, principal produto de secreção do corpo lúteo, é essencial na manutenção da gestação, pois induz um estado de quiescência no miométrio e suprime a resposta imune materna contra o feto (Siiteri e Stites, 1982). Além disso, é responsável pela redução da atividade ovariana cíclica durante a gestação e tem participação no desenvolvimento da glândula mamária. A concentração sérica de progesterona se mantém constante ao longo da gestação (Hafez e Hafez, 2004). Em animais não gestantes, a secreção de progesterona pelo corpo lúteo regula o comprimento do ciclo estral (McCracken *et al.*, 1999).

A produção insuficiente de progesterona pelo corpo lúteo é considerada uma importante causa de problemas reprodutivos em mamíferos, pois a preparação do útero para suportar o desenvolvimento embrionário é dependente da ação desse hormônio (Senger, 2003). Entre 25 e 55% dos embriões de mamíferos são perdidos no início da gestação, sendo a função luteal inadequada uma das causas mais frequentes (Niswender e Nett, 1994).

O corpo lúteo bovino secreta também ocitocina, que tem papel no parto, na lactação e na regressão do corpo lúteo. A concentração de ocitocina e neurofisina é maior no corpo lúteo da vaca não gestante quando comparada a gestante (Flint e Sheldrick, 1983), e foi demonstrado que são as células lúteas maiores que produzem a ocitocina e a neurofisina (Rodgers *et al.*,

1983; Watkins, 1983; Guldenaar *et al.*, 1984).

Morfológicamente, o corpo lúteo pode ser classificado como protruso ou incluso e cavitário ou não cavitário (Senger, 2003). Em seu trabalho, Neves *et al.* (2002) encontraram 55,8% e 60,5% de corpos lúteos inclusos, 44,2% e 34,5% de corpos lúteos protrusos, 16,3% e 2,3% de corpos lúteos cavitários, e 83,7% e 97,7% de corpos lúteos não-cavitários em ovários de vacas não gestantes e gestantes, respectivamente. Segundo Tom *et al.* (1998), 33 a 70% dos corpos lúteos são cavitários, e este tipo de formação não afeta a gestação.

A formação do corpo lúteo se inicia antes da ovulação em um processo dependente do LH, denominado luteogênese, e se completa morfológica e funcionalmente no 12º dia do ciclo estral (Hafez e Hafez, 2004). Nesse processo, o folículo ovulatório sofre mudanças morfológicas, endócrinas e enzimáticas (Smith *et al.*, 1999).

Após a onda pré-ovulatória de gonadotrofinas, o diâmetro folicular aumenta (McClellan *et al.*, 1977), e as junções intercelulares das células da granulosa são reduzidas causando a dispersão dessas células (LeMarie, 1989). A onda pré-ovulatória de gonadotrofinas é seguida por hiperemia, edema e extravasamento de eritrócitos na teca interna. Cavender e Murdoch (1988) observaram vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, edema e congestão seguido de isquemia, injúria vascular e angiogênese na teca interna de folículos pré-ovulatórios. A hiperemia folicular facilita o acesso do LH à camada avascular de células da granulosa.

Após a ovulação, ocorre formação de pregueamento da parede folicular, o que facilita a migração de fibroblastos, células endoteliais e células da teca para a região central da estrutura em desenvolvimento

(O'Shea *et al.*, 1980). Além disso, ocorre desintegração da membrana basal que separa as células da teca e as células da granulosa e rompimento de pequenos vasos causando hemorragia, o que possibilita a mistura entre estas células, formando um tecido composto por células do tecido conjuntivo, da teca e da granulosa, denominado corpo hemorrágico. Esta estrutura é observada no ovário bovino por até três dias após a ovulação (Senger, 2003).

O corpo hemorrágico é substituído pelo corpo lúteo a partir da remodelação desse tecido, com rápida proliferação celular e aumento da produção de progesterona (Tom *et al.*, 1998). Nesse processo, as células da granulosa originam as células lúteas maiores e as células da teca interna originam as células lúteas menores. De células produtoras de proteínas, no folículos pré-ovulatório, elas passam a ter características de células produtoras de esteroides, no corpo lúteo (Junqueira e Carneiro, 2008).

Durante a formação do corpo lúteo ocorre intensa angiogênese, que é a formação de vasos sanguíneos pela migração de células endoteliais provenientes de vasos preexistentes. A intensidade da angiogênese está relacionada ao aumento do fluxo sanguíneo para o corpo lúteo, que é proporcional à sua capacidade de produção hormonal (Acosta *et al.*, 2003). No processo de luteogênese ocorre também proliferação de fibroblastos e hipertrofia de células lúteas, contudo as células esteroideogênicas não se proliferam após a ovulação e, devido a isso, a qualidade do corpo lúteo depende da qualidade do folículo que o originou (Ferreira, 2010).

O maior desenvolvimento do corpo lúteo ocorre entre os dias 3 e 12 do ciclo estral, quando se observa rápido aumento de peso. O folículo ovulatório pesa em média 200mg e, após a ovulação, cresce em 12 dias até atingir 4g em vacas de corte, podendo ser maior em vacas leiteiras (Fields e Fields,

1996). Após esse período, o tamanho e a função do corpo lúteo permanecem constantes até o 16º dia do ciclo, quando se inicia sua regressão. Quando ocorre fertilização, o trofoblasto do embrião em desenvolvimento bloqueia a luteólise através da produção e liberação de interferon Tau (Hafez e Hafez, 2004). Dessa forma, o corpo lúteo não entra em regressão no 16º dia, persistindo por todo o período de gestação, pois é essencial para mantê-la até os dias 165 a 180, após os quais torna-se importante na prevenção do parto prematuro (Estergreen *et al.*, 1967).

O corpo lúteo é um dos tecidos que recebe maior fluxo sanguíneo por volume e apresenta alta taxa metabólica. Vários fatores angiogênicos e seus receptores estão presentes no corpo lúteo, dentre eles estão as angiopoetinas, fator de crescimento epidérmico, fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fator de necrose tumoral e fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs). Os principais fatores angiogênicos ovarianos são os FGFs e VEGFs (Reynolds *et al.*, 2000) e, segundo Shirasuna *et al.* (2012), esses são essenciais no controle da produção de progesterona e na angiogênese na formação do corpo lúteo.

Durante o desenvolvimento do corpo lúteo, o VEGF é encontrado predominantemente em células luteais, e seus receptores, principalmente em células endoteliais, o que indica seu provável papel na quimiotaxia das células endoteliais no processo de angiogênese (Schams e Berisha, 2004). Hojo *et al.* (2009) observaram que a expressão dos principais fatores angiogênicos é elevada durante a fase de desenvolvimento do corpo lúteo e diminui na transição da fase madura para o início da regressão.

Vasos sanguíneos luteais podem ser classificados em dois tipos: arteríolas e vênulas, que possuem camada de músculo liso em sua parede, e diâmetro médio de 40µm e 30µm, respectivamente, e capilares,

que não possuem camada muscular. No corpo lúteo bovino a quantidade de arteríolas e microcapilares aumenta consideravelmente entre a fase inicial e madura do corpo lúteo. Os microcapilares diferem das arteríolas não só estruturalmente, mas também funcionalmente. Esses apresentam apenas uma camada de células endoteliais sobre a membrana basal, possibilitando a troca de substâncias entre as células endoteliais e a corrente sanguínea, enquanto as arteríolas e vênulas são responsáveis pelo transporte de hormônios, nutrientes e metabólitos (Hojo *et al.*, 2009).

A disfunção luteal é caracterizada por baixa produção de progesterona, luteólise prematura ou corpo lúteo persistente, e pode ocorrer devido a angiogênese insuficiente. Nos bovinos, a disfunção luteal está relacionada a infertilidade e morte embrionária precoce (Short *et al.*, 1990).

A regressão do corpo lúteo é denominada luteólise e culmina na formação de uma cicatriz denominada *corpo albicans* (McCracken *et al.*, 1999). A luteólise ocorre em um período de 1 a 3 dias, ao final da fase luteal do ciclo estral (Senger, 2003) ou ao final da gestação, e pode ser dividida em luteólise funcional, que é representada pelo declínio da produção de progesterona, e luteólise morfológica, representada por mudanças na estrutura celular do corpo lúteo. O processo é controlado pela ocitocina e progesterona produzidas pelo próprio corpo lúteo, e pela PGF_{2α} produzida pelo endométrio (McCracken *et al.*, 1999).

A duração do corpo lúteo é regulada por fatores luteotróficos e luteolíticos, sendo o principal hormônio luteotrófico o LH. O principal fator luteolítico do corpo lúteo bovino é a PGF_{2α} (Reynolds *et al.*, 2000). Até o quinto dia após a ovulação, o corpo lúteo é resistente a ação de luteolisinas (Tsai *et al.*, 1998). Dois a três dias após a ovulação a vascularização luteal atinge seu

máximo (Reynolds *et al.*, 2000). Quando o corpo lúteo está completamente formado, a maioria das células esteroidogênicas estabelece contato com um capilar e, nesse momento, o corpo lúteo se torna sensível a ação da PGF_{2α}, podendo assim sofrer luteólise (Schallenberger *et al.*, 1984).

A ação da PGF_{2α} leva a redução do fluxo sanguíneo, formação de infiltrado de macrófagos e eosinófilos (Murdoch, 1987), redução da quantidade de RNAm para a enzima 3β-hidroxiesteróide-desidrogenase, degeneração das células endoteliais de capilares, obstrução do lúmen de capilares e mudanças nucleares e citoplasmáticas compatíveis com apoptose nas células luteais. Todas essas alterações culminam na queda da produção de progesterona pelo corpo lúteo (O'Shea *et al.*, 1977). Na histologia, a redução do diâmetro vascular é uma das primeiras alterações no corpo lúteo relacionadas à luteólise (Azmi e O'Shea, 1984).

A PGF_{2α} uterina desencadeia a degeneração de células endoteliais e esteroidogênicas (McCracken *et al.*, 1999). Nos bovinos, a artéria ovariana apresenta-se justaposta a veia ovariana, que drena o corno uterino e o ovário ipsilateral, o que possibilita a passagem da PGF_{2α} uterina pela veia ovariana diretamente para a artéria ovariana por mecanismo de contracorrente. Essa via evita que ocorra a metabolização da PGF_{2α} na via sistêmica durante a passagem pelos pulmões (Ginther, 1974).

As alterações observadas na estrutura do corpo lúteo após o parto são semelhantes àquelas que ocorrem ao final do ciclo estral, contudo o primeiro processo de regressão é mais lento que o segundo (O'Shea e Wright, 1985). Outra diferença entre os dois processos é observada no corpo lúteo da gestação, dois a três dias após o parto, quando ocorre fusão de células luteais formando células sinciciais. Estas células gigantes apresentam cinco núcleos ou mais,

comprimento de 300µm e numerosas gotículas lipídicas no citoplasma. Esse tipo de formação persiste por mais de 22 dias após o parto e não é encontrada na regressão do corpo lúteo do ciclo estral. Por volta do dia 35 após o parto, o tecido luteal foi quase completamente substituído por tecido conjuntivo fibroso, mas ainda pode-se notar algumas células luteais remanescentes (Sawyer, 1995).

2.3.1 Volumetria dos componentes do corpo lúteo

O corpo lúteo é formado por células não esteroidogênicas e esteroidogênicas, constituídas pelas células lúteas maiores e células lúteas menores. As células esteroidogênicas ocupam 67,9% do volume do tecido luteal. Dentre as células não esteroidogênicas, estão as células endoteliais, os fibroblastos e as células de defesa do sistema imune, como leucócitos e macrófagos (O'Shea *et al.*, 1989). As células endoteliais e pericitos representam 14% do volume luteal e 53% do número total de células presentes no corpo lúteo bovino, enquanto as células lúteas maiores e menores representam, respectivamente, 3,5% e 26,7% do número de células que compõe o corpo lúteo, e 27,7% e 40,2% do volume do corpo lúteo, durante a gestação (Fields e Fields, 1996).

No dia 12 do ciclo estral, O'Shea *et al.* (1989) encontraram proporção volumétrica de 27,7±6,3% para células lúteas menores e 40,2±7,0% para células lúteas maiores no corpo lúteo bovino, mas informações sobre a proporção volumétrica do corpo lúteo bovino na gestação são escassas.

A diferenciação de células lúteas maiores e menores na microscopia óptica baseia-se em seu diâmetro, contudo essa medida é muito variável entre trabalhos: Chegini *et al.* (1984) encontraram diâmetro médio superior a 18µm para células luteais maiores, Weber *et al.* (1987) encontraram diâmetro superior

a 23µm, Koos e Hansel (1981), superior a 25µm, O'Shea *et al.* (1989), diâmetro de 38µm durante a fase intermediária do ciclo estral, e Rodgers *et al.* (1986) observaram diâmetro mínimo de 26µm.

A proporção entre células lúteas maiores e menores apresenta também grande variação. Essa proporção é importante quando se quer estimar a contribuição de cada tipo celular na função luteal (O'Shea *et al.*, 1989). Hansel *et al.* (1987) observaram proporção de 20:1 a 40:1 entre células luteais menores e maiores, enquanto Weber *et al.* (1987) encontraram relação de 10-2:1. A proporção entre células lúteas menores e maiores encontrada por O'Shea *et al.* (1989) foi de 7,6:1,0. Segundo Farin *et al.* (1986), as células menores aumentam em número mas não em tamanho, e as células maiores aumentam em tamanho, mas não em número, a medida em que o corpo lúteo se desenvolve.

As células lúteas maiores apresentam formato esférico ou poliédrico, com núcleo grande e arredondado e nucléolo proeminente e se originam das células da granulosa do folículo ovulatório e das células lúteas menores, o que justifica o aumento da quantidade de células lúteas maiores ao longo da vida do corpo lúteo. Contêm grânulos densos com aproximadamente 150-300nm (O'Shea *et al.*, 1989) dispersos no citoplasma tanto no corpo lúteo cíclico quanto no gestacional (Alila e Hansel, 1984), e são responsáveis pela produção de pelo menos 80% da progesterona proveniente do corpo lúteo (Niswender *et al.*, 1985).

As células lúteas menores apresentam forma estrelada, citoplasma mais escuro que as células lúteas maiores (Senger, 2003), 10 a 20µm de diâmetro (Hansel *et al.*, 1987) e são provenientes das células da teca interna. Contudo, próximo ao final da gestação e após o parto, a densidade citoplasmática das células menores se torna similar a das

maiores (O'Shea e McCoy, 1988). Durante a gestação, as células lúteas menores apresentam diâmetro maior (20-25µm) que durante o ciclo estral e algumas apresentam grânulos citoplasmáticos (Alila e Hansel, 1984).

Diferentemente do que é observado em ovinos, nos quais pode-se diferenciar as células luteais pela presença de gotículas lipídicas no citoplasma apenas das células menores, gotículas lipídicas estão presentes tanto em células lúteas maiores quanto em menores nos bovinos, logo a diferenciação destes dois tipos celulares em microscópio de luz é feita apenas pela comparação de diâmetro, formato e densidade citoplasmática (O'Shea *et al.*, 1989). No final da gestação, as células lúteas maiores apresentam maior quantidade de gotículas lipídicas no citoplasma, indicando redução da capacidade esteroidogênica dessas células ao longo da gestação (McClellan *et al.*, 1977).

Durante o ciclo estral, normalmente observa-se menor número de células lúteas maiores por grama de tecido luteal em comparação ao corpo lúteo da vaca gestante, e maior número de células lúteas menores no corpo lúteo do ciclo estral em relação ao da gestação (Alila e Hansel, 1984). Xavier *et al.* (2012) não observaram diferenças histológicas nas células lúteas quando compararam os três trimestres da gestação na vaca, contudo verificaram que ocorre aumento da quantidade de tecido conjuntivo, fibroblastos e matriz extracelular ao final da gestação.

Segundo Shirasuna *et al.* (2012), vários tipos de leucócitos foram observados no corpo lúteo. Dentre essas estão as células T CD4+, CD8+, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos. Essas células de defesa têm a função de produzir citocinas no corpo lúteo. Observa-se menor número de células de defesa no corpo lúteo da fêmea gestante quando em comparação com o da não gestante

(Bagavandoss *et al.*, 1990). No corpo lúteo de bovinos, a quantidade de células T CD4+ e CD8+ não varia ao longo da fase luteal do ciclo estral, e a quantidade de macrófagos e monócitos é alta no corpo lúteo em desenvolvimento. Experimentos que realizaram a eliminação dos macrófagos no ovário resultaram em disfunção endotelial, o que indica a importância dos macrófagos na manutenção da integridade vascular ovariana (Shirasuna *et al.*, 2012).

2.3.2 Grânulos citoplasmáticos em células lúteas

Fields *et al.* (1992a) e Chegini *et al.* (1984) observaram que grânulos secretórios citoplasmáticos ocorrem nas células lúteas maiores e menores, contudo, apenas as células maiores possuem estes grânulos em abundância, enquanto Kohsaka *et al.* (2001) e Gonçalves *et al.* (2008) descreveram as células lúteas maiores como as únicas que contêm grânulos secretórios citoplasmáticos no corpo lúteo.

Os grânulos das células do corpo lúteo bovino, diferentemente do que é observado em suínos e ovinos, encontram-se concentrados em uma única região do citoplasma, não sendo distribuídos uniformemente (Gimenez e Henricks, 1983; Theodosis *et al.*, 1986). Esses ninhos de grânulos apresentam diâmetro de 10µm em animais não gestantes e 15µm em gestantes (Fields e Fields, 1996). Devido a essa característica, Fields *et al.* (1992a), em cortes seriados de um grande número de células lúteas maiores, encontraram grânulos em apenas 84% das células no dia sete do ciclo estral, apesar de a quantidade de células contendo grânulos provavelmente ser maior, uma vez que os ninhos de grânulos ocupam apenas um terço do comprimento celular.

O corpo lúteo de ruminantes produz e secreta ocitocina durante o ciclo estral,

sendo esse hormônio responsável pelo início da luteólise através da estimulação da liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo útero. A partir de estudos *in vivo*, Rodgers *et al.* (1983) demonstraram que essa produção e liberação de ocitocina é feita exclusivamente pelas células maiores. A ocitocina é armazenada em grânulos e liberada por exocitose (Fields *et al.*, 1992a).

As concentrações de ocitocina e neurofisina em animais não gestantes são maiores que em animais gestantes (Wathes *et al.*, 1983). A partir de estudos utilizando a técnica da imunocitoquímica, Sawyer *et al.* (1986) observaram que a neurofisina e a ocitocina estão restritas ao citoplasma de células lúteas maiores, e a quantidade de células com grânulos aumenta ao longo do ciclo estral, de forma que no dia 16 todas as células maiores apresentam-se imunorreativas.

A formação de grânulos secretórios ocorre em células lúteas maiores independentemente da ocorrência de gestação. Grânulos secretórios de células lúteas maiores do corpo lúteo de vacas não gestantes contêm ocitocina e neurofisina, e sua distribuição é variável ao longo do ciclo estral. Apenas 3% das células lúteas maiores contêm grânulos no dia 3 do ciclo estral. No dia 7, a quantidade de grânulos atinge o máximo, com 84% das células apresentando-os. No dia 11, observa-se 64% de células lúteas maiores contendo grânulos e, a partir daí, a quantidade diminui ainda mais, apresentando apenas 26% de células com grânulos no dia 14, 16% no dia 17 e 8% no dia 19. A função dessa liberação precoce de ocitocina e neurofisina no ciclo estral não é conhecida (Fields e Fields, 1996). Caso a gestação seja iniciada, os grânulos não sofrem a redução observada ao final do ciclo estral e permanecem presentes em grande quantidade em células maiores até o 20º dia. Por volta do dia 30 da gestação, os grânulos praticamente desaparecem através do

mecanismo de exocitose (Fields *et al.*, 1992b).

Em vacas gestantes, as células lúteas maiores apresentam duas populações distintas de grânulos citoplasmáticos cujo conteúdo permanece incerto: grânulos grandes, com 500-2000nm em diâmetro e grânulos pequenos, com 100-300nm em diâmetro (Fields *et al.* 1992a). Grânulos pequenos foram observados tanto em células maiores do corpo lúteo cíclico quanto no gestacional em vacas. Na gestação, esses são observados a partir do dia 45, aumentam em quantidade até atingirem o pico entre os dias 180 e 210 (Fields *et al.*, 1985) e desaparecem próximo ao parto (Kohsaka *et al.*, 2001). Em ovelhas não gestantes, foi demonstrada a presença de ocitocina e neurofisina nos grânulos pequenos (Theodosis *et al.*, 1986). Contudo, o conteúdo dos grânulos pequenos que aparecem no corpo lúteo de vacas gestantes ainda não é conhecido e sabe-se que não contém relaxina ou oxitocina (Fields *et al.*, 1992a; Kohsaka *et al.*, 2001). Grânulos citoplasmáticos grandes, ao contrário dos grânulos pequenos, apresentam-se escassos aos quatro meses de gestação, aumentam em quantidade a partir do sétimo mês e atingem o pico próximo ao parto. Esses grânulos contêm relaxina (Fields *et al.*, 1985; Kohsaka *et al.*, 2001).

Xavier *et al.* (2012), estudando corpos lúteos de vacas Nelore nos três trimestres de gestação, não observaram padrão de distribuição dos grânulos citoplasmáticos das células lúteas maiores, os quais foram observados em todos os estágios, com maior intensidade ao final da gestação.

Ao longo desta revisão e tendo em vista toda a literatura consultada, nota-se que alguns mecanismos fisiológicos e características do corpo lúteo ainda precisam ser esclarecidos. Considerando-se a sua importância na regulação do ciclo estral e da gestação, torna-se evidente que o maior entendimento

do funcionamento do corpo lúteo possibilitaria o aperfeiçoamento do controle

desta glândula para aplicação na prática da reprodução animal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento e obtenção das amostras

O experimento foi realizado na Escola de Veterinária da UFMG, com espécimes de genitais de fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*) obtidos no frigorífico Santa Vitória, no município de Contagem – MG. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), sob o protocolo n°. 247/2013 (Anexo 6).

Logo após o abate dos animais no frigorífico, os genitais foram avaliados em relação ao estágio fisiológico e presença de corpo lúteo nos ovários. A coleta dos ovários foi baseada na presença de corpo

lúteo com características de funcionalidade, como intensa vascularização periférica, coloração vermelho-escuro a alaranjado e textura firme.

Na avaliação dos genitais obtidos de animais gestantes, o feto foi exteriorizado e o cordão umbilical foi seccionado. O comprimento ápico-caudal do feto (osso occipital até a primeira vértebra coccígea; Fig. 1) foi medido e utilizado como meio de determinação da idade gestacional, segundo Richardson (1996), a partir da seguinte fórmula:

$$X = 2,5 (Y + 21), \text{ onde:}$$

X é a variável idade da gestação (dias);

Y representa o comprimento ápico-caudal (cm).



Figura 1. Feto bovino: medição do comprimento ápico-caudal.

A partir da determinação do estágio fisiológico, gestante ou não gestante, e da medida do comprimento ápico-caudal, os ovários com corpo lúteo funcional foram distribuídos em quatro grupos:

- Grupo 1: Ovários de animais não gestantes (n = 6);
- Grupo 2: Ovários de animais em gestação de até 90 dias (n = 6);
- Grupo 3: Ovários de animais em gestação de 91 a 180 dias (n = 6);

- Grupo 4: Ovários de animais em gestação de 181 a 270 dias (n = 6).

A amostra foi composta por 24 ovários, seis em cada grupo. O *n* foi determinado a partir do cálculo amostral, segundo equação proposta por Sampaio (2007).

3.2 Avaliação macroscópica e processamento do corpo lúteo

3.2.1 Pré-fixação e avaliação macroscópica

Os ovários foram pré-fixados por um período inferior a quatro horas em formalina neutra tamponada a 10%. Após a pré-fixação, foi feita a classificação dos corpos lúteos de acordo com a sua morfologia

macroscópica em protruso ou incluso e cavitário ou não cavitário. Em seguida, os corpos lúteos foram dissecados do estroma ovariano.

3.2.2 Processamento histológico

Foram feitos cortes sagitais de aproximadamente 3mm de espessura nos corpos lúteos para garantir a completa fixação do tecido em formalina neutra tamponada a 10% (Fig. 2). Os corpos lúteos foram mantidos na solução fixadora por 48 horas e, em seguida, permaneceram em uma solução de álcool a 70% até o momento do processamento histológico.

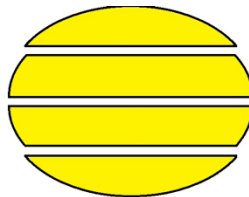


Figura 2. Esquema de cortes no corpo lúteo após a pré-fixação com formalina neutra tamponada a 10%.

O processamento dos tecidos para inclusão em paraplast foi adaptado da metodologia de rotina para inclusão em parafina (Michalany, 1980):

- 1) *Desidratação*: o tecido foi desidratado em uma sequência de álcool etílico a concentrações de 70%, 80%, 90% e álcool absoluto I, II e III, permanecendo 30 minutos em cada etapa;
- 2) *Diafanização*: após a desidratação, os tecidos passaram por três banhos com duração de 30 minutos em xilol, com o objetivo de substituir o álcool no tecido, possibilitando a penetração do paraplast no momento da impregnação;

- 3) *Impregnação e inclusão*: os tecidos passaram por três banhos de paraplast, cada um com duração mínima de 30 minutos e, em seguida, foram incluídos em Paraplast Plus® (P3683 Sigma).

Foram feitos cortes de 3µm de espessura nos blocos de paraplast em micrótomo manual. Posteriormente, os cortes foram desparafinizados, hidratados e submetidos à técnica de coloração com Hematoxilina-eosina, Tricrômico de Gomori, Azul de toluidina, Xylidine Ponceau e Azul de bromofenol, e selados com Entellan® (Merck Millipore) em lâminas para microscópio, segundo os seguintes procedimentos:

1) *Desparafinização e hidratação*: as lâminas receberam um banho em xilol com duração de 10 minutos, e dois banhos com duração de 5 minutos. Em seguida, passaram por um banho em solução de xilol e álcool (1:1) por 5 minutos. No processo de hidratação, as lâminas receberam três banhos em álcool absoluto, cada um com duração de 5 minutos, e três banhos em álcool 95%, 80% e 70%, cada um com duração de 5 minutos. Após os banhos em solução alcoólica, as lâminas foram lavadas em água por 5 minutos.

2) *Colorações*:
Hematoxilina-eosina: as lâminas foram imersas em hematoxilina por 2 a 3 minutos e lavadas em água corrente por 10 minutos. Em seguida foram imersas em eosina por 2 a 3 minutos e novamente lavadas em água corrente.

Tricrômico de Gomori: as lâminas foram imersas em hematoxilina por 2 a 3 minutos e lavadas em água corrente por 10 minutos. Posteriormente foram coradas com Tricrômico de Gomori por 15 minutos e lavadas em água corrente novamente.

Azul de toluidina: as lâminas foram lavadas em água corrente por 2 minutos e coradas pelo azul de toluidina por 15 segundos a 1 minuto. Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente até a diferenciação e retirada do excesso de corante.

- *Técnicas histoquímicas*:

Xylidine Ponceau: as lâminas foram imersas em solução corante de Xylidine Ponceau por 15 minutos e

diferenciadas em tampão acetato (pH=1,7) por 12 a 24 horas.

Azul de bromofenol: as lâminas foram coradas em solução de azul de bromofenol por 30 minutos. Em seguida foram lavadas em solução de ácido acético 0,5% por 10 minutos, três vezes. Posteriormente as lâminas foram lavadas em água corrente até o momento em que o corante tornava-se azulado.

Após a coloração, as lâminas passaram pelos seguintes processos:

1) *Desidratação e diafanização*: as lâminas foram mergulhadas em álcool absoluto por 30 segundos, álcool:xilol (1:1) por 1 minuto, e xilol I e II por 1 minuto;

2) *Montagem das lâminas*: as lamínulas foram lavadas com detergente em água corrente e secadas com papel toalha. Uma gota de Entellan foi depositada sobre cada lamínula, e em seguida a lâmina com o corte corado foi posicionada sobre a lamínula. Em seguida as lâminas permaneceram em repouso até a secagem total.

3.3 Avaliação microscópica

3.3.1 Descrição histológica do corpo lúteo

A avaliação histológica do corpo lúteo foi feita em microscópio óptico, utilizando as objetivas de 5, 10, 40 e 100x. Os constituintes do corpo lúteo avaliados foram: citoplasma e núcleo das células lúteas, tecido conjuntivo e fibroblastos, células endoteliais e pericitos. Foi realizada descrição histológica do corpo lúteo em todas as amostras, nas lâminas coradas em Hematoxilina-eosina, Tricrômico de

Gomori, Azul de toluidina, Xylidine Ponceau e Azul de bromofenol.

3.3.2 *Proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo*

A proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo foi avaliada em lâminas coradas em Hematoxilina-eosina, em todos os grupos experimentais. Os componentes observados foram citoplasma e núcleo de células lúteas maiores e menores, células endoteliais e pericitos, tecido conjuntivo e fibroblastos e vasos sanguíneos.

As proporções volumétricas foram obtidas pelo método estereométrico, utilizando-se ocular integradora Zeiss KPL 10x, com retículo de cinco linhas horizontais e 25 pontos equidistantes, acoplada a uma objetiva de 40x. Foram examinados aleatoriamente 35 campos por lâmina, em varredura horizontal. Os resultados foram expressos em porcentagem sobre um total de 875 pontos por corpo lúteo (Neves *et al.*, 2002).

3.3.3 *Diâmetro nuclear médio de células lúteas*

O diâmetro nuclear médio foi obtido pela mensuração do maior diâmetro de 20 núcleos de cada tipo celular por animal, em lâminas coradas em Hematoxilina-eosina, utilizando-se a lente micrométrica Olympus acoplada à objetiva de 100x de um microscópio óptico, totalizando um aumento final de 1000x. As médias finais foram convertidas de mm para μm , pela escala de uma lente micrométrica:

- Régua de escala 0 a 100 (1cm) = 10mm
 - 1mm = 25 μm
 - Cada divisão da régua tem 0,1mm=2,5 μm
- Ex: núcleo medindo 1,0mm x 2,5 μm =25 μm

3.3.4 *Avaliação de grânulos citoplasmáticos de células lúteas*

Lâminas coradas em Tricrômico de Gomori foram utilizadas na avaliação da distribuição de grânulos citoplasmáticos em células lúteas. Foram contabilizadas 200 células lúteas por corpo lúteo em campos aleatórios em varredura horizontal (Mandarim de Lacerda, 1995), utilizando-se a ocular integradora Zeiss KPL 10x, com retículo de cinco linhas horizontais e 25 pontos equidistantes, acoplada a uma objetiva de 40x. Dessa forma, foram identificadas células lúteas maiores e menores que continham e que não continham grânulos citoplasmáticos. A característica histoquímica dos grânulos foi avaliada em lâminas coradas em Xylidine Ponceau e Azul de bromofenol.

3.4 **Análise estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. As análises foram realizadas com o auxílio do software SAS (Sistema de Análise Estatística), versão 8. Todas as variáveis foram analisadas pelo teste Kolmogorov-Smirnov para verificação de normalidade, e as variáveis que não seguiram o modelo de distribuição Normal sofreram transformação logarítmica. Posteriormente, realizou-se análise das médias das variáveis por estatística descritiva e análise de variância (ANOVA).

As médias das proporções volumétricas de citoplasma de células lúteas, de núcleo de células lúteas e de tecido conjuntivo (sem diferenciação de fibroblastos) e as médias do diâmetro nuclear das células lúteas e da porcentagem de células lúteas contendo grânulos citoplasmáticos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. As médias das proporções volumétricas de células endoteliais e pericitos e de vasos sanguíneos, que apresentaram coeficiente de variação superior a 25%, foram comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação macroscópica

O comprimento ápico-caudal médio dos fetos avaliados foi de 37,7±28,55cm. No primeiro terço da gestação, o comprimento dos fetos foi de 7,95±5,65cm. No segundo terço a medida encontrada foi de 32,92±11,45cm e no terço final foi de 72,25±9,29cm.

Foi encontrada frequência de 79,16% de corpos lúteos no ovário direito e 20,84% no

ovário esquerdo, a partir da avaliação de 24 espécimes de genitais (Tab. 1). Esse resultado é similar ao de Reece e Turner (1983), Vianna *et al.* (1999), Ramos *et al.* (2008) e Xavier *et al.* (2011), que observaram maior frequência de corpos lúteos no ovário direito, mas difere da observação de Neves *et al.* (2002), que encontraram 53% de corpos lúteos no ovário esquerdo e 47% no direito. A maior frequência de corpos lúteos no ovário direito, observado na maioria dos trabalhos consultados, sugere maior atividade deste em relação ao esquerdo.

Tabela 1. Frequência de corpos lúteos nos ovários direito e esquerdo de vacas Nelore gestantes e não gestantes.

	Ovário direito	Ovário esquerdo
Gestantes	77,77% (14/18)	22,22% (4/18)
Não gestantes	83,33% (5/6)	16,66% (1/6)
Total	79,16% (19/24)	20,84% (5/24)

As características morfológicas do corpo lúteo de animais gestantes e não gestantes estão organizadas na Tab. 2. No grupo de animais gestantes, a frequência de corpos lúteos protrusos foi menor quando comparado ao grupo de não gestantes e a frequência de corpos lúteos cavitários foi maior. Esse resultado foi diferente do esperado pois, segundo Kastelic *et al.* (1990), a maior duração do corpo lúteo na gestação geralmente resulta em fechamento da cavidade central. Além disso, o tecido luteal se prolifera 2,6mm²/dia durante a gestação, o que poderia causar a protrusão

do corpo lúteo nesse estágio fisiológico (Kastelic *et al.*, 1990).

A cavidade central observada em alguns corpos lúteos é formada a partir do antro do folículo ovulatório, que pode permanecer no corpo lúteo durante e após o processo de luteogênese. Após a ovulação o antro é preenchido por sangue e, posteriormente, o coágulo formado é substituído por tecido conjuntivo. Após esse processo a cavidade central pode desaparecer ou não. Segundo Tom *et al.* (1998), 33 a 70% dos corpos lúteos são cavitários e este tipo de formação não afeta a gestação.

Tabela 2. Características morfológicas do corpo lúteo de vacas Nelore gestantes e não gestantes.

	Protruso	Incluso	Cavitário	Não cavitário
Gestantes	41,18% (7/17)	58,82% (10/17)	12,5% (2/16)	87,5% (14/16)
Não gestantes	66,67% (4/6)	33,33% (2/6)	0% (0/6)	100% (6/6)

4.2 Descrição histológica do corpo lúteo

Maior atenção foi dedicada à descrição do tecido luteal e pouco do estroma ovariano foi avaliado, uma vez que os corpos lúteos foram dissecados dos ovários. Foi observada retração do tecido devido ao tempo de fixação pelo formol, o que poderia ser evitado reduzindo-se o tempo de fixação para 24 horas.

O corpo lúteo era predominantemente composto por células lúteas, assim como descrito por O'Shea *et al.* (1989). A diferenciação entre as células lúteas maiores e menores foi baseada em diferenças morfológicas entre essas células, principalmente tamanho, formato e presença de grânulos citoplasmáticos em células maiores. As células maiores apresentavam formato arredondado ou poliédrico, maior proporção citoplasma/núcleo, núcleo grande e vesiculoso com nucléolo evidente e citoplasma menos denso que o das células menores. As células menores apresentavam formato irregular, núcleo irregular ou em forma de taça e citoplasma mais escuro (Fig. 3 A e B).

Foram observadas também células não esteroidogênicas. Os fibroblastos apresentavam núcleo alongado, citoplasma escasso e irregular (Fig. 3 A e B e Fig. 6) e encontravam-se distribuídos por todo o corpo lúteo. Algumas vezes formavam septos de tecido conjuntivo entre fibras colágenas que circundavam e penetravam o corpo lúteo, ou se dispunham em torno de vasos sanguíneos e células lúteas (Fig. 4 A, B, C e D). A quantidade de fibroblastos e fibras colágenas em meio às células lúteas aumentava com a progressão da gestação.

Na parte central do corpo lúteo foi observada uma área formada por tecido conjuntivo. Segundo Junqueira e Carneiro (2008), após a ovulação pode ocorrer extravasamento de sangue para o antro folicular. O sangue é coagulado e

gradualmente substituído por tecido conjuntivo, formando uma cicatriz de tecido conjuntivo na parte central do corpo lúteo.

A intensidade da vascularização luteal foi variável entre as amostras. Em alguns cortes, o tecido luteal apresentou-se altamente vascularizado, com capilares circundando as células lúteas. Nesses cortes, quase todas as células lúteas eram banhadas por, no mínimo, um capilar. Foram observados vasos sanguíneos distribuídos por todo o corpo lúteo (Fig. 3 A). Foi possível observar vasos linfáticos em alguns septos de tecido conjuntivo que penetravam o tecido luteal. Em alguns cortes a vascularização era mais discreta e foi observada tendência de maior vascularização no primeiro terço da gestação.

Nas lâminas coradas pelo Azul de toluidina, a distinção entre as células maiores e menores tornou-se mais evidente que nas outras colorações. O citoplasma das células maiores apresentou-se corado em azul claro e com limites evidentes, enquanto o citoplasma das células menores corou-se em azul mais intenso e não apresentou delimitação precisa (Fig. 7). Segundo Niswender e Nett (1994), a distinção entre células maiores e menores é melhor realizada quando se utilizam cortes de corpo lúteo com 1µm de espessura corados pelo azul de toluidina.

Foi observada a presença de grânulos citoplasmáticos corados em vermelho pelo Tricrômico de Gomori, apenas em células lúteas maiores (Fig. 5 B e Fig. 6). Os grânulos eram arredondados, bem definidos, de tamanhos distintos e geralmente apresentavam-se concentrados em uma única região do citoplasma. Em algumas células, esses circundavam o núcleo e em outras, apresentavam-se na periferia da célula. A localização dos grânulos no citoplasma assemelha-se à descrita por Fields *et al.* (1985) para grânulos de ocitocina, que se formam em uma região

paranuclear e migram para a periferia celular, onde ocorre a exocitose. Quanto mais adiantado era o período da gestação em que se encontrava o animal, maior era a quantidade de células maiores que apresentavam grânulos. Contudo, alguns animais em estágio final de gestação apresentavam poucas células com grânulos. Em animais não gestantes, a ocorrência de células lúteas com grânulos era rara. Não foi encontrada justificativa para essa distribuição em animais gestantes e não gestantes, contudo esse mesmo padrão de grânulos foi observado por Xavier *et al.* (2012).

Ainda na avaliação dos grânulos, foram feitas as colorações histoquímicas Xylidine Ponceau e Azul de bromofenol. Ambas evidenciam proteínas totais no tecido e a sua escolha se baseou na observação de Xavier *et al.* (2012), que verificaram a composição proteica desses grânulos. Na coloração pelo Xylidine Ponceau, todo o citoplasma das células lúteas apresentou-se corado em vermelho e os grânulos foram destacados em vermelho intenso, assim como as hemácias (Fig. 8). Já na coloração pelo Azul de bromofenol, o citoplasma foi uniformemente corado em azul, e os grânulos e as hemácias destacaram-se em azul intenso (Fig. 9 A e B).

4.3 Proporção volumétrica do corpo lúteo

Os resultados da proporção volumétrica do corpo lúteo de animais gestantes, nos três terços da gestação, e de não gestantes estão apresentados na Tab. 3.

Nos 24 corpos lúteos avaliados, foi observada a seguinte proporção volumétrica média: 40,85±4,56% de citoplasma de células lúteas; 7,01±1,66% de núcleos de células lúteas; 31,58±7,30% de tecido conjuntivo e fibroblastos; 2,81±1,73% de

células endoteliais e pericitos, e 5,52±4,02% de vasos sanguíneos.

Foi observada redução no volume do corpo lúteo ocupado por citoplasma e núcleo de células lúteas do primeiro para o segundo terço, e essa redução se manteve no terceiro terço. Xavier *et al.* (2011) também observaram redução na proporção de citoplasma e núcleo de células lúteas na gestação, contudo encontraram diferença significativa entre os três terços.

Verificou-se aumento na proporção de tecido conjuntivo e fibroblastos quando se comparou o primeiro e o segundo terços, e a partir do segundo terço esse aumento foi reduzido, tornando-se não significativo. É possível que o corpo lúteo alcance a estabilização de sua estrutura ao final do segundo terço de gestação e, a partir daí, mantenha sua proporção volumétrica estável. Esse resultado é similar ao de Xavier *et al.* (2011), que observaram aumento progressivo na quantidade de tecido conjuntivo ao longo da gestação.

Durante o processo de amadurecimento e regressão do corpo lúteo, as células esteroideogênicas são progressivamente substituídas por tecido conjuntivo até a completa formação do *corpus albicans*, o que é compatível com o aumento da proporção volumétrica de tecido conjuntivo e espaço intercelular, e redução da proporção de citoplasma de células esteroideogênicas ao longo da gestação, observados neste trabalho. Logo, essas alterações podem estar relacionadas ao processo de maturação e regressão luteal na gestação.

Tabela 3. Médias e desvios-padrão da proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo de vacas Nelore gestantes e não gestantes.

Grupo	CCL	NCL	CEP	TCF	VS
1º terço	46,13±2,84 ^a	9,16±1,03 ^a	2,97±1,53 ^{ab}	20,93±5,39 ^a	7,65±6,32 ^a
2º terço	37,88±3,50 ^b	6,21±1,02 ^b	4,22±1,66 ^a	34,04±4,17 ^b	4,49±2,91 ^a
3º terço	38,46±3,08 ^b	6,04±1,32 ^b	1,79±0,85 ^b	34,61±2,48 ^b	4,19±1,30 ^a
Não gestante	40,91±3,85 ^{ab}	6,64±1,08 ^b	2,26±1,96 ^b	36,76±2,51 ^b	5,73±3,91 ^a

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

1º terço: 0-90 dias de gestação; 2º terço: 91-180 dias de gestação; 3º terço: 181-270 dias de gestação; CCL – Citoplasma de células lúteas; NCL – Núcleo de células lúteas; CEP – Células endoteliais e pericitos; TCF – Tecido conjuntivo e fibroblastos; VS – Vasos sanguíneos.

A maior proporção volumétrica de vasos sanguíneos foi observada no primeiro terço da gestação, contudo não houve diferença significativa entre os quatro grupos. Essa ocorrência é compatível com o trabalho de Hojo *et al.* (2009), que observaram maior expressão de fatores angiogênicos durante a fase de desenvolvimento do corpo lúteo em relação a fase madura, o que poderia justificar a maior proporção de vasos sanguíneos no primeiro terço gestacional.

Após o segundo terço da gestação, o corpo lúteo não apresentou alterações estruturais significativas. Essa observação pode ser justificada pela coincidência com o momento em que a placenta passa a contribuir com a produção hormonal necessária para manter a gestação, por volta do dia 180. Especula-se que a partir desse estágio da gestação, não haja necessidade da continuidade do desenvolvimento luteal, pois a demanda por progesterona passa a ser suprida também pela placenta.

Ainda foi observada maior proporção de células endoteliais e pericitos no segundo terço da gestação quando comparados aos outros três grupos. Houve redução, com diferença significativa, entre o segundo terço e o terceiro, e entre o segundo e o grupo de não gestantes. Xavier *et al.* (2011) encontraram redução, com diferença estatística, quando compararam a proporção

de células endoteliais e pericitos entre o primeiro e segundo terços apenas. A redução da proporção de células endoteliais e pericitos verificada entre o segundo e terceiro terço é compatível com o processo de luteólise, que se inicia com a redução do fluxo sanguíneo luteal.

4.4 Diâmetro nuclear médio de células lúteas

O diâmetro nuclear médio foi de 24,72±1,67µm para as células lúteas maiores, e 17,73±1,11µm para as células menores. O diâmetro nuclear de células maiores aumentou ao longo da gestação, com diferença significativa apenas entre o primeiro e o terceiro terço gestacional. No grupo de animais não gestantes, o diâmetro nuclear de células maiores foi semelhante ao dos outros grupos (Tab. 4). Esses resultados diferem do encontrado por Xavier (2011), que não observou diferença significativa no diâmetro nuclear entre os terços da gestação, e foram similares ao de Neves e Marques Júnior (2006), que não encontraram diferença significativa no diâmetro nuclear médio comparando animais gestantes e não gestantes. O aumento do diâmetro nuclear das células lúteas maiores pode ser justificado pelo aumento gradual da atividade dessas células ao longo da gestação, o que é compatível com o aumento da quantidade de células maiores contendo grânulos no citoplasma à medida que a gestação progride.

Apesar da ocorrência de aumento numérico discreto do diâmetro nuclear das células menores ao longo da gestação, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos. Uma vez que o núcleo de células lúteas menores apresenta forma irregular, a realização de apenas uma medida do diâmetro nuclear dessas células foi

considerado um erro metodológico do presente estudo. A determinação do diâmetro nuclear de células menores torna-se mais precisa quando se mede o maior e o menor diâmetro de cada núcleo, adotando-se a média dos dois diâmetros como o diâmetro real.

Tabela 4. Médias e desvios-padrão do diâmetro nuclear (μm) de células lúteas maiores e menores de vacas Nelore gestantes e não gestantes.

Grupo	Célula lútea maior	Célula lútea menor
1º terço	23,66 \pm 1,73 ^a	17,14 \pm 1,38 ^a
2º terço	24,77 \pm 0,77 ^{ab}	17,50 \pm 0,57 ^a
3º terço	26,27 \pm 1,33 ^b	18,31 \pm 0,83 ^a
Não gestante	24,16 \pm 1,73 ^{ab}	17,96 \pm 1,34 ^a

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). 1º terço: 0-90 dias de gestação; 2º terço: 91-180 dias de gestação; 3º terço: 181-270 dias de gestação.

4.5 Análise de grânulos citoplasmáticos em células lúteas

As colorações Xylidine Ponceau e Azul de bromofenol foram eficientes em evidenciar grânulos citoplasmáticos, confirmando assim a natureza proteica de sua composição e possibilitando a análise de sua ocorrência e distribuição ao longo da gestação.

Nas lâminas coradas em Tricrômico de Gomori, os grânulos foram corados em vermelho. Xavier *et al.* (2011) observaram cortes histológicos do corpo lúteo de vacas Nelore gestantes nos três terços da gestação, corados em PAS (Periodic Acid Schiff Reaction) e Xylidine Ponceau. A coloração pelo PAS, utilizada para corar polissacarídeos e proteínas neutras no tecido, apresentou resultado negativo, sem marcação de grânulos e, por isso, não foi utilizada no presente estudo. Já a coloração pelo Xylidine Ponceau evidenciou grânulos citoplasmáticos, indicando que essas estruturas possuem composição proteica.

A quantidade de células maiores ou menores, sob um total de 200 células, que

contêm grânulos ou não em cada grupo experimental está organizada na Tab. 5. É possível que o número de células contendo grânulos contabilizado nesse estudo esteja subestimado devido a técnica utilizada, pois os grânulos citoplasmáticos do corpo lúteo bovino encontram-se organizados em determinada região do citoplasma, ocupando apenas um terço desse, e não dispersos uniformemente (Sawyer, 1995). Portanto, algumas células que contêm grânulos podem não ter sido contabilizadas, o que depende do corte histológico analisado.

Grânulos citoplasmáticos foram observados apenas em células lúteas maiores, o que é compatível com as observações de Kohsaka *et al.* (2001) e de Xavier *et al.* (2012). A ausência de grânulos citoplasmáticos em células lúteas menores sugere que essas células apresentam menor atividade em relação as células maiores, e talvez apresentem menor participação no processo de luteólise e na manutenção da gestação.

No tecido luteal dos animais não gestantes avaliados, foram encontradas apenas duas

células contendo grânulos citoplasmáticos. Tal resultado sugere que o conteúdo desses grânulos não seria importante durante o ciclo estral, mas apenas durante a gestação, quando estão presentes em maior quantidade.

Segundo Fields *et al.* (1992a) e Kohsaka *et al.* (2001), existem pelo menos três populações distintas de grânulos nas células luteais maiores. A primeira contém ocitocina e é observada ao longo do ciclo estral e até os 25 dias de gestação. A segunda população de grânulos, composta por grânulos pequenos, começa a se formar após os 45 dias de gestação, atingindo pico entre os dias 180 e 210, e sua composição não é conhecida. Já a terceira, composta por grânulos de relaxina, ou grânulos grandes, apresenta-se escassa aos 4 meses de gestação, aumenta após o sétimo mês e apresenta pico próximo ao parto.

No presente estudo foi observado aumento numérico gradual da quantidade de células com grânulos do início para o final da gestação, com diferença significativa apenas entre o primeiro e os outros terços. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Xavier *et al.* (2012) que, apesar de não terem observado padrão de distribuição dos grânulos, verificaram que esses estão presentes em maior quantidade ao final do segundo terço e durante o terceiro terço da gestação.

Apesar de a técnica utilizada neste trabalho não ter possibilitado a diferenciação de grânulos maiores e menores, é provável que os grânulos encontrados representem a população de grânulos pequenos descrita por Fields *et al.* (1992a), uma vez que foram observados em todos os trimestres da gestação e praticamente não foram visualizados no tecido luteal de animais não gestantes. Segundo Fields *et al.* (1985), grânulos semelhantes observados no corpo lúteo de porcas contêm relaxina, e já foi

detectada reação positiva pela imunohistoquímica para relaxina no corpo lúteo bovino ao final da gestação. Contudo, foi demonstrado que a relaxina do corpo lúteo gestacional da vaca está contida apenas nos grânulos maiores e o conteúdo dos grânulos pequenos permanece desconhecido (Kohsaka *et al.*, 2001). É possível que estes grânulos participem de algum processo fisiológico endócrino importante na manutenção da gestação ainda não conhecido. A maior quantidade de células com grânulos ao final da gestação pode ser ainda um indicio de que esses grânulos estejam envolvidos no processo de luteólise ou parto.

Tendo em vista algumas limitações de técnicas utilizadas neste estudo e a escassez de trabalhos com análise de grânulos citoplasmáticos no corpo lúteo bovino, sugere-se que sejam feitos novos estudos com técnicas que utilizam anticorpos, como a imunohistoquímica, que possibilitaria visualizar a presença e a localização desses grânulos no tecido luteal. A utilização do *Western-blot* propicia a detecção da presença de anticorpos específicos no tecido luteal, tornando possível a identificação de hormônios. Sugere-se ainda a utilização de técnicas que detectam DNA e RNA, como o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), que poderia ser utilizada para identificar a presença de DNA ou RNA que codificam hormônios e seus receptores. A microscopia eletrônica poderia ser utilizada na diferenciação de grânulos maiores e menores no tecido luteal.

Tabela 5. Porcentagem de células lúteas maiores e menores com grânulos no citoplasma, de um total de duzentas células contadas, no corpo lúteo de vacas Nelore gestantes e não gestantes.

Grupo	Célula lútea maior		Célula lútea menor	
	Com grânulos	Sem grânulos	Com grânulos	Sem grânulos
1º terço	2,33±1,94 ^a	78,5±7,55 ^{ab}	0	19,17±7,46 ^a
2º terço	25,50±20,34 ^b	56,50±20,82 ^{bc}	0	18,00±2,85 ^a
3º terço	39,75±25,07 ^b	38,17±18,63 ^c	0	18,75±3,25 ^a
Não gestante	0,17±0,26 ^c	82,42±7,43 ^a	0	17,42±7,36 ^a

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). 1º terço: 0-90 dias de gestação; 2º terço: 91-180 dias de gestação; 3º terço: 181-270 dias de gestação.

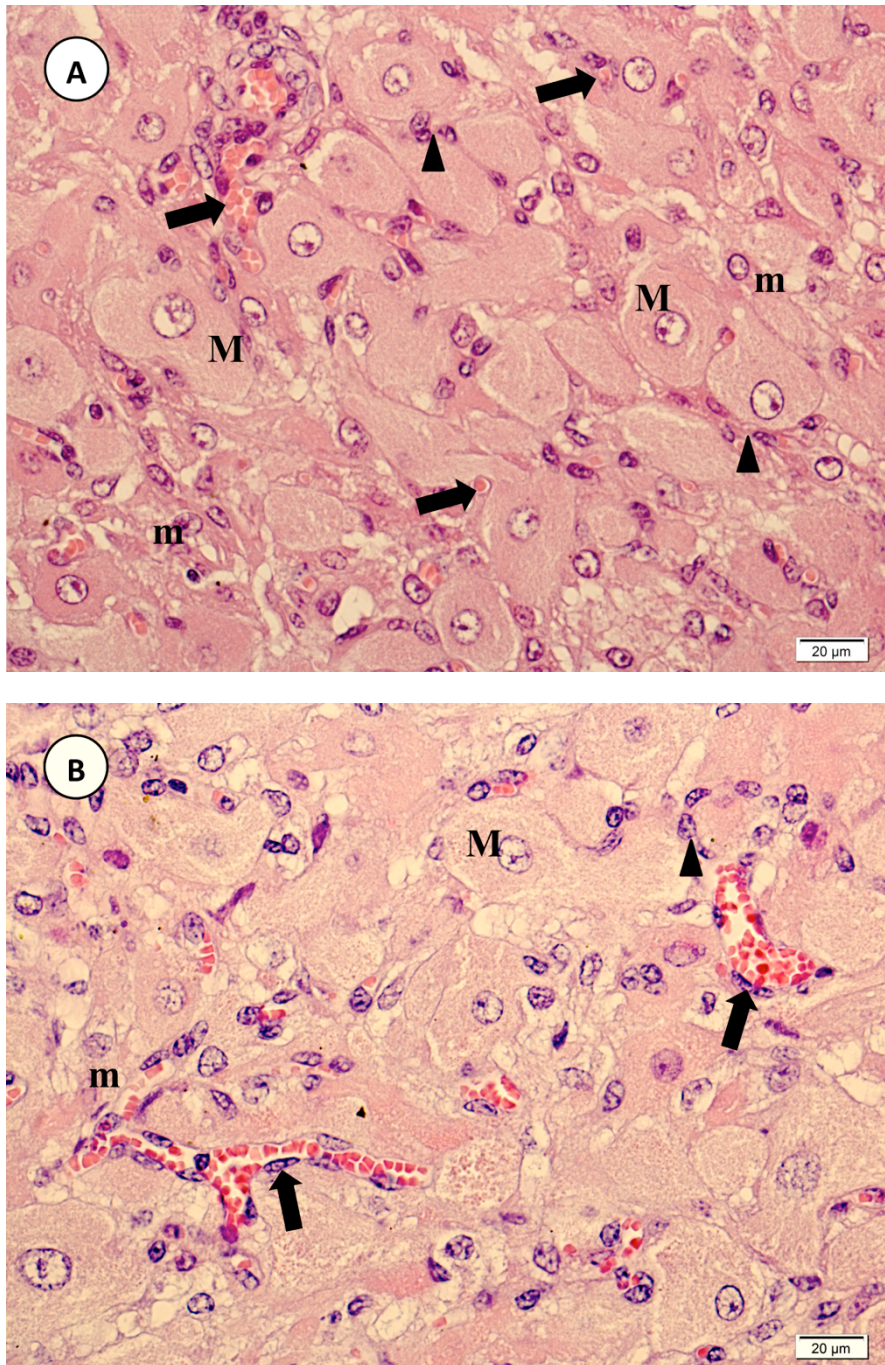


Figura 3. Vaca Nelore. Fotomicrografias de corpo lúteo de animal gestante, mostrando em A) tecido luteal aos 218 dias de gestação (3º terço), evidenciando vasos sanguíneos (setas) e fibroblastos (cabeça de seta) e B) aos 110 dias de gestação (2º terço), evidenciando células lúteas maiores (M), células lúteas menores (m), células endoteliais (setas) e fibroblastos entre as células lúteas (cabeça de seta). Coloração: H.E.

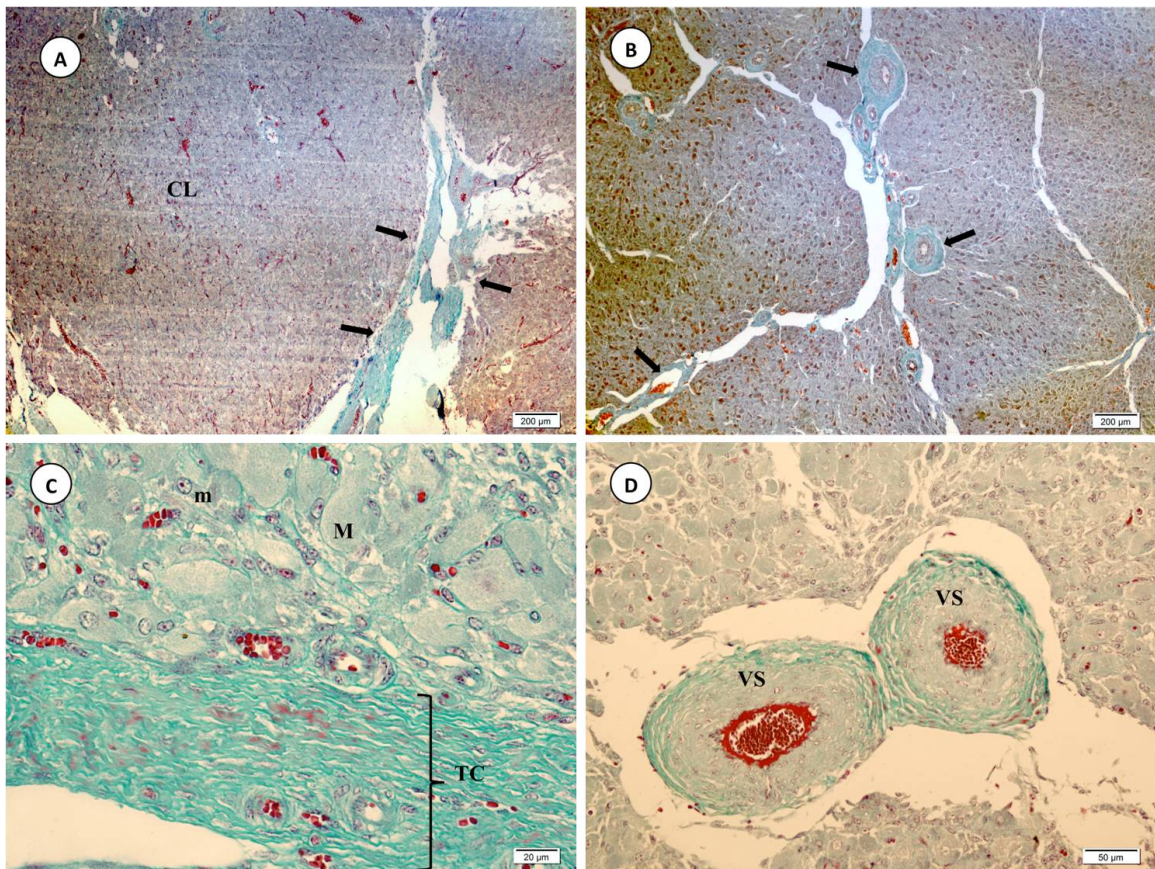


Figura 4. Vaca Nelore. Fotomicrografias de corpo lúteo de animal gestante, mostrando em A) tecido luteal (CL) com septo de tecido conjuntivo (seta), aos 218 dias de gestação (3^o terço); em B) corpo lúteo no primeiro terço de gestação, destacando arteríolas em meio aos septos de tecido conjuntivo (seta); C) Tecido luteal aos 133 dias de gestação (2^o terço), apresentando células lúteas maiores (M) e menores (m) e septo de tecido conjuntivo (TC) contendo pequenos vasos sanguíneos; D) Tecido luteal aos 110 dias de gestação (2^o terço), contendo vasos sanguíneos (VS). Coloração: Tricrômico de Gomori.

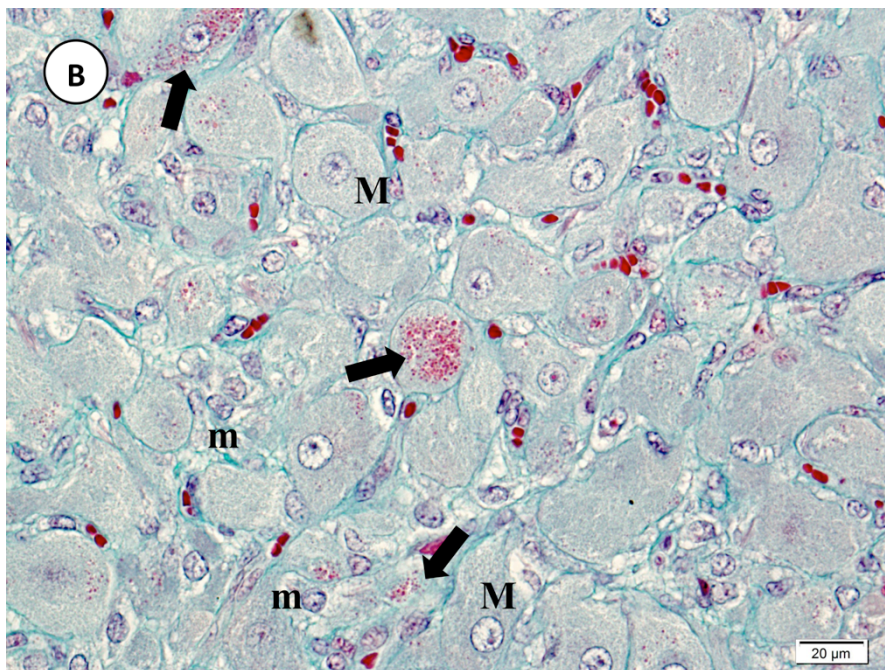
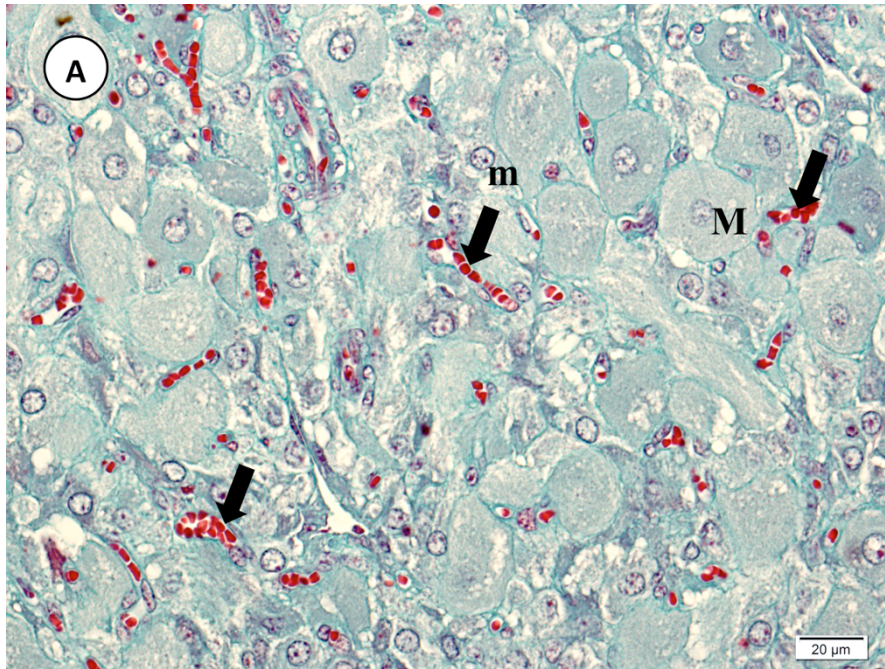


Figura 5. Vaca Nelore. Fotomicrografias de corpo lúteo de animal gestante, mostrando em A) tecido luteal de gestação inicial (1^o terço) com células lúteas maiores (M) e menores (m), vasos sanguíneos (seta) e ausência de grânulos no citoplasma das células lúteas e em B) tecido luteal aos 218 dias de gestação (3^o terço) com células lúteas maiores (M) e menores (m) e grânulos citoplasmáticos em células lúteas maiores (seta). Coloração: Tricrômico de Gomori.

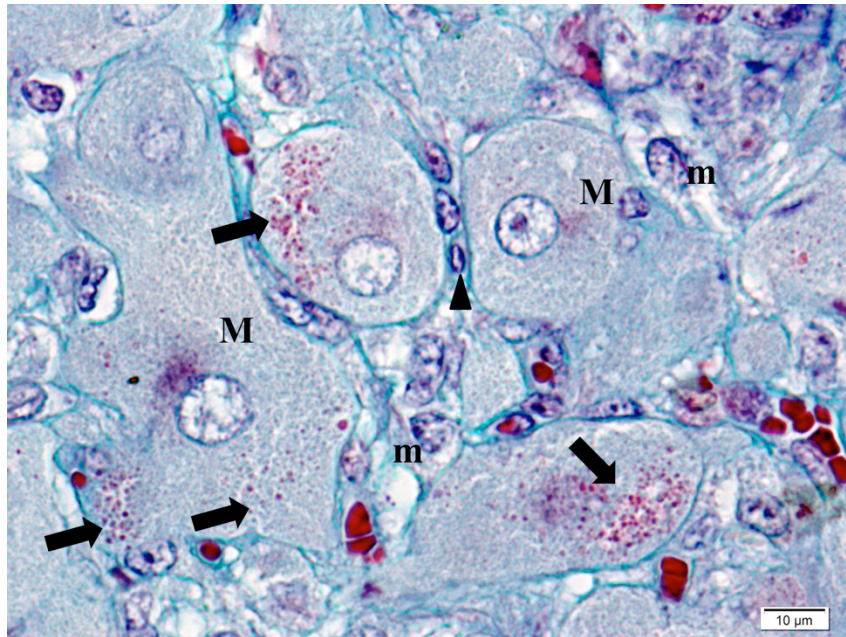


Figura 6. Vaca Nelore. Fotomicrografia de corpo lúteo de animal gestante. Tecido luteal aos 218 dias de gestação (3º terço) com células lúteas maiores (M) e menores (m), grânulos citoplasmáticos em células lúteas maiores (seta) e fibroblastos circundando células lúteas (cabeça de seta). Coloração: Tricrômico de Gomori.

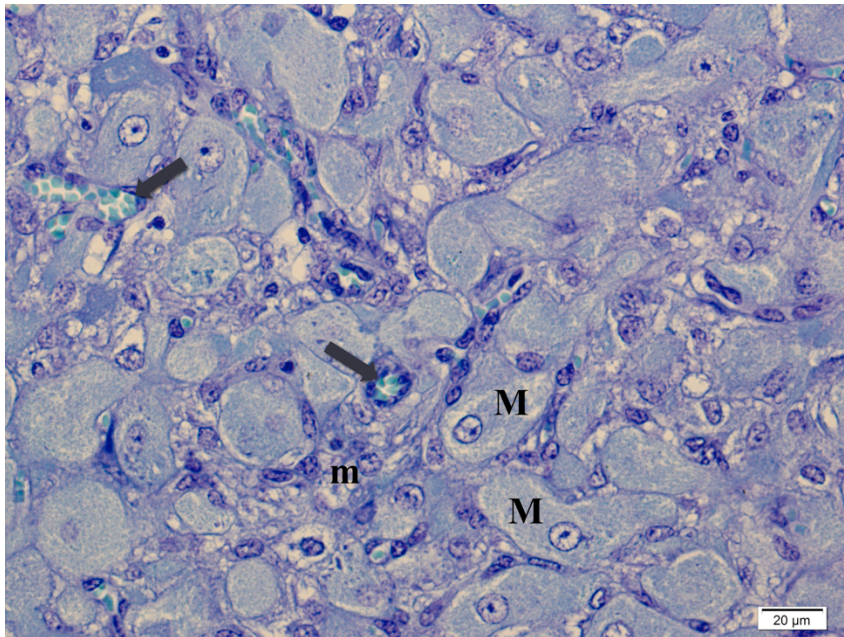


Figura 7. Vaca Nelore. Fotomicrografia de corpo lúteo de animal aos 218 dias de gestação (3^o terço) mostrando células lúteas maiores (M) com citoplasma bem delimitado e mais claro que o das células lúteas menores (m) e vasos sanguíneos (seta). Coloração: Azul de toluidina.

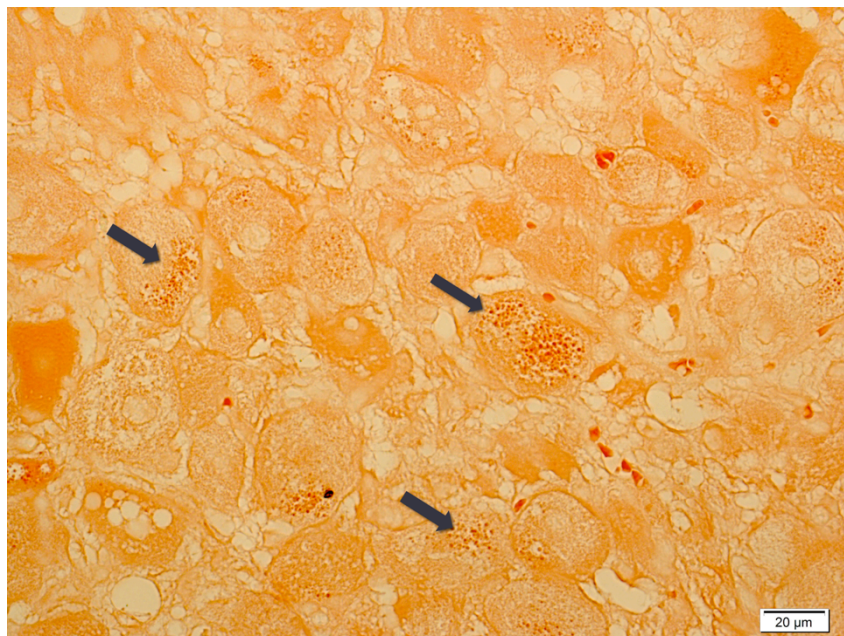


Figura 8. Vaca Nelore. Fotomicrografia de corpo lúteo de animal aos 257 dias de gestação (3^o terço), evidenciando grânulos citoplasmáticos em células lúteas maiores corados em vermelho (seta). Coloração: Xylidine Ponceau.

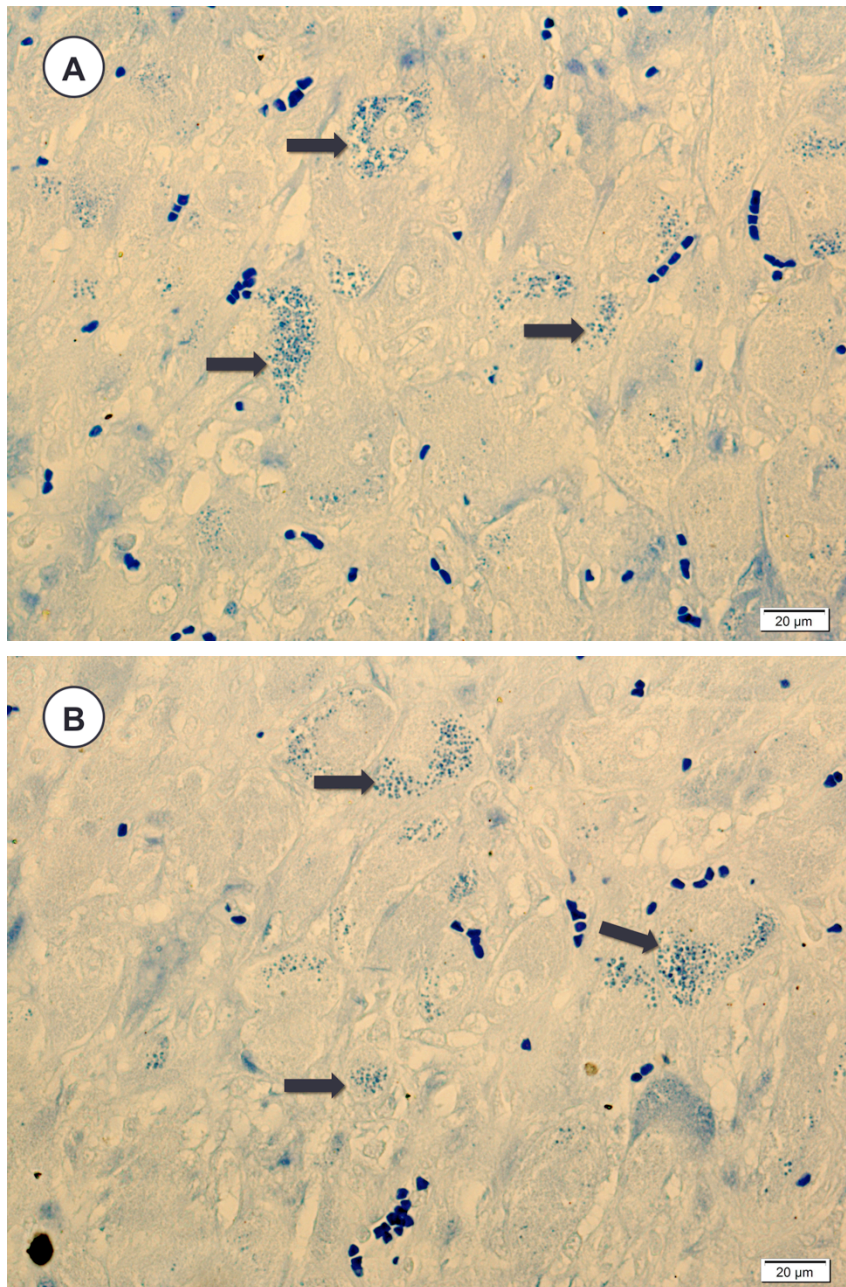


Figura 9. Vaca Nelore. Fotomicrografias de corpo lúteo de animal gestante, mostrando em A) tecido luteal aos 303 dias de gestação (3^o terço) e em B) aos 218 dias de gestação (3^o terço), com células lúteas contendo grânulos citoplasmáticos (seta); Coloração: Azul de bromofenol.

5. CONCLUSÕES

A proporção volumétrica de citoplasma e núcleo de células lúteas diminuiu no corpo lúteo do primeiro para o segundo terço da gestação, quando se estabilizou. A proporção de vasos sanguíneos não se alterou ao longo da gestação e a quantidade de tecido conjuntivo e fibroblastos aumentou do primeiro para o segundo terço. A proporção de células endoteliais e pericitos no corpo lúteo diminuiu do segundo para o terceiro terço da gestação.

O diâmetro nuclear das células lúteas maiores aumentou ao longo da gestação, enquanto o das células menores não se alterou.

Grânulos citoplasmáticos estavam presentes apenas em células lúteas maiores. A quantidade de células lúteas maiores com grânulos citoplasmáticos aumentou do primeiro para o segundo terço da gestação. Em animais não gestantes a quantidade de células com grânulos foi insignificante quando comparada a de animais gestantes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da literatura consultada e tendo em vista o destaque dos animais da raça Nelore na pecuária nacional, nota-se que muitos estudos ainda são necessários para esclarecer a morfologia do corpo lúteo nesses animais. O melhor entendimento da função e morfologia luteal do Nelore são fundamentais no desenvolvimento e aprimoramento de métodos de controle do ciclo estral e da gestação que sejam ideais para essa raça. O desenvolvimento dessas técnicas leva a uma melhora dos índices

reprodutivos do rebanho resultando em aumento da produção, o que é necessário para suprir o aumento da demanda de carne no Brasil.

São necessários mais estudos para esclarecer a redução da proporção volumétrica de células lúteas e o aumento do diâmetro nuclear ao longo da gestação encontrados neste trabalho. Precisa-se ainda compreender a dinâmica dos grânulos citoplasmáticos observados nas células lúteas maiores ao longo da gestação e sua composição e função a partir do 45º dia da gestação.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T.J.; HAYASHI, K.G.; OHTANI, M. *et al.* Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early *corpus luteum* in cows. *Reproduction*, v.125, p.759-767, 2003.
- ALILA, H.W.; HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine *corpus luteum* as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.*, v.31, p.1015-1025, 1984.
- AZMI, T.I.; O'SHEA, J.D. Mechanism of deletion of endothelial cells during regression of the *corpus luteum*. *Lab. Invest.*, v.51, p.206-217, 1984.
- BAGAVANDOSS, P.; WIGGINS, R.C.; KUNKEL, S.L. *et al.* Tumor necrosis factor production and accumulation of inflammatory cells in the *corpus luteum* of pseudopregnancy and pregnancy in rabbits. *Biol. Reprod.*, v.42, p.367-376, 1990.
- BINELLI, M.; THATCHER, W.W.; MATTOS, R. *et al.* Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*, v.56, p.1451-1463, 2001.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> . Acesso em: 26 dezembro 2013.
- CAVENDER, J.L.; MURDOCH, W.J. Morphological studies of the microcirculatory system of preovulatory ovine follicles. *Biol. Reprod.*, v.39, p.989, 1988.
- CHEGINI, N.; RAMANI, N.; RAO, C.V. Morphological and biochemical characterization of small and large bovine luteal cells during pregnancy. *Molec. Cell. Endocrine.*, v.37, p.89-102, 1984.
- DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v.55, p.1211-1239, 2001.
- ESTERGREEN, V.L.; FROST, O.L.; GOMES, W.R. *et al.* Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows. *J. Dairy. Sci.*, v.50, p.1293-1295, 1967.
- FARIN, C.E.; SAWYER, H.R.; GAMBONI, F., *et al.* Morphometric analysis of cell types in the ovine *corpus luteum* throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, v.35, p.1299-1308, 1986.
- FERREIRA, A.M. *Reprodução da fêmea bovina*. 1.ed. Juiz de Fora: Edição do autor, 2010. 420p.
- FIELDS, M.J.; BARROS, C.M.; FIELDS, P.A. Characterization of large luteal cells and they secretory granules during the estrous cycle of the cow. *Biol. Reprod.*, v.46, p.535-545, 1992a.
- FIELDS, M.J.; DUBOIS, W.; FIELDS, P.A. Dynamic features of luteal secretory granules: ultrastructural changes during the course of pregnancy in the cow. *Endocrinology*, v.117, p.1675-1682, 1985.
- FIELDS, M.J.; FIELDS, P.A. Morphological characteristics of the bovine *corpus luteum* during the estrus cycle and pregnancy. *Theriogenology*, v.45, p.1295-1325, 1996.
- FIELDS, M.J.; LA ROSA, D.V.; CHANG, S.M. *et al.* Immunolocalization of oxytocin and neurophysin in large luteal cells of the early pregnant cow. *Biol. Reprod.*, v.46, p.152, 1992b.

- FLINT, A. P.F.; SHELDRIK, E.L. Evidence for a systemic role for ovarian oxytocin in luteal regression sheep. *J. Reprod. Fertil.*, v.67, p.215-225, 1983.
- GIMENEZ, T.; HENRICKS, D.D. Prolongation of the luteal phase by prostaglandin E during the estrous cycle in the cow. A preliminar report. *Theriogenology*, v.19, p.693-700, 1983.
- GINTHER, O.J.; International regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: A review. *J. Anim. Sci.*, v.39, p.550-564, 1974.
- GONÇALVES, P.B. D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. 395p.
- GULDENAAR, S.E.F.; WATHES, D.C.; PICKERING, B.T. Immunocytochemical evidence for the presence of oxytocin and neurophysin in the large cells of the bovine *corpus luteum*. *Cell. Tissue. Res.*, v.237, p.349-352, 1984.
- HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. *Reprodução animal*. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.
- HANSEL, W.; ALILA, H.W.; DOWD, J.P. *et al.* Control of steroidogenesis in small and large bovine luteal cells. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.40, p.331-347, 1987.
- HOJO, T.; AL-ZI'ABI, M.O.; SKARZYNSKI, D.J. *et al.* Changes of the vasculature of bovine *corpus luteum* during the estrous cycle and prostaglandin F_{2α}-induced luteolysis. *J. Reprod. Dev.*, v.55, p.512-517, 2009.
- JUNQUEIRA, LC.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 542p.
- KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Relationship between ultrasonic assessment of the *corpus luteum* and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, v.33, p.1269-1279, 1990.
- KOHSAKA, T.; SASADA, H.; SATO, E. *et al.* Ultrastructural properties and immunolocalization of relaxin in the cytoplasmic electron-dense granules of large luteal cells during pregnancy in the cow. *J. Reprod. Dev.*, v.47, p.218-225, 2001.
- KOOS, R.D.; HANSEL, W. The large and small cells of the bovine *corpus luteum*: ultrastructural and functional differences. In: SCHWARTZ, N.B.; HUNZICKER-DUNN, M. (Ed). *Dynamics of ovarian function*. NY: Raven Press, 1981. p.197-203.
- LEMARIE, W.J. Mechanisms of ovulation. *Steroids*, v.54, p.455, 1989.
- MANDARIM DE LACERDA, C.A. *Métodos quantitativos em morfologia*. Rio de Janeiro: UERJ, 1995. 131p.
- MCCLELLAN, M.C.; ABEL, J.H. Jr.; NESWENDER, G.D. Function of lysosomes during luteal regression in normal cycling and PGF₂ treated ewes. *Biol. Reprod.*, v.16, p.499-512, 1977.
- MCCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.*, v.79, p.263-323, 1999.
- MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico*. 1.ed. São Paulo: EPU, 1980. 277 p.
- MOORE, K; TATCHER, W.W. Major advances associated with reproduction in

- dairy cattle. *J. Dairy. Sci.*, v.89, p.1254-1266, 2006.
- MURDOCH, W.J. Treatment of sheep with prostaglandin F2 α enhances production of a luteal chemoattractant for eosinophils. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, v.15, p.52-56, 1987.
- NEVES, M.M.; MARQUES JR, A.P. Proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo de Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, p.944-946, 2006.
- NEVES, M.M.; MARQUES JR, A.P.; SANTANA, C.V. *et al.* Características de ovários de fêmeas zebu (*Bos taurus indicus*), colhidos em abatedouros. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 54, p.651-654, 2002.
- NISWENDER, G.D; NETT, T.M. *Corpus luteum* and its control in infraprimate species. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. *Physiology of Reproduction*, 2.ed. New York: Raven, 1994. p.781-816.
- NISWENDER, G.D.; SCHAWALL, R.H.; FITZ, T.A. *et al.* Regulation of luteal function in domestic ruminant: new concepts. *Recent. Prog. Horm. Res.*, v.41, p.101-151, 1985
- NOSEIR, W.M.B. Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. *Reprod. Biol. Endocrinol.* v.1, p.1-6, 2003.
- O'SHEA, J.D.; CRAN, D.G.; HAY, M.F. Fate of the theca interna following ovulation in the ewe. *Cell. Tissue. Res.*, v.210, p.305, 1980.
- O'SHEA, J.D.; MCCOY, P.J. Weight, composition, mitosis, cell death and content of progesterone and DNA in the *corpus luteum* of pregnancy in the ewe. *J. Reprod. Fertil.*, v.83, p.107-117, 1988.
- O'SHEA, J.D.; NIGHTINGALE, M.G.; CHAMLEY, W.A. Changes in small blood vessels during cyclic luteal regression in sheep. *Biol. Reprod.*, v.17, p.162-177, 1977.
- O'SHEA, J.D.; RODGERS, R.J.; D'OCCHIO, M.J. Cellular composition of the cyclic luteum of the cow. *J. Reprod. Fertil.*, v.85, p.483-487, 1989.
- O'SHEA, J.D.; WRIGHT, P.J. Regression of the *corpus luteum* of pregnancy following parturition in the ewe. *Acta Anatom.*, v.122, p.69-76, 1985.
- PEARSE, A.G.E. *Histochemistry: theoretical and applied*. 4.ed. Churchill Livingstone: Great Britain, 1985. 1055p.
- RAMOS, E.M; CAVALCANTE, T.V.; NUNES, R.R.M. *et al.* Morfometria ovariana de vacas zebrúinas criadas na Amazônia Oriental. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v.9, p.696-702, 2008. Disponível em: <<http://www.rbspa.ufba.br>>. Acesso em dez. 2013.
- REECE, R.P; TURNER, C.W. The functional activity of the right and left bovine ovary. *J. Dairy. Sci.*, v.21, p.37-39, 1938.
- REYNOLDS, L.P.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the *corpus luteum*. *Endocrine*, v.12, p.1-9, 2000.
- RICHARDSON, C. Personal communication. The development of the conceptus. In: ARTHUR, G.H.; PERKINSON, T.J. (Ed). *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8.ed. London: WB Soundres, 1996. p.68.
- RODGERS, R.J.; MITCHELL, M.D.; SIMPSON, E.R. Secretion of progesterone and prostaglandins by cells of bovine

- corpora lutea from three stages of the luteal phase. *J. Endocrin.*, v.118, p.121-126, 1988.
- RODGERS, R.J.; O'SHEA, J.D.; FINDLAY, J.K. *et al.* Large luteal cells the source of luteal oxytocin in the sheep. *Endocrinology*, v.113, p.2302-2304, 1983.
- RODGERS, R.J.; RODGERS, H.F.; WATERMAN, M.R.; SIMPSON, E.R. Immunolocalization of cholesterol side-chain-cleavage cytochrome P-450 and ultrastructural studied of bovine corpora lutea. *J. Reprod. Fertil.*, v.78, p.639-652, 1986.
- SAMPAIO, I.M.B. *Estatística aplicada a experimentação animal*. 3.ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. 264p.
- SANTIAGO, A.A. A raça Nelore. In: Gado Nelore: 100 anos de seleção. São Paulo: Ed dos Criadores, 1987. 594p.
- SAWYER, H.R. Structural and functional properties of the *corpus luteum* of pregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, v.49, p.97-110, 1995.
- SAWYER, H.R.; MOELLER, C.L.; KOZLOWSKI, G.P. Immunocytochemical localization of neurophysin and oxytocin in ovine corpora lutea. *Biol. Reprod.*, v.34, p.543-548, 1986.
- SCHALLENBERGER, E.; SCHAMS, D.; BULLERMAN, B.; WALTERS, D.L. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during prostaglandin-induced regression of the *corpus luteum* in the cow. *J. Reprod. Fertil.*, v.71, p.493-501, 1984.
- SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of *corpus luteum* function in cattle – an overview. *Reprod. Domest. Anim.*, v.39, p.241-251, 2004.
- SENGER, P.L. Reproductive cyclicity – The Luteal Phase. In: *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2nd ed. Washington: Current Conceptions, 2003. cap.9, p.188-213.
- SHIRASUNA, K.; NITTA, A.; SINEENARD, J. *et al.* Vascular and immune regulation of *corpus luteum* development, maintenance, and regression in the cow. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.43, p.198-211, 2012.
- SHORT, R.E.; BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R.B. *et al.* Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J. Anim. Sci.*, v.68, p.799-816, 1990.
- SIITERI, P.K.; STITES, D.P. Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy. *Biol. Reprod.*, v.26, p.1-14, 1982.
- SMITH, M.F.; MCINTUSH, E.V.; RICKE, W.A. *et al.* Regulation of ovarian extracellular matrix remodelling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: effects on follicular development, ovulation and luteal function. *J. Reprod. Fertil.*, v.54, p.367-381, 1999.
- THEODOSIS, D.T.; WOODING, F.B.P.; SHELDRIK, E.L. *et al.* Ultrastructural localization of oxytocin and neurophysin in the ovine *corpus luteum*. *Cell. Tissue. Res.*, v.243, p.129-135, 1986.
- TOM, J.W.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Quantitative ecotexture analysis of bovine corpora lutea. *Theriogenology*, v.49, p.115-123, 1998.
- TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C. Prostaglandin F_{2α} regulates distinct physiological changes in early and mid-

cycle bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.*, v.58, p.346-52, 1998.

USDA. *United States department of Agriculture: Economic Research Service*. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/topics/international-markets-trade/countries-regions/brazil>>. Acesso em: 26 dezembro 2013.

VIANNA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.R. *et al.* Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, p.251-256, 1999.

XAVIER, P. R. *Características morfológicas do corpo lúteo de vacas nelore (bos taurus indicus) nos terços inicial, médio e final da gestação*. 2011. 55f. Dissertação (Mestrado, reprodução animal). Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 2011.

XAVIER, P.R.; LEAO, R.A.C.; OLIVEIRA E SILVA, P.V.D. Histological characteristics of the *corpus luteum* of Nelore cows in the first, second and third

trimester of pregnancy. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, p.505-509, 2012.

XAVIER, P.R.; MARQUES JÚNIOR, A.P.; LEÃO, R.A.C.; OLIVEIRA E SILVA, P.V.D. Proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo de vacas Nelore nos terços inicial, médio e final da gestação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, p.322-325, 2011.

WATHES, D.C.; SWANN, R.W.; BIRKETT, S.D. *et al.* Characterization of oxytocin, vasopressin and neurophysin from the bovine *corpus luteum*. *Endocrinology*, v.113, p.693-698, 1983.

WATKINS, W.B. Immunohistochemical localization of neurophysin and oxytocin in the sheep corpora lutea. *Neuropeptides*, v.4, p.51-54, 1983.

WEBER, D.M.; FIELDS, P.A.; ROMRELL, L.J. *et al.* Functional differences between small and large luteal cells of the late-pregnant vs. non-pregnant cow. *Biol. Reprod.*, v.37, p.685-697, 1987.

ANEXOS

ANEXO 1: Composição e preparo de soluções

FORMALINA NEUTRA TAMPONADA (Fixação)

Composição

900mL de água destilada

100mL de formaldeído 37-40%

4g de fosfato de sódio monobásico

6,5g de fosfato de sódio dibásico (anidro)

Preparo (1L)

Dissolver 4g de fosfato de sódio monobásico e 6,5g de fosfato de sódio dibásico em 900mL de água destilada aquecida, para facilitar a dissolução. Completar o volume de 1L com 100mL de formaldeído a 37-40%.

DESPARAFINIZAÇÃO (Pré-Coloração)

Sequência

Xilol III – 10 minutos

Xilol II – 5 minutos

Xilol I – 5 minutos

Álcool-xilol (1:1) – 5 minutos

Álcool absoluto III – 5 minutos

Álcool absoluto II – 5 minutos

Álcool absoluto I – 5 minutos

Álcool 95% - 5 minutos

Álcool 80% - 5 minutos

Álcool 70% - 5 minutos

Água – 5 minutos

AZUL DE TOLUIDINA (coloração)

Composição

Azul de toluidina – 0,5g

Borato de sódio – 1,0g

Água destilada – 99mL

Preparo (100mL)

Dissolver 1g de Borato de sódio em 99mL de água destilada e, em seguida, acrescentar 0,5g de Azul de toluidina. Agitar, filtrar e manter em frasco escuro.

Coloração

Lavar as lâminas em água corrente por 2 minutos, e imergir no corante por 15 segundos a um minuto. Lavar novamente em água corrente até que ocorra a diferenciação e retirada do excesso de corante. Secar as lâminas em temperatura ambiente e realizar a montagem.

AZUL DE BROMOFENOL (coloração) – Para proteínas totais (modificado a partir de Pearse, 1985)

Composição

Ácido acético 1% (2mL de ácido acético glacial em 200mL de água destilada)

0,1g de Azul de Bromofenol

3g de cloreto de mercúrio

Preparo (200mL)

Diluir cloreto de mercúrio e bromofenol em ácido acético a 1% e filtrar.

Coloração

Mergulhar as lâminas no corante por 30 minutos e lavar em ácido acético 0,5% por 10 minutos, três vezes. Em seguida lavar em água destilada até que os cortes adquiram uma tonalidade azulada. Secar e montar as lâminas.

XYLIDINE PONCEAU (coloração) – Para proteínas totais

Composição

Xylidine Ponceau – 0,1g

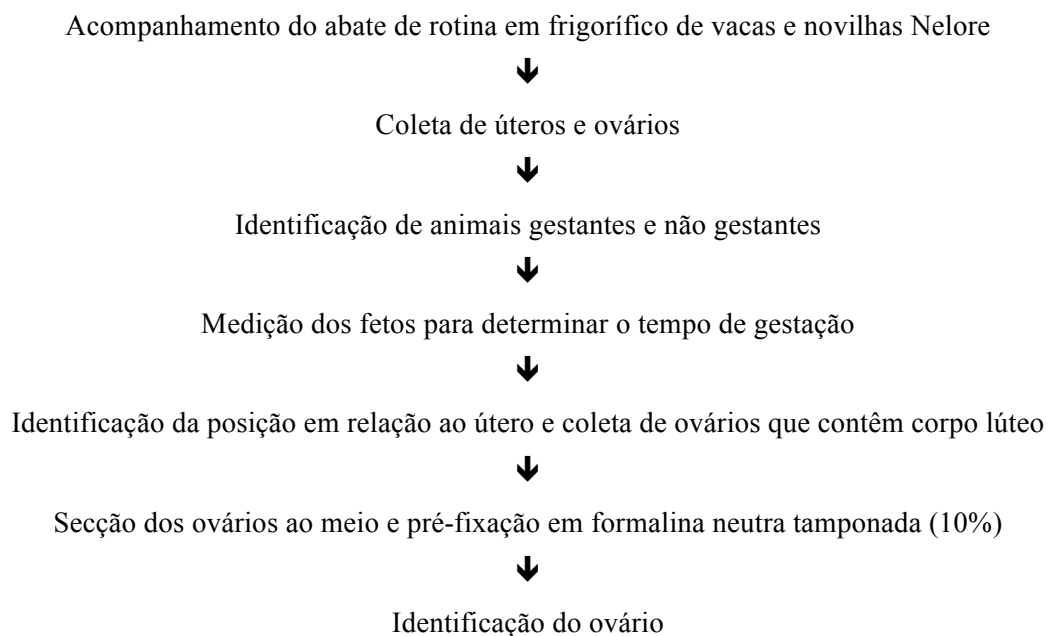
Tampão acetato (pH 1,7) – 100mL

Ácido acético – 0,2M (1,2mL de ácido acético glacial em 100mL de água destilada)

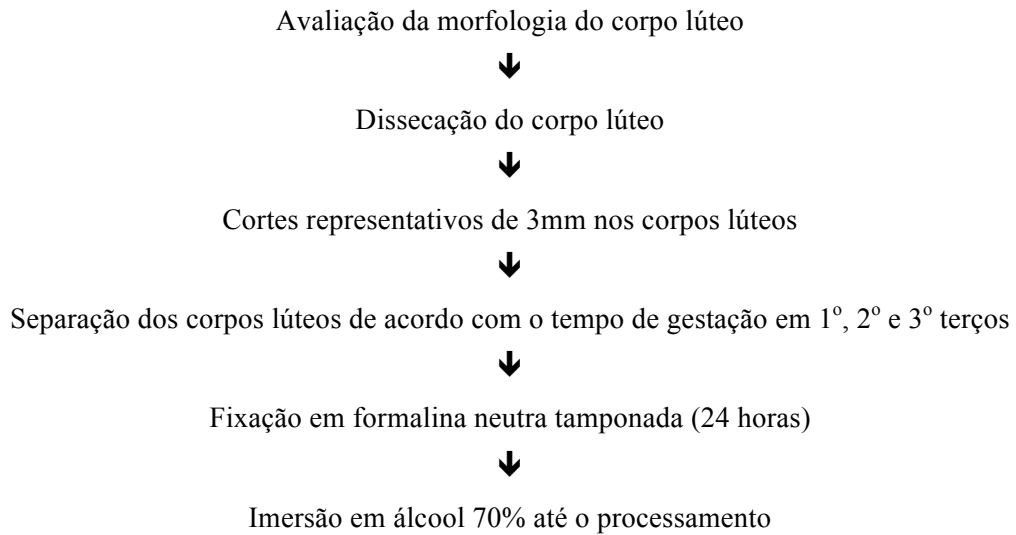
Coloração

Mergulhar as lâminas no corante por 15 a 20 minutos. Diferenciar em tampão acetato (pH 1,7) por 12 a 24 horas. Lavar em água corrente. Montar as lâminas.

ANEXO 2: Coleta de amostras de corpo lúteo no frigorífico



ANEXO 3: Avaliação e classificação dos corpos lúteos em laboratório



ANEXO 4: Processamento histológico do corpo lúteo

Desidratação: álcool 70%, 80%, 90%, absoluto I, II e II - imersão por 30 minutos em cada um



Diafanização: Xilol I, II e III – Imersão por 30 minutos em cada um



Impregnação: 3 banhos de 30 minutos em paraplast



Inclusão em paraplast



Microtomia: cortes com 3µm de espessura



Coloração: Hematoxilina-eosina, Tricrômico de Gomori, Azul de Tluidina, Azul de Bromofenol e Xylidine Ponceau



Montagem das lâminas

ANEXO 5: Análise de Variância (ANOVA)

1. Proporção volumétrica

Fontes de Variação	Graus de liberdade
Total (24-1)	23
Tratamentos (4-1)	3
Erro	20

2. Diâmetro nuclear médio de células lúteas

Fontes de Variação	Graus de liberdade
Total (24-1)	23
Tratamentos (4-1)	3
Erro	20

3. Células lúteas com grânulos citoplasmáticos

Fontes de Variação	Graus de liberdade
Total (24-1)	23
Tratamentos (4-1)	3
Erro	20

ANEXO 6

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 247 / 2013, relativo ao projeto intitulado "GRÂNULOS CITOPLASMÁTICOS E APOPTOSE NO CORPO LÚTEO DE VACAS NELORE (Bos taurus indicus) GESTANTES E NÃO-GESTANTES", que tem como responsável Antônio de Pinho Marques Jr., está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 01/10/2013. Este certificado espira-se em 01/10/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 247 / 2013, related to the Project entitled "Apoptosis and cytoplasmic granules in the corpus luteum of cyclic and pregnant Nelore cow (Bos taurus indicus)", under the supervision of Antônio de Pinho Marques Jr., is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 01/10/2013. This certificate expires in 01/10/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 01/10/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br