

Patrícia Ramos Xavier

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO CORPO LÚTEO  
DE VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*) NOS TERÇOS  
INICIAL, MÉDIO E FINAL DA GESTAÇÃO

Dissertação apresentada na Escola de  
Veterinária da 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

2011

Xavier, Patrícia Ramos, 1976-

Características morfológicas do corpo lúteo de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) nos terços inicial, médio e final da gestação / Patrícia Ramos Xavier. - 2011.

55 p. : il.

Orientador: Antônio de Pinho Marques Júnior

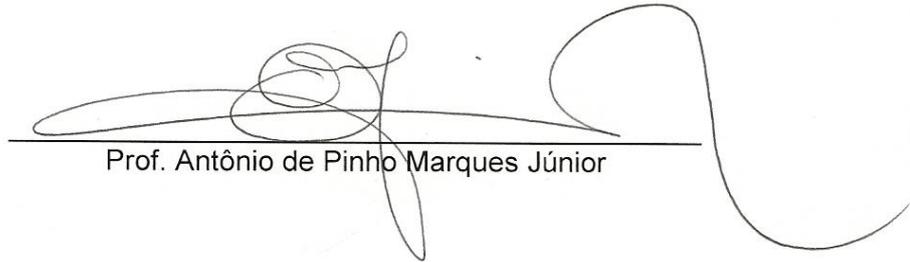
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Nelore (Zebu) – Reprodução – Teses. 2. Vaca – Reprodução – Teses. 3. Corpo lúteo – 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 2

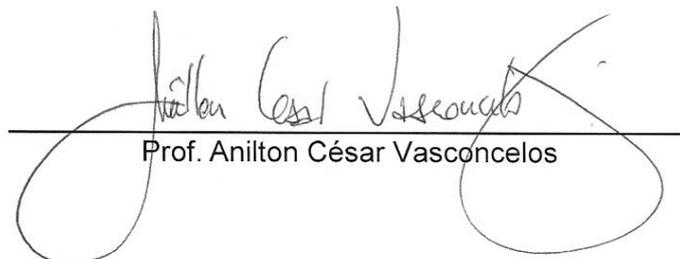
Dissertação defendida e aprovada 01 de abril de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Antônio de Pinho Marques Júnior



Prof.<sup>a</sup>. Mariana Machado Neves



Prof. Anilton César Vasconcelos

À Deus, minha fortaleza e segurança.

Ao meu esposo Max, pelo carinho, pelas palavras de encorajamento e pelo companheirismo e paciência nas horas difíceis. Nenhuma palavra poderá expressar o meu amor por você e a minha gratidão a Deus por ter lhe colocado ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Antônio de Pinho Marques Júnior, pela acolhida, por ter acreditado em mim, pelos ensinamentos, apoio, carinho e agradáveis conversas regadas a um bom cafezinho.

À Faride, pelo carinho e atenção ao me receber em sua casa.

À minha família, pelo apoio, incentivo e compreensão.

Aos amigos do “gruPINHO”, pela amizade, companheirismo, estímulo e agradáveis momentos que passamos juntos.

Aos alunos de iniciação científica, Rafael e Paulo, pela valiosa ajuda na fase experimental deste trabalho. Muito obrigada!

Ao Prof. Luiz Renato de França - ICB/UFMG, que disponibilizou seu laboratório para a realização de parte do processamento do material. E também à Mara, pela atenção e tempo dispensados a mim para o aprendizado das técnicas histológicas.

A todos do laboratório de Biologia Estrutural/UFV, pelo carinho que me receberam, pela ajuda, disponibilidade e conhecimento.

Ao Prof. Guilherme Ribeiro Vale - PUC/Betim, pelo incentivo e por acreditar em minha capacidade.

Ao Prof. José Monteiro - EV/UFMG, pela atenção, estímulo e principalmente pela disposição em me ajudar sempre que precisei. Obrigada!

A todos os docentes da EV/UFMG, pelo conhecimento e privilégio da convivência.

Aos funcionários do colegiado de pós-graduação, secretaria do DCCV e setor de reprodução, pelo convívio e ajuda.

A todos os amigos da pós-graduação.

À minha amiga Amanda, pelo carinho, paciência, apoio, companheirismo, pelas palavras de incentivo e por momentos inesquecíveis que compartilhamos nesta nossa trajetória do mestrado. Valeu amiga!

Às amigas Lúcia e Paula, pelo incentivo, carinho e ajuda em todos os momentos que precisei. Paula, sua colaboração foi muito importante! Obrigada!

À UFMG, pela oportunidade de cursar o mestrado.

Gestos de carinho, atenção e delicadeza me fizeram perceber o quanto algumas pessoas foram importantes em minha caminhada. Obrigada a todos que, de alguma maneira, participaram deste momento tão importante da minha vida!

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar”  
(Anatole France).

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
<b>2.1 Ciclo estral</b> .....	15
<b>2.2 Regulação endócrina do ciclo estral</b> .....	15
<b>2.3 Ovários</b> .....	16
2.3.1 <i>Características anatômicas</i> .....	16
2.3.2 <i>Dinâmica folicular</i> .....	16
2.3.3 <i>Ovulação</i> .....	19
<b>2.4 Corpo lúteo</b> .....	20
2.4.1 <i>Histórico</i> .....	20
2.4.2 <i>Formação do corpo lúteo</i> .....	21
2.4.3 <i>Características macroscópicas</i> .....	22
2.4.4 <i>Células luteais</i> .....	23
2.4.5 <i>Produção de progesterona</i> .....	26
2.4.6 <i>Luteólise</i> .....	27
2.4.7 <i>Avaliação do corpo lúteo</i> .....	29
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
<b>3.1 Local e animais</b> .....	30
<b>3.2 Determinação da idade gestacional</b> .....	30
<b>3.3 Processamento do material</b> .....	31
3.3.1 <i>Avaliação macroscópica do corpo lúteo e colheita para histologia</i> .....	31
<b>3.4 Descrição histológica do corpo lúteo</b> .....	32
<b>3.5 Proporção volumétrica do corpo lúteo</b> .....	32
<b>3.6 Diâmetro nuclear médio das células luteínicas maiores e menores</b> .....	32
<b>3.7 Avaliação estatística</b> .....	32
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>4.1 Avaliação macroscópica</b> .....	34
<b>4.2 Avaliação histológica do corpo lúteo</b> .....	34
<b>4.3 Proporção volumétrica do corpo lúteo</b> .....	36
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	43
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	43
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>ANEXOS</b> .....	51

---

## LISTA DE TABELAS

---

- Tabela 1** - Frequência do corpo lúteo nos ovários esquerdo e direito de animais Nelore gestantes. ....34
- Tabela 2** - Médias e desvios-padrão da proporção volumétrica do citoplasma das células luteínicas, núcleo das células luteínicas, células endoteliais e pericitos, e tecido conjuntivo e fibroblastos do corpo lúteo de vacas Nelore gestantes, no primeiro (0-100), segundo (100-180) e terceiro (180-280) trimestres de gestação. .... 36
- Tabela 3** - Diâmetro nuclear médio, em micrômetros ( $\mu$ ), das células luteínicas maiores e menores do corpo lúteo de vacas Nelore gestantes no primeiro (0-100), segundo (100-180) e terceiro (180-280) trimestre de gestação. .... 37

---

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1** - Mensuração do comprimento ápico-caudal do feto (cm) para determinação da idade gestacional..... 30
- Figura 2** - Fotomicrografias de ovário e corpo lúteo de animais Nelore gestantes: A) Epitélio simples cúbico (seta), estroma ovariano (EO) e túnica albugínea (TA). HE-10x. B, C e D) Tecido conjuntivo presente no estroma ovariano e emitindo septos para o interior do CL (setas). (B) tricrômico de Gomory-10x, (C e D) HE-10x. E) Estroma ovariano (EO) apresentando folículos em desenvolvimento (setas) e *corpus albicans* (CA). HE-10x. F) Estroma ovariano (EO) apresentando núcleo de fibroblastos (seta) e cápsula de tecido conjuntivo ao redor do CL (seta em negrito). Tricrômico de Gomory-10x..... 38
- Figura 3** - Fotomicrografias do corpo lúteo de animais Nelore gestantes: A) 141 dias de gestação (2º terço), destacando célula luteínica maior (M), célula luteínica menor (m), núcleo de fibroblastos (seta) e fibroblastos contornando a célula esteroidogênica (seta grossa). HE-40x. B) 185 dias de gestação (2º terço), evidenciando tecido conjuntivo ao redor das células esteroidogênicas (setas), célula luteínica maior (M) e menor (m) e capilar (cabeça de seta). Tricrômico de Gomory-40x. C) 79 dias de gestação (1º terço), destacando grande vascularização do CL com a presença de arteríolas de vários diâmetros. HE-40x. D) 77 dias de gestação (1º terço), destacando diversos capilares distribuídos entre as células esteroidogênicas. HE-40x. E) 160 dias de gestação (2º terço), com área de cicatriz central (C) no CL e septos de tecido conjuntivo (setas). HE-10x. F) 241 dias de gestação (3º terço), também com área de cicatriz central e evidenciando a presença de vasos linfáticos (VL), tecido conjuntivo cicatricial (seta grossa) e células esteroidogênicas (CE). HE-10x. .... 39
- Figura 4** - Fotomicrografias do corpo lúteo de animais Nelore gestantes: A) com 79 dias de gestação (1º terço), mostrando células esteroidogênicas compactas com pouco espaço intercelular. HE-10x. B) 141 dias de gestação (2º terço), células esteroidogênicas compactas, célula luteínica maior (M) e menor (m) e fibroblasto (seta). HE-40x. C) 261 dias de gestação (3º terço), células esteroidogênicas menos compactas destacando espaço intercelular com aumento de matriz extracelular (setas), mostrando célula luteínica maior (M) e menor (m). HE-40x. D) 241 dias de gestação (3º terço) apresentando também células esteroidogênicas menos compactas, matriz extracelular (setas), célula luteínica maior (M) e menor (m), fibroblastos (cabeça de seta) e capilar (c). HE-40x. E) 141 dias de gestação (2º terço), destacando célula em apoptose (seta). HE-10x. F) 119 dias de gestação (2º terço), célula em apoptose (seta) e matriz extracelular (cabeça de seta). HE-40x ..... 40

**Figura 5** - Fotomicrografias do corpo lúteo de animais Nelore gestantes: A) 3º terço de gestação mostrando a presença de grânulos corados em vermelho em grande parte das células luteínicas maiores do CL. Tricrômico de Gomory-5x. B) 3º terço de gestação evidenciando os grânulos (setas) presentes nas células luteínicas maiores (M) e ausência de grânulos nas células luteínicas menores (m), capilares (cabeça de seta). Tricrômico de Gomory-40x. C) 2º terço de gestação, célula luteínica maior com grânulos (seta) e célula menor (m), capilares (cabeça de seta) Tricrômico de Gomory-40x. D) 2º terço de gestação, células esteroidogênicas com grânulos (setas) Tricrômico de Gomory-10x. .... 41

**Figura 6** - Fotomicrografias do corpo lúteo de animais Nelore gestantes: A) 202 dias de gestação (3º terço) mostrando células esteroidogênicas do CL sem a presença de grânulos. PAS-10x. B) 234 dias de gestação (3º terço) evidenciando célula luteínica maior (M) e menor (m), podemos observar pouca reação do corante com os grânulos encontrados na célula (seta). PAS-40x. C) 202 dias de gestação (3º terço), mostrando a presença de grânulos no citoplasma das células esteroidogênicas. Xylidine Ponceau-10x. D) 202 dias de gestação (3º terço), destacando a presença de grânulos no citoplasma das células esteroidogênicas maiores (setas), capilar (cabeça de seta). Xylidine Ponceau-40x. .... 42

## RESUMO

Características morfológicas do corpo lúteo foram estudadas em 48 vacas Nelore gestantes abatidas no Frigorífico Mata Boi, localizado na cidade de Araguari-MG, no Triângulo Mineiro. Os ovários coletados com corpo lúteo foram identificados e divididos em três grupos, considerando-se o estágio de gestação classificado pelo tamanho do concepto: (1º estágio) 11 animais com gestação de até 90 dias, (2º estágio) 20 animais com gestação entre 90 e 180 e (3º estágio) 17 animais com gestação entre 180 e 261. O corpo lúteo foi dissecado do ovário e submetido a processamento para as avaliações histológicas em microscopia óptica. A frequência do corpo lúteo foi maior no ovário direito. O diâmetro nuclear médio das células luteínicas maiores e menores não variou nos três grupos. Os animais com gestação até 100 dias apresentaram maior proporção de células endoteliais e pericitos. O terceiro estágio de gestação apresentou menor proporção de citoplasma e núcleo de células luteais esteroidogênicas, maior número de células em degeneração e um aumento do número de tecido conjuntivo, fibroblastos e matriz extracelular.

**Palavras-chave:** vaca Nelore, gestação, corpo lúteo, proporção volumétrica.

## ABSTRACT

Morphological characteristics of the *corpus luteum* were evaluated in 48 pregnant Nelore cows slaughtered in the slaughterhouse located in the city of Araguari-MG. The ovaries with the *corpus luteum* were collected, identified and divided into three groups, considering the stadium of gestation and classified for the size of foetus: (Group 1) eleven animals with gestation of up to 90 days, (Group 2) twenty animals with gestation between 90 and 180 days and (Group 3) 17 animals with gestation between 180 and 261 days. The *corpus luteum* were dissected and submitted the histological processing and evaluations under light microscopy. The frequency of the *corpus luteum* was higher in the right ovary. The mean nuclear diameter of the large and small luteinic cells did not alter in the three groups. The animals with gestation up to 100 days presented higher proportion of endotelial cells and pericytes. The third period of gestation presented smaller proportion of cytoplasm and nucleus of steroidogenical luteal cells, higher number of the degenerated cells and an increase of the conjunctive tissue, fibroblasts and extracellular matrix percentage.

**Key-words:** Nelore cow, gestation, *corpus luteum*, volumetric proportion.

## 1 INTRODUÇÃO

Os bovinos são animais biungulados pertencentes à família Bovidae, divididos em duas subespécies: *Bos taurus indicus*, originária da Índia, Ásia e África, conhecida como zebuína ou indiana e a *Bos taurus taurus*, originária do continente europeu, conhecida como taurina ou européia.

O rebanho zebuíno desempenha papel importante na pecuária brasileira, selecionado para a produção de leite ou carne, sendo que algumas raças apresentam dupla aptidão. No Brasil existem dez raças zebuínas (Nelore, Nelore Mocha, Gir, Gir Mocha, Guzerá, Sindi, Brahman, Tabapuã, Cangaiam e Indubrasil). A raça Nelore se destaca como sendo a responsável por aproximadamente 80% de toda a produção de carne do país, constituindo um importante patrimônio genético para a bovinocultura. Características ligadas ao animal como rusticidade, resistência e aptidão para leite ou corte beneficiam a disseminação do zebu por todo o território nacional.

Segundo BÓ *et al.* (2003), estes animais são superiores em desempenho aos da raça *Bos taurus taurus* quando criados em ambientes tropicais ou subtropicais, onde são submetidos a agentes estressantes como altas temperaturas, umidade, ectoparasitos e pasto de baixa qualidade.

Hoje a situação econômica da pecuária mundial exige alta produtividade, visando o retorno do capital investido. A reprodução entra como um componente de grande importância para um desempenho econômico lucrativo e de grande rentabilidade para a pecuária de corte. Assim, as técnicas de inseminação artificial, sincronização de estro e transferência de embriões são recursos utilizados para

augmentar os índices reprodutivos, refletindo diretamente no custo/benefício da atividade.

Em função do importante papel econômico e social dos rebanhos zebuínos na pecuária brasileira e do interesse na aquisição e multiplicação de animais de elevado valor genético, há necessidade de estudos que busquem compreender cada vez mais as peculiaridades fisiológicas do zebuíno. Tal situação justifica-se, principalmente, considerando que grande parte dos trabalhos envolvendo metodologias e biotecnologias da reprodução são desenvolvidas em taurinos e nem sempre refletem as características da raça Nelore.

A importância do corpo lúteo está no seu papel fisiológico, considerado uma glândula endócrina transitória que produz várias substâncias, sendo a progesterona seu principal produto de secreção (Senger, 2003; Miyamoto e Shirasuna, 2009). A progesterona exerce importante ação biológica, atuando em vários órgãos-alvo como hipotálamo, hipófise, ovário, tubas uterinas, útero, cérvix, vagina e glândula mamária, além de controlar a duração do ciclo estral, ovulações e manter a gestação (Wiltbank e Niswender, 1992).

Na literatura consultada não foram encontrados trabalhos sobre a proporção volumétrica do corpo lúteo gestacional de vacas Nelore. O conhecimento da formação, da manutenção do corpo lúteo, das estruturas que o compõem e da luteólise é de fundamental importância para o aprimoramento de biotecnias reprodutivas e desenvolvimento de estratégias para melhorar as taxas de concepção, o controle hormonal do ciclo ovariano, implantação de medidas de manejo e tratamentos que minimizem problemas de fertilidade do animal e do rebanho.

## **1.1 Hipótese**

-Características histológicas e proporção volumétrica do corpo lúteo da vaca Nelore gestante diferem no terço inicial, médio e final da gestação.

## **1.2 Objetivos**

-Descrição histológica do tecido luteal nos terços inicial, médio e final da gestação;

- Proporção volumétrica do corpo lúteo nos terços inicial, médio e final da gestação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ciclo estral

A partir da puberdade, a fêmea entra num período de ciclicidade reprodutiva denominado ciclo estral, que consiste em uma série de eventos que se iniciam com o estro e terminam com o estro subsequente (Hafez e Hafez, 2004).

A fêmea bovina tem um tipo de ciclicidade chamada de poliestral que se caracteriza por uma distribuição uniforme dos ciclos estrais (intervalos de 21 dias) ao longo de todo o ano (Senger, 2003). Durante a fase de domesticação, os bovinos foram selecionados contra a estacionalidade, facilitando a concepção ao longo do ano. Entretanto, as vacas de corte ainda podem ser sensíveis a fotoperiodicidade (Hafez e Hafez, 2004).

Segundo Randel (1994), as fêmeas zebuínas apresentam característica sazonal com baixa eficiência reprodutiva nos períodos de dias mais curtos. Durante o inverno, a função do corpo lúteo e a onda pré-ovulatória do Hormônio Luteotrópico (LH) são diferentes das observadas nos meses de verão (Rhodes *et al.*, 1982). Mas há evidências de que a estação do ano não exerce influência sobre as características do desenvolvimento folicular (Zeitoun *et al.*, 1996; Borges *et al.*, 2004).

Assim, casos de anestro e infertilidade, observados nos meses de outono e inverno, provavelmente são mais decorrentes de manejo nutricional e observação de estro inadequada do que pela sazonalidade (Borges *et al.*, 2004). Estes fatores podem levar a erros na interpretação do efeito da estação do ano sobre a função reprodutiva dos zebuínas.

O estro é definido como sendo o período em que a fêmea está receptiva sexualmente e

seu início é designado como dia 0 do ciclo (Senger, 2003; Hafez e Hafez, 2004). A duração do estro é em torno de 16-18 horas, mas, de acordo com Orihuela (2000), tem alta variabilidade individual, podendo variar de 1 a 150 horas, do início da aceitação até o final da receptividade sexual. O comportamento de estro pode sofrer influência de fatores como manejo, estresse, adaptação, clima, ambiente social, idade, genética e a presença ou ausência do touro (Randel, 1984; Allrich, 1993; Orihuela, 2000).

Fêmeas *Bos indicus* apresentam estros mais curtos, aproximadamente 10 horas (Pinheiro *et al.*, 1998; Baruselli *et al.*, 2007), com menor intensidade de manifestação (Galina *et al.*, 1982), intervalo entre final do estro e a ovulação de 15-17 horas (Barros *et al.*, 1995) e com um elevado percentual de animais iniciando a manifestação de estro no período noturno, entre 18 e 6 horas (Galina *et al.*, 1996; Pinheiro *et al.*, 1998; Marques, 2004). Em raças taurinas se observa uma maior duração do estro, em média 20 horas (Lyimo *et al.*, 2000) e ocorrendo, na maioria dos casos, pela manhã (Solano *et al.* 1982). O intervalo entre final de estro e ovulação varia de 28 a 32 horas (Hunter e Wilmut, 1984).

### 2.2 Regulação endócrina do ciclo estral

O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos que envolvem principalmente os hormônios hipotalâmicos (GnRH - hormônio liberador de gonadotrofinas), hipofisários (LH - hormônio luteinizante e FSH - hormônio folículo estimulante) e gonadais (E2 - estradiol, P4 - progesterona e inibina)

(Vizcarra *et al.*, 1997; Hafez e Hafez, 2004).

O GnRH é um decapeptídeo sintetizado pelas células neuroendócrinas do hipotálamo, sendo liberado sob a forma de pulsos e atingindo a adenohipófise através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, onde estimula a secreção das gonadotrofinas FSH e LH. Essas gonadotrofinas são liberadas de maneira pulsátil na circulação sistêmica e atuam nas gônadas regulando a gametogênese e a secreção dos esteróides gonadais (Vizcarra *et al.*, 1997; Senger, 2003).

O FSH estimula o crescimento e a maturação do folículo ovariano. O crescimento sérico do FSH precede a emergência de cada onda folicular e diminui somente após o folículo dominante ser selecionado (Ginther *et al.*, 1996). Quando o folículo perde a sua dominância, ocorre um novo aumento da concentração de FSH e subsequente emergência da próxima onda folicular. Este hormônio, isoladamente, não causa secreção de estrógenos pelo folículo ovariano, uma vez que necessita da presença do LH para estimular a produção estrogênica. O FSH promove também um aumento de receptores para LH, induzindo a sensibilidade das células da granulosa a este hormônio (Senger, 2003; Hafez e Hafez, 2004).

O LH é necessário nas fases de recrutamento, seleção e dominância folicular, além de ser responsável pela ruptura da parede folicular, ovulação e estímulo da atividade luteotrófica. Concentrações tônicas ou basais de LH atuam em conjunto com o FSH no sentido de induzir a secreção de estrógenos pelo folículo ovariano desenvolvido (Hafez e Hafez, 2004).

## **2.3 Ovários**

### **2.3.1 Características anatômicas**

Os ovários são órgãos pares do aparelho reprodutor feminino que desempenham funções exócrinas, ao produzir os ovócitos e endócrinas envolvidas na produção dos hormônios ovarianos, principalmente estrógeno e progesterona (Hafez e Hafez, 2004).

Estão localizados na cavidade abdominal e seu tamanho e estrutura têm grande variação entre as espécies, idade e fases do ciclo estral. Na vaca, os ovários têm a ponta mais aguçada na extremidade uterina e não possuem fossa de ovulação. Na fêmea não gestante os ovários estão normalmente situados próximos ao centro da margem lateral da entrada pélvica, cranialmente à artéria ilíaca externa (Sisson e Grossman, 1986).

Os ovários são revestidos por um epitélio superficial cúbico, contínuo com o mesovário. Sob o epitélio há uma espessa camada de tecido conjuntivo denso chamada de túnica albugínea, que é interrompida pelo crescimento de folículos e corpos lúteos. Logo abaixo da albugínea, o ovário é dividido em uma camada externa chamada córtex e uma camada interna, a medular. O córtex é uma larga zona periférica que contém folículos em diversas fases de crescimento, corpos lúteos e estroma constituído por tecido conjuntivo frouxo. A medula é a área mais interna, contendo numerosos vasos sanguíneos, linfáticos, nervos, tecido conjuntivo frouxo e fibras musculares lisas que são contínuas com as do mesovário (Dellmann e Brown, 1982; Banks, 1992).

### **2.3.2 Dinâmica folicular**

Nos ovários do animal em idade reprodutiva podem ser encontrados quatro diferentes tipos de folículos, que representam os estádios de desenvolvimento e maturidade

folicular. Os *primordiais* ou folículos em repouso são microscópicos e consistem de um oócito rodeado por uma camada de células somáticas achatadas denominadas pré-granulosa. Estes folículos desenvolvem-se para uma forma mais avançada chamada de folículos *primários*, quando a única camada de células da granulosa ao redor do oócito torna-se cuboidal. Os folículos *secundários* ou pré-antrais apresentam duas ou mais camadas de células da granulosa desenvolvidas, entrando numa fase de crescimento intensivo. Os folículos *terciários* ou antrais em maturação são caracterizados por uma cavidade repleta de fluido folicular, denominada antro. Quando o folículo se torna dominante é chamado de folículo pré-ovulatório ou de Graaf (Dellmann e Brown 1982; Sirois e Fortune, 1988).

O desenvolvimento folicular na vaca ocorre em um padrão de ondas que acontece nos vários estádios reprodutivos dos bovinos. Cada onda envolve um processo de recrutamento, seleção e dominância que culmina com a ovulação do folículo dominante (Fortune, 1994; Nogueira, 2008). A duração destas ondas é de cerca de 8-10 dias e a sua frequência depende da presença de um corpo lúteo funcional (Barros e Nogueira, 2001; Nogueira, 2008). Essas ondas podem ser detectadas nos dias 0 e 9 pós-ovulação, para o padrão de duas ondas, ou 0, 9 e 16 para ciclos com três ondas (Kastelic *et al.*, 1990; Borges *et al.*, 2004).

Na fase de recrutamento, um grupo de pequenos folículos primordiais, de tamanho entre 3 a 5mm, responsivos às gonadotropinas são estimulados a iniciar um crescimento progressivo (Fortune, 1994; Barros e Nogueira, 2001). Destes, alguns sofrem atresia e outros continuam a crescer produzindo moderadas quantidades de estrógeno e inibina. O folículo de maior tamanho, chamado de dominante, destaca-se e passa a crescer mais rápido que os demais, produzindo altas quantidades de estrógeno e

inibina. As concentrações de FSH são reduzidas a valores muito baixos, insuficientes para manter o desenvolvimento dos folículos subordinados, mas suficientes para o crescimento do folículo dominante, estabelecendo-se, então, o fenômeno da dominância folicular (Lucy *et al.*, 1992; Ginther *et al.*, 2003).

Na presença de um corpo lúteo, as elevadas concentrações de progesterona levam à liberação do GnRH em baixas quantidades. Consequentemente, o FSH e LH também estarão baixos e o folículo dominante atingirá o seu diâmetro máximo, permanecendo funcional por poucos dias (Sirois e Fortune, 1988).

O LH tem um papel muito importante no destino final do folículo dominante, pois a ovulação só ocorrerá com aumento tanto da frequência quanto da amplitude dos pulsos de liberação. Em altas concentrações de progesterona, esta pulsatilidade do LH não ocorre e o folículo entra em atresia (Coutinho *et al.*, 2007). A perda do folículo dominante resultará em um aumento do FSH que irá estimular a emergência de uma nova onda (Barros e Nogueira, 2001). Com a luteólise, ocorre um declínio da progesterona removendo o *feedback* negativo ao hipotálamo que favorece o desenvolvimento e crescimento folicular até a ovulação do folículo dominante (McCracken *et al.*, 1999).

Existem diferenças na dinâmica folicular entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. O número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral nos animais Taurinos é predominantemente de duas e três ondas (Ginther *et al.*, 1989). Entretanto, em Zebuínos, vários estudos relatam a maior incidência de três ondas, sendo também observada a presença de quatro (Figueiredo *et al.*, 1997; Reis *et al.*, 2005; Coutinho *et al.*, 2007) e de até cinco ondas de crescimento folicular por ciclo estral (Vianna *et al.*, 2000). Observou-se, também,

diferentes comprimentos de onda em um mesmo animal (Reis *et al.*, 2005) e alterações no número destas de um ciclo para outro (Coutinho *et al.*, 2007).

A ocorrência de duas ondas tem sido associada a ciclos mais curtos, enquanto três ou quatro ondas a ciclos mais longos (Coutinho *et al.*, 2007). Segundo Ginther *et al.* (1996), a duração da fase lútea determina o número de ondas de crescimento folicular e a ocorrência de uma terceira onda está relacionada com uma fase luteal mais prolongada. Borges *et al.* (2004), descreveu que há diferença no intervalo entre estros de vacas Zebu, sendo o mesmo menor nos ciclos com duas ondas (18 dias) quando comparado com ciclos de três ondas (20 dias) e de quatro ondas (25 dias).

Coutinho *et al.* (2007), em estudo com vacas Guzerá, observaram diferença na taxa de crescimento do folículo em ciclos com duas e três ondas. Nos ciclos de duas ondas, a velocidade de crescimento é menor ( $0,80 \pm 0,01$ ) do que a do ciclo com três ondas ( $1,09 \pm 0,10$ ). Isto ocorre porque o folículo da terceira onda está sob baixa concentração de progesterona. Em relação à persistência, o folículo dominante de ciclos com duas ondas persistiu por mais dias do que o de ciclos com três ondas (Borges *et al.*, 2004; Coutinho *et al.*, 2007).

O diâmetro máximo do folículo dominante é variável, quando comparado em fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*. Em *Bos taurus*, são descritos diâmetros máximos de folículos dominantes, em ciclos com duas ondas, de 17,1 e 16,5 mm, para a primeira e segunda onda folicular, e de 16,0 - 12,9 e 13,9mm, em ciclos de três ondas (Ginther *et al.*, 1989). Em *Bos indicus*, os diâmetros relatados foram de 13 e 14mm para duas ondas, 13,0, 10,6 e 13,2mm para três ondas (Borges *et al.*, 2004), 10,75 - 9,75 - 9,0 e 13,25 para quatro ondas (Viana *et al.*, 2000). O menor valor com relação aos Zebuínos pode estar relacionado à menor taxa de

crescimento dos folículos dominantes (Figueiredo *et al.*, 1997).

Foi observado um menor diâmetro do segundo folículo dominante do ciclo de três ondas, que pode ser explicado devido à baixa concentração plasmática de progesterona na primeira onda (corpo lúteo em formação). A segunda já começa na presença de um corpo lúteo totalmente formado, secretando elevadas concentrações de progesterona suficientes para inibir a liberação de LH. A terceira onda coincide com a luteólise e redução da secreção de progesterona pelo corpo lúteo, resultando no aumento da frequência de pulsos de LH. Este fato também pode estar relacionado à menor duração de crescimento dos folículos da segunda onda (4,6 e 5,4 dias), quando comparado com os folículos da primeira (6,3 dias) e terceira ondas (6,1 dias) (Borges *et al.*, 2004).

Com relação aos folículos subordinados, o diâmetro máximo foi de 6,4 a 8,0mm (Borges *et al.*, 2004; Coutinho *et al.*, 2007), com um período médio de crescimento de 2,6 dias, e sua persistência foi de 4,7 a 9,5 dias. Estes valores são próximos aos encontrados em Taurinos (Borges *et al.*, 2004).

Além da diferença no número de ondas, existem trabalhos que descrevem um maior recrutamento de folículos menores que 5mm por onda de crescimento folicular em *Bos indicus* ( $33,4 \pm 3,2$ ) do que em *Bos taurus* ( $25,4 \pm 2,5$ ) (Baruselli *et al.*, 2007; Nogueira, 2008). Esse aumento do número de folículos ovarianos pode estar relacionado às diferenças nos sistemas ovarianos de insulina e IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. Simpson *et al.* (1994), em um estudo com vacas Brahman, relataram maiores concentrações plasmáticas de IGF-I e menores concentrações de FSH, quando comparadas com vacas Angus. Sugeriram que o maior número de folículos

recrutados nas vacas Brahman possa ser devido às altas concentrações de IGF-I. Essa diferença, nas concentrações de FSH e de IGF-I, resulta em folículos menos persistentes, levando a um maior número de ondas foliculares e maior incidência de ciclos com quatro ondas (Baruselli *et al.*, 2007; Nogueira, 2008).

A divergência folicular é marcada pela continuidade no desenvolvimento do maior folículo e declínio ou parada no crescimento dos outros. Em *Bos taurus*, o desvio inicia-se por volta de 2,8 dias após a emergência, quando o folículo dominante atinge em média 8,5 mm e o folículo subordinado 7,2mm (Ginther *et al.*, 1996). Em *Bos indicus*, este período é de 2,5 a 2,7 dias pós emergência e com diâmetro médio do folículo de 6,0mm (Sartorelli *et al.*, 2005).

### 2.3.3 Ovulação

A ovulação acontece, na maioria das espécies, durante o estro. Na vaca ocorre cerca de 10-12 horas após o final do estro, ou em média 30 horas após o seu início (Nalbandov e Casida, 1942; Foote, 1975).

Normalmente em cada ciclo estral, é liberado somente um folículo. Há relatos de taxa de 10% de duplas ovulações e mais raramente de tripla ovulação. A ovulação pode ocorrer em qualquer um dos ovários e em qualquer ponto destes. Entretanto, cerca de 60% ocorre no ovário direito e 40% no esquerdo. A primeira ovulação pós-parto ocorre com maior frequência no ovário contralateral ao corno uterino gestante (Roberts, 1986; Hafez e Hafez, 2004).

Estudos mostram que o folículo dominante adquire receptores de LH no momento da divergência, mas este folículo ainda não é responsivo a ovulação. Em taurinos, a capacidade ovulatória ocorre somente após os folículos alcançarem 10mm de diâmetro (Sartori *et al.*, 2001). Fêmeas *Bos indicus* ovulam com diâmetros inferiores aos

observados em *Bos taurus*. Em um estudo realizado por Gimenes *et al.* (2005), foi constatado que 33% das fêmeas *Bos indicus* ovularam com diâmetros entre 7,0 e 8,4 mm e que a responsividade ao LH aumentou quando os folículos alcançaram diâmetros entre 8,5 e 10,0mm (80%) e superiores a 10,0mm (90%). Estes dados são importantes nos casos de indução da ovulação, já que protocolos de superestimulação podem ser obtidos precocemente em *Bos indicus*, quando comparados com *Bos taurus* (Baruselli *et al.*, 2007).

À medida que a ovulação se aproxima e o folículo está desenvolvido ao máximo, ele é projetado na superfície do ovário. Nos momentos que antecedem a ovulação, ocorre um aumento da pressão sanguínea, nos capilares foliculares, sob a ação da histamina e prostaglandina E2 (PGE2). Após o pico de LH, as células de teca interna começam a produzir progesterona que estimula localmente a síntese de uma enzima chamada colagenase. Esta enzima causa um desarranjo e digestão do colágeno na túnica albugínea levando ao aumento do fluido folicular. O acúmulo deste líquido e o aumento da pressão dos capilares linfáticos, próximos ao folículo, favorecem o aumento do volume folicular e a parede torna-se fina em uma região específica chamada estigma. Nesta área, a pressão exercida pelo folículo comprime os vasos sanguíneos, fazendo com que diminua e cesse o fluxo. Ao mesmo tempo, sob ação do LH e FSH, as células da teca interna na região do estigma perdem a sua continuidade e as uniões celulares do *cumulus oophorus* desintegram-se, ocorrendo o rompimento do folículo e liberação do ovócito. As células musculares lisas do estroma ovariano promovem contrações que facilitam a ruptura do folículo. Após a ruptura, as células neuromusculares presentes na teca interna são estimuladas pela Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), auxiliando na extrusão do ovócito. Assim que o folículo se rompe, a massa viscosa secretada pelo cumulus espalha-se,

na superfície ovariana, facilitando a captação do ovócito pela fímbria (Mcgee e Hsueh, 2000; Hafez e Hafez, 2004).

Após a ovulação, a PGE<sub>2</sub> sintetizada no ovário, auxilia na remodelação do folículo para corpo lúteo, através da ativação do plasminogênio. Este, por sua vez, é convertido em plasmina, que é uma enzima ativa responsável pela remodelação tecidual. Além disso, o plasminogênio auxilia na dissolução do coágulo do corpo hemorrágico, ajudando na remodelação do folículo a corpo lúteo (Senger, 2003).

## 2.4 Corpo lúteo

### 2.4.1 Histórico

As primeiras citações da existência do corpo lúteo (CL) como uma estrutura do ovário foram realizadas por vários anatomistas nos séculos 16 e 17. Coiter, em 1573, estudando o ovário de uma mulher relatou pela primeira vez a ocorrência de cavidades preenchidas por conteúdo amarelado. Durante esta fase, as estruturas do ovário foram identificadas e descritas, mas suas funções e regulação não foram avaliadas. O nome da estrutura *corpus luteum* (corpo amarelo) foi atribuído por Marcello Malpighi, entre 1628 e 1694, utilizando a microscopia para avaliações realizadas em ovários de vacas. Regnier Graaf, entre 1641 e 1673, descreveu os folículos antrais de Graaf e realizou a primeira descrição detalhada dos “corpos globulares” que se formavam no lugar do folículo, desde o acasalamento até o parto. O autor, com este estudo, correlacionou o número de corpos lúteos com o número de fetos presentes no útero (Niswender *et al.*, 2000; Bertan *et al.*, 2006).

Em 1897, Beard documentou que o CL seria responsável por cessar a ovulação e estro durante a gestação. Prenant, em 1898, propôs que o CL sintetizava substâncias que

favoreciam o desenvolvimento do embrião. No ano de 1903, Fraenkel e Cohn confirmaram esta teoria, em um trabalho, onde removiam os ovários de coelhas gestantes e observavam que ocorria a morte dos embriões, demonstrando com isso que o CL é necessário para a implantação e manutenção da gestação (Niswender *et al.*, 2000; Bertan *et al.*, 2006). Em 1929, Corner e Allen, utilizando extrato de corpo lúteo suíno, mimetizaram a ação luteal no útero e manutenção da gestação em animais ovariectomizados. Posteriormente, grupos de pesquisadores isolaram um hormônio que foi nomeado progesterona. Em 1934, Slotta identificou a fórmula estrutural da progesterona que foi sintetizada, neste mesmo ano, por Butenandt, Westphall e Coblér (Bertan *et al.*, 2006).

Os primeiros estudos sobre a composição celular do corpo lúteo bovino foram influenciados pelos trabalhos de Corner em 1915 e 1919, que estudou o corpo lúteo suíno. Estes trabalhos descreveram três tipos de células: células derivadas da granulosa, células pequenas com núcleo cromático arredondado (tipo I) e células alongadas com citoplasma mais escuro (Tipo II) (Hansel e Blair, 1996).

McNutt estudou o corpo lúteo do ciclo estral e da gestação, em 1924 e 1927. Ele concluiu que as células luteais derivam das células da teca e granulosa e muitas células mostram características intermediárias. Vários estudos posteriores confirmaram este achado e acrescentaram informações sobre a natureza dos vários tipos de células luteais. Estes indicaram que as células luteínicas maiores derivam das células da granulosa e as células luteínicas menores derivam das células da teca interna. Em 1965, Donaldson e Hansel, estudando o corpo lúteo bovino, descreveram que as células luteais menores respondem as luteotropinas, crescem e se desenvolvem em células luteais maiores (Hansel e Blair, 1996). Desde então, vários estudos têm sido desenvolvidos

com a finalidade de compreender os mecanismos de sua formação, manutenção e regressão (Smith *et al.*, 1994).

#### 2.4.2 Formação do corpo lúteo

A importância do corpo lúteo está no seu papel fisiológico, considerado uma glândula endócrina transitória que produz várias substâncias, sendo a progesterona seu principal produto de secreção (Miyamoto e Shirasuna, 2009). A progesterona exerce importante ação biológica ao atuar em vários órgãos-alvo, como hipotálamo, hipófise, ovário, tubas uterinas, útero, cérvix, vagina e glândula mamária, além de controlar a duração do ciclo estral e manter a gestação (Wiltbank e Niswender, 1992).

No folículo pré-ovulatório, a membrana basal, que separa as células da granulosa e da teca interna, sofre desintegração parcial e estas células começam a se misturar. Durante a ovulação, o ovócito e o fluido folicular são liberados, criando uma cavidade para o desenvolvimento do CL. Simultaneamente, ocorre o rompimento dos capilares da camada da teca e formação de uma estrutura semelhante a um coágulo conhecido como corpo hemorrágico (Smith *et al.*, 1994). Esta estrutura pode ser observada desde o momento da ovulação até o dia 3 do ciclo estral (Senger, 2003).

O corpo hemorrágico sofre uma reorganização tecidual para a formação do corpo lúteo funcional, que ocorre devido à influência de vários fatores angiogênicos e mitogênicos (Bertan *et al.*, 2006).

Mudanças hemodinâmicas estão envolvidas na remodelação tecidual, durante o final do crescimento folicular, ovulação e formação do corpo lúteo. O fluxo sanguíneo diminui, após a ovulação, e aumenta gradualmente de acordo com o aumento do volume do corpo lúteo e concentração plasmática de progesterona. Este aumento da vascularização é extremamente importante

para o desenvolvimento adequado do corpo lúteo (Acosta *et al.*, 2003).

A angiogênese é um processo raro em um animal adulto, com exceção do aparelho reprodutivo feminino, cicatrização de feridas e processos tumorais. No corpo lúteo, ocorre a expansão dos capilares tecais, migração e proliferação de células endoteliais promovendo a formação de novos vasos sanguíneos. (Tamanini e De Ambrogio, 2004).

Vários promotores da angiogênese foram identificados, sendo alguns destacados como mais importantes: fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A), fator de crescimento de fibroblastos ácido e básico (FGF-1 e FGF-2), fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-1 e IGF-2) e angiopoietinas (ANPT-1 e ANPT-2). Um controle preciso da angiogênese no ovário é essencial para a função luteal normal (Schams e Berisha, 2004).

O processo de luteinização é dependente, primariamente, de dois hormônios luteotrópicos: hormônio luteotrófico (LH) e hormônio do crescimento (GH), sendo o LH o principal hormônio responsável por estimular a produção de progesterona nas células luteínicas. O GH, *in vitro*, estimula a secreção de ocitocina e progesterona, além de estimular também a produção de prostaglandina (PGF<sub>2α</sub>) e, *in vivo*, ajuda no desenvolvimento do CL (Schams e Berisha, 2004).

Alguns fatores como os de crescimento, peptídeos, esteróides e prostaglandinas são importantes moduladores da função lútea. Estudos demonstraram que a ocitocina também pode ser um fator luteotrófico, durante a fase de desenvolvimento do corpo lúteo, modulando a secreção de LH e P, *in vitro* (Schams e Berisha, 2004). A progesterona também parece ter ação luteotrófica estimulando a síntese de receptores de LH no CL (Jones *et al.*, 1992).

A prostaglandina luteal pode ter ação luteotrófica, no início e meio da fase luteal, estimulando a produção de progesterona (Miyamoto *et al.*, 2003; Schams e Berisha, 2004).

### 2.4.3 Características macroscópicas

O corpo lúteo, durante o ciclo estral, passa por intensas modificações na composição tecidual, no peso e no diâmetro luteal (Akinpelumi e Orji, 1990; Fields e Fields, 1996).

Após a ovulação, até o dia 5 do ciclo, o corpo lúteo mostra-se em processo de formação, apresentando textura leve e cor avermelhada. Entre os dias 5 e 10, se apresenta grande e oval e com coloração de marrom a laranja. Dos dias 11 ao 14, apresenta completa luteinização, com textura firme e cor amarela brilhante. Neste período de 5 a 14, o corpo lúteo apresenta um rápido crescimento e aumento do peso, devido à alta proliferação celular (Akinpelumi e Orji, 1990). Em vacas, aos 3 dias após ovulação, um CL pesa em média 640mg e, aos 14 dias, 5,1g (Fields e Fields, 1996). A partir do dia 15, o amarelo torna-se opaco, iniciando o processo de isquemia. Na fase final de regressão, sua coloração é creme e de textura firme (Akinpelumi e Orji, 1990).

A incidência do corpo lúteo, no ovário esquerdo ou direito, varia entre alguns estudos. Vianna *et al.* (1999), estudando animais da raça Gir, encontraram 57,14% de incidência no ovário direito e Ramos *et al.* (2008), encontraram 56,23% de ocorrência no ovário direito, em animais zebuínos. Neves *et al.* (2002), analisando ovários de vacas Nelore, e Akinpelumi e Orji (1990), em vacas white Fulani, encontraram maior incidência do corpo lúteo no ovário esquerdo. Chacur *et al.* (2006) encontraram 65,47% de corpos lúteos, no ovário esquerdo, em animais zebuínos não gestantes.

Existem diferenças no tamanho do corpo lúteo quando comparamos animais zebuínos e taurinos. Corpos lúteos de zebuínos variam de 17 a 21mm de diâmetro (Figueiredo *et al.*, 1997; Baruselli *et al.*, 2007). Neves *et al.* (2002) encontraram diâmetro luteal médio, em vacas Nelore não-gestantes, de 15,3mm no ovário esquerdo, 16,4 para ovário direito e, em gestantes, 18,4mm no esquerdo e 18,7 no direito. Chacur *et al.* (2006), em vacas zebus, encontraram 16,70mm para o esquerdo e 15,75 para o direito. Já, em vacas holandesas, os valores observados são maiores que os de animais zebuínos, sendo os valores encontrados de 20 a 30mm (Ireland *et al.*, 1980; Ginther *et al.*, 1989; Taylor e Rajamahendran, 1991).

Quanto aos parâmetros (comprimento, largura e espessura), Neves *et al.* (2002) encontraram para o ovário esquerdo 2,57-1,61-1,22cm e para o direito 2,62-1,71-1,21cm, em animais não gestantes. Para os gestantes, os valores foram de 2,78-1,80-1,23cm para o ovário esquerdo e 2,84-1,74-1,21cm para o direito. Megale e Couto (1959) encontraram para ovário esquerdo 2,81-1,49-1,72cm e do direito 3,01-1,57-1,85cm. Ramos *et al.* (2008), estudando vacas zebuínas gestantes e não gestantes, encontraram, para as não gestantes, valores de 2,36-1,54-1,03cm para o direito e 2,03-1,39-0,94cm para o esquerdo. E, para as gestantes, 2,49-2,18-1,02cm para o direito e 2,68-1,87-1,07cm para o esquerdo.

O volume ovariano encontrado por Neves *et al.* (2002), foi de 6,37cm<sup>3</sup> para o ovário esquerdo e 7,17cm<sup>3</sup> para o direito de animais não-gestantes e 6,42cm<sup>3</sup> e 6,53cm<sup>3</sup> para animais gestantes. Ramos *et al.* (2008) encontraram 6,18 e 5,50, em não-gestantes, e 6,45 e 7,54, em gestantes para ovários direito e esquerdo, respectivamente.

O corpo lúteo pode ser classificado como protuso e incluso, cavitário e não-cavitário (Senger, 2003). Durante o seu desenvolvimento, o tecido luteal ocupa a

parte interior do ovário, sendo chamado de incluso, ou pode proliferar, excessivamente, extrapolando para fora do ovário, denominando-se protuso. Neves *et al.* (2002) e Ramos *et al.* (2008) observaram, em zebuínos, maior incidência de CL incluso do que protuso, em ambos os grupos gestante e não-gestante, sendo a maior porcentagem de inclusos nos animais gestantes. Cavidades luteais podem ser observadas em corpos lúteos de animais gestantes (86%) e não-gestantes (77%) (Kastelic *et al.*, 1990). Neves *et al.* (2002) encontraram 2,3% de animais Nelore gestantes com cavidade luteal e 16,3% para não gestantes. Borges *et al.* (2003) encontraram, para animais Nelore, 46,7% de cavidades luteais. O aparecimento destas cavidades foi aos 4,8 e 6,7 dias após a ovulação e a área máxima variou de 0,1 e 0,5mm em 78,3% dos casos, entre o sétimo e o décimo dia. A persistência média das cavidades foi de 5,0 a 10,5 dias e, em alguns casos, permaneceu por até 17 dias. Segundo os autores, essa diferença no tempo de permanência das cavidades ocorre devido à reorganização gradual do tecido e tende a desaparecer com o transcorrer do ciclo estral. Cavidades luteais podem ocorrer devido à ocupação incompleta da cavidade folicular pelas células, durante a luteinização, não sendo funcionalmente importantes e não afetando a taxa de gestação ou a produção de progesterona (Kastelic *et al.*, 1990; Borges *et al.*, 2003).

#### **2.4.4 Células luteais**

O tecido luteal consiste em três tipos celulares: células não-esteroidogênicas (cel. endoteliais e pericitos, fibroblastos, macrófagos, mastócitos e leucócitos) e células esteroidogênicas maiores e menores (O'Shea *et al.*, 1989; Senger, 2003; Stouffer, 2006). Segundo O'Shea *et al.* (1989), as células não esteroidogênicas representam cerca de 69,8% do total de células do parênquima luteal.

As células não-esteroidogênicas e o sistema capilar representam 14% do volume e 53% das células do corpo lúteo maduro. Células endoteliais são células achatadas de diâmetro médio de 11µm que recobrem o interior dos vasos sanguíneos e secretam fatores que participam dos processos luteolíticos e luteotrópicos. Existem 5 tipos de células endoteliais no corpo lúteo bovino. Dentre elas, a célula tipo 5 não tem características de célula endotelial, mas mostra similaridades com uma célula granulosa imatura, sendo indicada como uma suposta célula tronco para renovação das células luteais. Os pericitos são células de origem mesenquimatosa com núcleo alongado e prolongamentos citoplasmáticos que envolvem parcialmente a parede capilar. Estas células são contráteis, influenciando o fluxo sanguíneo dos capilares, podendo se diferenciar em células musculares lisas, após regeneração dos vasos, devido a alguma lesão (Fields e Fields, 1996).

O corpo lúteo bovino é formado por tecido conjuntivo que contém colágeno tipo I, colágeno tipo IV e fibronectina (Silvester e Luck, 1999). A função do colágeno é primordialmente estrutural, proporcionando sustentação às células, mantendo-as unidas. O colágeno tipo I é sintetizado pelos fibroblastos, formando fibras e feixes muito resistentes. O colágeno tipo IV é sintetizado pelas células epiteliais, estando presente nas lâminas basais e formando uma espécie de feltro, não polimerizando em fibrilas (Junqueira e Carneiro, 1995).

Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo, produzem glicosaminoglicanos, colágeno e citoquinas, sendo responsáveis pela formação das fibras e do material intercelular amorfo. Apresentam cerca de 15µm diâmetro, representam cerca de 6% do volume luteal e 10% do total de células do corpo lúteo (Fields e Fields, 1996). Os fibroblastos têm prolongamentos citoplasmáticos irregulares, núcleo claro, grande e ovóide com cromatina

fina e nucléolo evidente. Não se dividem com frequência no tecido conjuntivo de um adulto, entrando em mitose somente quando solicitado (Junqueira e Carneiro, 1995; Fields e Fields, 1996).

Células imunes, principalmente macrófagos e linfócitos T, estão presentes no corpo lúteo do início ao fim da fase lútea, sendo mais intensamente observados durante a luteólise (Pate e Keyes, 2001). Os macrófagos são importantes pela sua atividade fagocitária de restos celulares decorrentes da destruição das células luteais e pela participação na resposta imune, durante a regressão do corpo lúteo (Fields e Fields, 1996; Pate e Keyes, 2001).

As células esteroidogênicas do corpo lúteo são denominadas células luteínicas maiores - Large Luteinic Cells (LLC) e células luteínicas menores - Small Luteinic Cells (SLC) que podem ser distinguidas pelo seu tamanho e outras características funcionais e estruturais (Alila e Hansel, 1984; Fields e Fields, 1996). Ambas têm características similares que particularizam as células esteróides secretoras e possuem um retículo endoplasmático liso bem desenvolvido, mitocôndrias, complexo de Golgi e gotas de lipídeos. Morfologicamente, as células luteínicas maiores e menores são qualitativamente similares, mas quantitativamente há mais organelas citoplasmáticas nas células maiores do que nas menores (Fields e Fields, 1996).

As células luteínicas menores originam-se das células da camada da teca interna (Alila e Hansel, 1984). Elas apresentam diâmetro médio de 17,2 $\mu$ m e, no período de gestação, entre 15 e 20 $\mu$ m, representam cerca de 3,5% do total de células do CL, 27,7% do volume luteal (O'Shea *et al.*, 1989). Quando comparadas com as LLC, representam maior porcentagem, tanto no ciclo estral quanto na gestação (Bertan *et al.*, 2006). Possuem formato estrelado e núcleo irregular (forma de taça) com nucleoplasma densamente

corado, grande quantidade de mitocôndrias com crista tubular, retículo endoplasmático liso, gotas lipídicas no citoplasma, extensivo complexo de Golgi (Alila e Hansel, 1984) e junções de aderência entre as SLC adjacentes (Fields e Fields, 1996). Também possuem grande número de receptores de LH, sendo altamente responsivas ao estímulo desse hormônio para produção de progesterona, apesar de secretarem baixas quantidades (O'Shea *et al.*, 1989). Segundo Fields e Fields (1996), as SLC também foram diferenciadas em  $\alpha$ SLC e  $\beta$ SLC, mas há necessidade de mais estudos para estabelecer se as células  $\alpha$  se convertem em células  $\beta$  e se as  $\alpha$ SLC se tornam  $\alpha$ LLC e as  $\beta$ SLC se tornam  $\beta$ LLC.

Células luteínicas maiores originam-se tanto das células da granulosa quanto das células luteínicas menores (Alila e Hansel, 1984). Possuem um diâmetro médio de 38,4 $\mu$ m e, entre 22 e 50 $\mu$ m, no período de gestação, somam cerca de 26,7% do total de células e representam 40,2% do volume do corpo lúteo (O'Shea *et al.*, 1989). Estas células possuem grande quantidade de retículo endoplasmático liso e mitocôndrias esféricas densamente agrupadas, que é o indicativo de sua grande contribuição esteroidogênica (Wiltbank e Niswender, 1992; Fields e Fields, 1996). Elas têm formato esférico, núcleo grande circular centralizado com nucléolo distinto e cromatina dispersa, grânulos de lipídeos, grande número de grânulos secretórios, retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi proeminente e ausência de junções de aderência entre as células. São responsáveis por 80% da produção de progesterona e possuem poucos receptores para LH, o que mostra a baixa responsividade destas células ao estímulo deste hormônio. Também são responsáveis pela secreção de oxitocina e progesterona, além de ser o sítio primário de resposta à PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  e estrógeno (Fields *et al.*, 1992; Bertan, 2006).

Existem duas populações de células maiores morfológicamente distintas: as células luteais grandes  $\alpha$ , contendo retículo endoplasmático liso, típico de células esteroidogênicas, e as células luteais grandes  $\beta$ , que correspondem a 66% das células luteais grandes e apresentam maior capacidade de síntese de progesterona. Possuem abundância de retículo endoplasmático liso tubular e dilatado que reflete numa grande atividade secretória de progesterona (Fields e Fields, 1996).

As células maiores possuem grânulos densos medindo de 150-300nm que são relacionados à sua alta capacidade esteroidogênica e síntese de proteínas (O'Shea *et al.*, 1989; Parkinson *et al.*, 1994; Fields e Fields, 1996). Estes grânulos são importantes, na distinção das células luteais grandes das pequenas, uma vez que são abundantes no citoplasma das células grandes e ausentes nas células menores (Fields *et al.*, 1992). Estes parecem ser empacotados no complexo do Golgi, acumulados na região paranuclear, migram em grupo para a membrana celular e são liberados por exocitose (Fields e Fields, 1996).

Estes grânulos secretórios contêm oxitocina, no corpo lúteo do ciclo, e acredita-se ter relaxina no corpo lúteo da gestação (Fields *et al.*, 1992). A liberação de oxitocina é estimulada pela PGF $2\alpha$  endometrial e sugere-se que existe um feedback positivo, entre a oxitocina luteal e a PGF $2\alpha$ , para induzir a regressão do corpo lúteo. Baixas concentrações de oxitocina estimulam a produção de progesterona e altas concentrações são inibitórias (Pate, 1996). A relação observada entre progesterona e oxitocina sugere que ambos os hormônios desempenham um papel importante, como fatores locais e intraovarianos, que reforçam a função secretora de CL na vaca (Rękawiecki e Kotwica, 2008).

A presença e o número de grânulos secretórios contendo oxitocina reproduzem as mudanças que ocorrem durante o diestro e permitem relacionar fases luteais de animais não-gestantes e gestantes, apesar da oxitocina não estar presente nos grânulos, no período posterior à implantação embrionária > 45 dias (Fields *et al.*, 1992).

Outros tipos de proteínas parecem ser armazenadas nos grânulos secretórios, incluindo inibidor das metaloproteinases (TIMP) 1 e 2, que estão envolvidas no remodelamento tecidual do corpo lúteo, e as apolipoproteínas E e A-1, que podem estar envolvidas na regulação do colesterol para a esteroidogênese (Fields e Fields, 1996).

As características morfológicas das células luteínicas maiores do ciclo estral são iguais as das vacas gestantes. O número de grânulos secretórios por célula e o número de células contendo grânulos muda de acordo com o dia do ciclo estral (Fields *et al.*, 1992).

No dia 3 do ciclo estral, cerca de 3% das células maiores possuem grânulos secretórios e pouco ou nenhum lipídeo citoplasmático, refletindo o primeiro terço da gestação. Do dia 7 a 14, são comparados com o segundo trimestre de gestação, contendo grande porcentagem de células com grânulos, grande número de grânulos nas células e alguns lipídeos citoplasmáticos. No dia 14, as células luteínicas maiores têm características regressivas similares às observadas no CL de vacas no final da gestação, sendo observado um declínio tanto do número de células com grânulos quanto da porcentagem de grânulos na célula. Estas características regressivas do corpo lúteo estão bem pronunciadas, durante os dias 17-19 do ciclo estral, quando não se encontram grânulos de secreção nas células, como no último trimestre da gestação (Fields *et al.*, 1992).

O número de grânulos e o nível de oxitocina luteal tem um pico, no meio do ciclo, e depois decresce significativamente. Em vacas gestantes, grânulos luteais elevam de números quase indetectáveis no dia 45 para um pico nos dias 180-210. Se ocorrer gestação, os receptores uterinos de oxitocina permanecem baixos, mantendo o corpo lúteo e sustentando a gestação. Se a gestação não ocorre, os receptores uterinos de oxitocina aumentam significativamente no dia 17, tendo um pico no dia 21 e ficando favorável a ação da oxitocina que, juntamente com a prostaglandina, levarão a uma sequência de eventos que culminarão na regressão luteal (Fields *et al.*, 1992).

#### **2.4.5 Produção de progesterona**

A progesterona apresenta variação na sua secreção e concentração plasmática, durante o ciclo estral, refletindo a funcionalidade do CL, entre as fases de crescimento, manutenção e regressão (Borges *et al.*, 2003). A concentração de progesterona por grama de tecido luteínico também se apresentou inferior em zebuínos, quando comparada à de fêmeas taurinas (Baruselli *et al.*, 2007). Em animais Zebuínos, são observadas concentrações abaixo de 1ng/ml, no estro, ocorrendo elevação até o décimo dia e alcançando valores máximos de 4,5ng/ml (Adeyemo e Heath, 1980). Em animais da raça holandesa, foram observados valores máximos de 16,0ng/ml (Badinga *et al.*, 1994). Mukasa-Mugerwa e Tegegne (1989) estudaram as concentrações de progesterona, em vacas zebuínas, durante a gestação, e encontraram valores de 0,2ng/ml no dia 0, 3,1ng/ml no dia 7 e 7,1ng/ml no dia 14, permanecendo em 8,1ng/ml até o dia 21. Durante a gestação, a progesterona permaneceu alta, tendo valores maiores no último trimestre de gestação, 13-14ng/ml, e com declínio para 8,8ng/ml, 2 semanas antes do parto e 6,9ng/ml, 1 semana antes. Após o parto, os valores permaneceram em média de 1,0ng/ml, com variações entre os animais.

Em fêmeas bovinas, a síntese de progesterona necessita de uma secreção pulsátil de LH durante a fase luteal e da disponibilidade de colesterol (Niswender *et al.*, 2000). O colesterol é sintetizado, principalmente, no fígado e transportado para o corpo lúteo, na forma de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e de baixa densidade (LDL). Nos bovinos, tanto as LDL quanto as HDL contribuem para o aumento na produção de progesterona pelas células do corpo lúteo, sendo que as LDL são as mais efetivas por serem o principal carreador plasmático de colesterol. Cada molécula de LDL contém aproximadamente 2.500 moléculas de colesterol. O LDL liga-se a receptores específicos na membrana plasmática da célula esteroidogênica, sendo englobado pela membrana formando o endossomo. Após a internalização, enzimas específicas presentes no lisossomo da célula combinam-se com o endossomo promovendo a dissociação do LDL e disponibilizando o colesterol para a célula. O HDL encontra-se conjugado a proteínas plasmáticas que, quando se ligam a membrana celular, promovem o transporte do HDL para o citoplasma e disponibilização do colesterol para a esteroidogênese (Milvae *et al.*, 1996; Niswender *et al.*, 2000).

Na membrana celular, o LH liga-se a receptores específicos ativando a proteína G que, por sua vez, ativa a adenilato ciclase, a qual promove a conversão de ATP em AMPc e, assim, ativa a Proteína Kinase A (PKA). Esta enzima acelera a internalização do LDL, ativa a colesterol esterase que favorece a conversão de colesterol éster em colesterol e ácidos graxos, disponibilizando maior quantidade de lipídeos no citoplasma. Além disso, a PKA facilita o transporte de colesterol do citoplasma para a membrana mitocondrial, através da fosforilação das proteínas transportadoras: StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein), PBR (receptor benzodiazepínico tipo periférico) e a endozepina um ligante natural

do PBR (Davis *et al.*, 1996; Niswender *et al.*, 2000). Um estudo realizado por Fitz *et al.* (1982) demonstrou que as células maiores possuem uma maior quantidade de proteína StAR e endozepina, o que as confere maior capacidade de sintetizar progesterona.

Para a conversão do colesterol em progesterona há necessidade de um aumento na expressão de enzimas na matriz mitocondrial. O colesterol transportado para a matriz mitocondrial é clivado pela enzima P450<sub>scc</sub>, transformando-o em pregnenolona. Sob a ação da enzima 3 $\beta$ -HSD, a pregnenolona é convertida em progesterona que se espalha no citoplasma da célula e, posteriormente, entra na corrente sanguínea em direção aos tecidos alvo (Niswender e Nett, 1994; Bertan *et al.*, 2006).

A progesterona desempenha diversas funções no aparelho reprodutivo da fêmea. Após a ovulação e com o desenvolvimento do CL, ocorre aumento das concentrações de progesterona, levando a secreção de LH, em alta amplitude e baixa frequência, e determinando concentrações médias de LH. A progesterona também promove o relaxamento do miométrio, durante a gestação. Este fato ocorre devido à ação da progesterona na expressão dos genes, que regulam os canais de cálcio dificultando a entrada deste íon na célula. O aumento da progesterona estimula a secreção das glândulas endometriais, promovendo a liberação de proteínas que mantêm o útero em condições necessárias para o desenvolvimento embrionário. Na vaca, durante a gestação, o corpo lúteo não é a única fonte de produção de progesterona. No decorrer da gestação, a placenta aumenta gradualmente a capacidade de produção de progesterona, sendo a fonte principal nos estágios finais (Bertan *et al.*, 2006).

#### **2.4.6 Luteólise**

A luteólise é definida como sendo a lise ou morte estrutural do corpo lúteo. Na ausência da fertilização, pulsos de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  são liberados pelas células endometriais, promovendo a morte funcional e estrutural do corpo lúteo, observado por volta do dia 14 do ciclo estral, determinando o término do ciclo estral e gerando um novo estro (Pate e Keyes, 2001). Na vaca, a mudança do CL cíclico para CL gestacional ocorre por intervenção do embrião. Células trofoblásticas do embrião sintetizam um fator antiluteolítico, em maior intensidade por volta dos dias 10 a 24 da gestação, chamado Interferon-tau (IFN $\tau$ ). A sua ação ocorre nas células do epitélio endometrial promovendo inibição na expressão de receptores de ocitocina levando a inibição da síntese e liberação normal de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , que levaria à luteólise (Demmers *et al.*, 2001). O corpo lúteo da vaca gestante começa a sofrer o processo de luteólise por volta dos 210-230 dias de gestação, após este período a placenta assume a produção de progesterona até o final da gestação (Fields e Fields, 1996; Demmers *et al.*, 2001).

Durante a luteólise, dois eventos ocorrem em conjunto: perda da capacidade de sintetizar e secretar progesterona (luteólise funcional) e perda das células luteínicas (luteólise estrutural) (Fields e Fields, 1996; Milvae *et al.*, 1996). A diminuição inicial da concentração sanguínea de progesterona não parece ocorrer devido à perda das células luteínicas, mas está mais ligado a redução do fluxo sanguíneo no corpo lúteo e diminuição da capacidade esteroidogênica das células (Niswender *et al.*, 2000).

O exato estímulo que inicia a secreção de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  é controverso. Acredita-se que o útero deve ser exposto a uma elevada concentração de progesterona, por um certo período, antes que seja capaz de sintetizar e liberar a PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  suficiente para causar a luteólise. Tem-se proposto que o estrógeno dos folículos em desenvolvimento é o gatilho para liberação de ocitocina da

hipófise que estimula a liberação de grandes quantidades de PGF2 pelo endométrio. A PGF2 inicia o feedback positivo para liberação de maior quantidade de oxitocina luteal e uterina (Niswender *et al.*, 2000).

A prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) produzida no tecido endometrial é o principal fator responsável por promover a luteólise e bloquear a síntese de progesterona pelo corpo lúteo (McCracken *et al.*, 1999; Niswender *et al.*, 2000; Schams and Berisha, 2004).

A luteólise ocorre quando a PGF<sub>2α</sub> é liberada pelo endométrio, de cinco a oito pulsos durante um período de 2 a 3 dias (Schams and Berisha, 2004) e depende da interação entre o corno uterino e o ovário ipsilateral. A prostaglandina produzida pelo útero é transportada para o ovário ipsilateral, através de um mecanismo de contracorrente da veia uterina para a artéria ovariana. A PGF<sub>2α</sub> produzida no corno uterino entra na artéria ovariana, pela veia útero-ovariana, chegando ao corpo lúteo ipsilateral. Esta relação anatômica garante que uma alta concentração de PGF<sub>2α</sub> seja transportada diretamente ao CL sem a sua diluição pela circulação sistêmica, impedindo sua degradação, durante a passagem pelos pulmões (Hixon e Hansel, 1974; Niswender *et al.*, 2000). Em fêmeas bovinas, foi relatada uma proteína transportadora de PGF<sub>2α</sub> (PGT) que media o transporte deste hormônio do endométrio para o ovário, pelas vias vasculares. Esta proteína, no endométrio, tem um maior grau de expressão, entre os dias 16 e 18 do ciclo estral (Bertan *et al.*, 2006).

O número de receptores para PGF<sub>2α</sub> aumenta, ao longo da fase luteal. Foi identificado apenas um tipo de receptor e estes são caracterizados em receptores de alta e baixa afinidade para PGF<sub>2α</sub>. Estes receptores estão presentes nas SLC, LLC e células endoteliais de fêmeas bovinas. Quando a PGF<sub>2α</sub> se liga a esses receptores,

estimula a atividade da enzima Proteína Kinase C (PKC). Esta enzima diminui a captação do colesterol para o citoplasma e para a mitocôndria, interrompendo a produção de progesterona. Nas células endoteliais, a PGF<sub>2α</sub> estimula a secreção de endotelina 1 (ET-1), uma substância vasoconstritora que leva a degeneração dos capilares sanguíneos, hipóxia do corpo lúteo e morte das células esteroidogênicas (Niswender *et al.*, 2000; Schams e Berisha, 2004; Bertan *et al.*, 2006).

O bloqueio da síntese de progesterona decorrente da ação da PGF<sub>2α</sub> pode ocorrer, através de alguns mecanismos intracelulares: ação da PGF<sub>2</sub> nos receptores para os hormônios luteotrópicos, levando a uma redução do LH e diminuição da enzima PKA nas LLC; diminuição da apreensão do colesterol pela célula, devido a redução do mRNA para o receptor de LDL; quebra no transporte do colesterol para a mitocôndria, reduzindo as concentrações de mRNA para a proteína STAR. (Niswender *et al.*, 2000; Bertan *et al.*, 2006). O bloqueio da esteroidogênese e da utilização do colesterol leva a um acúmulo de gotas lipídicas e aumento do número de lisossomos (Senger, 2003).

As células imunes e citocinas também parecem participar da luteólise, regulando a síntese de PGF<sub>2α</sub>, esteroidogênese e fagocitose. Leucócitos, eosinófilos e macrófagos acumulam-se no CL em regressão, após o declínio da progesterona. No período final da regressão, cerca de 70% das células proliferativas do CL são macrófagos CD-14-positivo (Schams e Berisha, 2004). A função principal dos macrófagos é a fagocitose das células luteais em degeneração e degradação da matriz extracelular. Além disso, o Fator de Necrose Tumoral α (TNFα) produzido pelos macrófagos inibe a secreção de progesterona basal e estimula a PGF<sub>2α</sub>. A infiltração de leucócitos, no parênquima luteal, leva a um aumento na produção de citocinas (IL-1,

TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) que estimulam a síntese de PGF2 $\alpha$  e ativação dos macrófagos (Meidan *et al.*, 1999; Niswender *et al.*, 2000; Schams e Berisha, 2004).

As citocinas podem ser as causadoras de um processo chamado apoptose celular, que é um fenômeno descrito como morte celular programada. Este processo é a fase final da luteólise e consiste em uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas que ocorrem na célula induzida pela ação da PGF2 $\alpha$  (Niswender *et al.*, 2000; Knobil e Neills, 2006). Gotas citoplasmáticas, fragmentação nuclear com degeneração de cromatina e mudanças na expressão genética são características das células em apoptose (Niswender *et al.*, 2000). Tanto nas células maiores quanto nas menores, essas mudanças na morfologia não são evidentes, até 24-36 horas, após o início à exposição da PGF2 $\alpha$  (Fields e Fields, 1996; Niswender *et al.*, 2000).

As mudanças na morfologia das células esteroidogênicas são semelhantes em animais gestantes e não gestantes. Nas LLC, no dia 14 do ciclo, ocorre um aumento nas gotas lipídicas e um grande declínio no número de LLC contendo grânulos secretórios e no número de grânulos por célula (Fields e Fields, 1996).

Durante a regressão luteal, além das mudanças estruturais, ocorre um aumento da secreção de proteínas luteais, incluindo inibidor das metaloproteinases-1 e 2. Estas proteínas e seus inibidores estão envolvidos na remodelação da matriz extracelular, na reorganização do tecido luteal e no processo de morte celular (Juengel *et al.*, 1994; Fields e Fields, 1996).

#### **2.4.7 Avaliação do corpo lúteo**

A palpação retal é a técnica mais utilizada para avaliação do sistema genital de fêmeas bovinas, devido a sua praticidade e facilidade de execução. Entretanto, esta

técnica possui uma baixa precisão (entre 20 e 30%, aproximadamente) apresentando erros, tanto na presença do corpo lúteo quanto na definição do seu estágio funcional (Pathiraja *et al.*, 1986; Hussein *et al.*, 1992).

A ultrassonografia permite a completa visualização do tecido luteal, o que possibilita maior precisão na identificação e caracterização do corpo lúteo. Sua imagem é uniforme, circunscrita e menos ecogênica que o estroma ovariano, não apresentando diferenças entre o CL de animais gestantes e não-gestantes (Tom *et al.*, 1998). Erros de avaliação podem ocorrer, no final do ciclo, quando a ecogenicidade do CL se aproxima do observado no estroma ovariano (Pierson e Ginther, 1988).

O corpo lúteo domina o ciclo, do dia 4 até cerca do dia 17 (Ball *et al.*, 2006), com duração média da fase lútea de 10,0 $\pm$ 2,62 dias (Coutinho *et al.*, 2007). Borges *et al.* (2003) detectaram o corpo lúteo em vacas Nelore e Gir, pela primeira vez, por volta de 2,6 $\pm$ 0,7 dias, após a ovulação. Outros relatos demonstraram que os corpos lúteos podem ser detectados, no dia 4,0 $\pm$ 1,31, em vacas da raça Guzerá, permanecendo detectável à ultrassonografia por 15,37 $\pm$ 2,06 dias, mas funcionais durante 13,37 $\pm$ 2,72 dias. Estes valores encontrados dependem da técnica utilizada e da raça do animal (Coutinho *et al.*, 2007). Borges *et al.* (2003), estudando o CL de vacas das raças Gir e Nelore, com o uso de ultrassom, durante o verão e inverno, observaram que a duração do CL foi de 16 dias para animais com 2 ondas de crescimento folicular e 17,9 dias para animais com 3 ondas. O CL teve uma taxa de crescimento de 0,3 a 0,5 cm<sup>2</sup>/dia, atingindo o maior tamanho entre os dias 9,3 e 9,5 do ciclo estral.

As diferenças morfológicas das estruturas ovarianas observadas entre animais taurinos e zebuínos são um importante fator a ser considerado para a realização de um exame reprodutivo mais preciso.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido, após o projeto ter sido aprovado pelo CETEA-UFMG, sob o número 31/2010 (Anexo V).

#### 3.1 Local e animais

Para este experimento, foi obtido o aparelho reprodutor de vacas da raça Nelore gestantes e saudáveis, abatidas no Frigorífico Mata Boi, localizado na cidade de Araguari-MG, no Triângulo Mineiro. Foram utilizados 48 ovários de vacas gestantes entre 77 a 261 dias.

O material foi processado no Setor de Reprodução Animal do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária da UFMG e Departamento de Morfologia do ICB e a leitura das lâminas ocorreu no Setor de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG).

#### 3.2 Determinação da idade gestacional

Os ovários coletados com corpo lúteo foram identificados e divididos em três grupos,

considerando-se o terço de gestação, classificado pelo tamanho do concepto.

Foi feita uma incisão, no corno uterino gestante, com exteriorização do feto e corte do cordão umbilical. Posteriormente, o feto foi colocado em decúbito lateral, com sua linha dorsal em posição retilínea, e se mensurou o comprimento ápico-caudal do feto (cm), da crista nugal (osso occipital) até a primeira vértebra coccígea (Fig.1). Para determinação da idade da gestação, utilizou-se a seguinte fórmula, segundo Richardson (1996):

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

X é a variável idade da gestação;

Y representa o comprimento ápico-caudal.

Sendo assim, os grupos foram divididos de acordo com o trimestre de gestação: 1º terço, composto por ovários de 11 animais com gestação de até 90 dias; 2º terço, 20 animais com gestação entre 91 e 180 dias; e 3º terço, 17 animais com gestação entre 181 e 261 dias.



**Figura 1.** Mensuração do comprimento ápico-caudal do feto (cm) para determinação da idade gestacional.

### 3.3 Processamento do material

#### 3.3.1 Avaliação macroscópica do corpo lúteo e colheita para histologia

Os corpos lúteos das vacas Nelore gestantes foram primeiramente avaliados em relação a sua frequência nos ovários esquerdo e direito. Em seguida, os ovários foram imediatamente imersos em solução de formoldeído a 10%, por um período superior a 4 horas para prefixação. Depois, foi feito um corte no ovário de aproximadamente 0,5 cm de espessura, em plano sagital, do ápice até a base, para ser colocado em recipiente contendo formoldeído a 10%, no qual foi mantido até o momento do processamento.

O processamento histológico seguiu a metodologia de rotina para inclusão em parafina (Michalany, 1980), seguindo os passos abaixo:

*1-Desidratação:* os fragmentos permaneceram pelo menos 30 minutos em cada frasco contendo álcool em concentrações crescentes de 75%, 85%, 95%, e três passagens no álcool absoluto (I, II e III).

*2- Diafanização:* após a passagem no álcool absoluto III, o material foi transferido para xilol I, II e III, permanecendo pelo menos por 30 minutos em cada banho. Este tratamento é necessário para substituir o álcool e permitir a penetração de parafina fundida dentro da peça.

*3- Impregnação e inclusão:* os fragmentos passaram por três banhos de parafina (I, II e III), cada um com duração mínima de 30 minutos. Em seguida, foi feita a inclusão propriamente dita em moldes metálicos, colocados sobre uma folha de papel com parafina à 56°C.

*4- Corte:* com o auxílio de um micrótomo, foram obtidos cinco cortes de cada bloco, na espessura de 5µm, e distendidos em banho-

maria para a “pescagem”. Este procedimento consiste em mergulhar a lâmina na água, em um ângulo de mais ou menos 45°, frente ao tecido, com a finalidade de fixar o corte à lâmina. Todas as lâminas utilizadas já haviam sido preparadas com Poli-L-lisina, que auxilia na fixação do tecido. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em estufa para secagem do tecido.

*5- Desparafinização:* as lâminas foram mergulhadas em xilol, por 30 minutos, para retirada da parafina do tecido.

*6- Hidratação:* passagem das lâminas em álcool absoluto, 90%, 80% e 70%, por 2 minutos cada. Em sequência, as lâminas foram lavadas em água corrente, por 20 minutos.

*7- Coloração:* apenas duas lâminas dos cinco cortes obtidos de cada bloco foram utilizadas para coloração em Hematoxilina e Eosina (HE) com a finalidade de destacar as estruturas nucleares e citoplasmáticas e em Tricrômico de Gomory para identificação de tecido conjuntivo e muscular.

- *Hematoxilina e Eosina:* as lâminas foram mergulhadas em hematoxilina por 2-3 minutos e lavadas em água corrente por 10 minutos. Posteriormente, coradas em eosina por 30 segundos e lavadas rapidamente em água corrente.

- *Tricrômico de Gomory:* as lâminas foram coradas por hematoxilina, de 2 a 3 minutos, lavadas em água corrente por 10 minutos e, em seguida, coradas com tricrômico de Gomory por 15 minutos e lavadas rapidamente em água corrente.

- *Métodos histoquímicos:* Após as análises feitas nas lâminas coradas com tricrômico de Gomory decidiu-se por realizar colorações especiais complementares para mais avaliações do material disponível:

\* *Periodic Acid Schiff Reaction (PAS)*: As lâminas foram Incubadas em AC. Periódico por 10 a 15 minutos. Lavadas em água destilada e mergulhadas no Reativo de Schiff em temperatura ambiente por 15 a 30 minutos. Posteriormente foram lavadas em água corrente por 5 a 10 minutos e em água destilada por 1 minuto. Coradas em hematoxilina por 1 minuto (cora os núcleos) e lavadas em água corrente.

\* *Xylidine Ponceau*: as lâminas foram mergulhadas na solução corante por um período de 15 a 20 minutos. Colocadas em solução tampão a pH= 1,7 durante 12 a 24 horas e após este período foram lavadas em água corrente.

8- *Desidratação*: passagem das lâminas em álcool 70%, 80%, 90% por 5 segundos e no álcool absoluto por 30 segundos.

9- *Diafanização*: as lâminas foram mergulhadas em xilol por 30 minutos.

10- *Montagem*: colocava-se uma gota de Entelan® sobre o corte e, logo em seguida, uma lamínula sobre ele, comprimindo-a para espalhar o produto e evitar a formação de bolhas sobre o corte.

### **3.4 Descrição histológica do corpo lúteo**

Foram utilizadas todas as 48 amostras coradas em H.E e Tricrômico de Gomory, para descrição histológica. A avaliação foi feita em microscópio óptico utilizando objetiva de 5x, 10x, 40x e abrangendo todo o tecido disponível.

### **3.5 Proporção volumétrica do corpo lúteo**

Os constituintes do corpo lúteo avaliados foram citoplasma e núcleo das células luteínicas, tecido conjuntivo e fibroblastos, células endoteliais e pericito.

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 de um microscópio óptico tradicional. Foram examinados 35 campos, por lâmina, escolhidos ao acaso em varredura horizontal. Os resultados foram expressos em porcentagem, sobre um total de 875 pontos por lâmina (Neves e Marques Júnior, 2002). Utilizou-se uma lâmina por corpo lúteo, totalizando 48 lâminas coradas em H.E.

### **3.6 Diâmetro nuclear médio das células luteínicas maiores e menores**

Das 48 amostras, foram sorteadas aleatoriamente 18 lâminas coradas em H.E. para a avaliação do diâmetro nuclear, totalizando 6 lâminas por cada terço gestacional. O diâmetro nuclear médio foi obtido mensurando-se 20 núcleos de cada tipo celular por animal, utilizando a lente micrométrica Olympus acoplada à ocular de 100x de um microscópio óptico, totalizando um aumento final de 1000x. Às médias finais, foram aplicadas um fator de correção obtido pela escala de uma lente micrométrica:

- Régua de escala 0 a 100 (1cm) = 10mm
- 1mm = 25µm
- Cada divisão da régua tem 0.1mm = 2,5µm

Ex: núcleo medindo 9mm x 2,5µm = 22,5 µm

### **3.7 Avaliação estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e todas as variáveis aferidas no estudo foram analisadas com o auxílio do software estatístico SAEG®. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste Lilliefors para verificação de normalidade e à análise de variância (ANOVA),

apresentados sob a forma de média aritmética e desvio-padrão e submetidos à comparação de médias por meio do cálculo da diferença mínima significativa (DMS). Para as variáveis citoplasma das células luteínicas, tecido conjuntivo e diâmetro nuclear, as médias foram comparadas pelo teste t-Student. As variáveis núcleo e células endoteliais foram submetidas ao teste de Fisher, devido ao alto coeficiente de variação. O nível de significância estabelecido foi de 5 % (Sampaio, 2007).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação macroscópica

Do total de animais avaliados, a média do tamanho dos conceptos foi de 42,27cm de comprimento ápico-caudal. O primeiro terço de gestação com 11 animais avaliados apresentou média de 13,59cm de tamanho do concepto, o segundo terço com 20 animais apresentou média de 39,75cm e o terceiro terço com 17 animais teve média de 64,55cm.

A frequência do corpo lúteo foi maior no ovário direito (Tab. 1), semelhante ao encontrado por Megale e Couto (1959), Vianna *et al.* (1999) e Ramos *et al.* (2008), mas diferente de Neves *et al.* (2002) que encontrou 53% dos corpos lúteos no corno esquerdo e 47% no direito. Esses achados ainda não foram esclarecidos de forma definitiva, portanto sobre os mesmos pairam muitas especulações.

**Tabela 1.** Frequência do corpo lúteo (CL) nos ovários esquerdo e direito de vacas Nelore gestantes

Localização do CL	Frequência do CL
Ovário direito	28 (58,33%)
Ovário esquerdo	20 (41,66%)

### 4.2 Avaliação histológica do corpo lúteo

O ovário apresentava-se revestido por um epitélio simples cúbico que estava apoiado sobre o estroma ovariano (Fig. 2A). Logo abaixo deste epitélio há uma camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea (Fig. 2A). O estroma era formado por tecido conjuntivo frouxo, fibroblastos, fibras colágenas e um grande número de vasos sanguíneos e linfáticos. Ele se apresentava repleto de folículos ovarianos em vários

graus de desenvolvimento e corpos lúteos em diversos momentos fisiológicos (Fig. 2E). Em algumas lâminas, foi possível observar com maior clareza a presença de células musculares lisas no estroma ovariano que, segundo Hafez e Hafez (2004), estão relacionadas com o processo de ovulação.

O tecido conjuntivo presente no estroma ovariano circundava o corpo lúteo, apresentando-se denso com grande quantidade de fibroblastos e vasos sanguíneos, emitindo septos para o interior do CL (Fig. 2B, C e D).

O corpo lúteo era constituído na sua maioria por células esteroidogênicas. No entanto, a classificação precisa destas células não foi possível, devido a metodologia utilizada neste trabalho. Segundo Niswender e Nett (1994) uma melhor distinção destas células pela microscopia óptica seria possível através de cortes do tecido luteal na espessura de 1µm corados com azul de toluidina. Diante disso, as células luteínicas maiores e menores foram identificadas através da observação das características estruturais destas células, de acordo com a descrição de Sawyer (1995) e Fields e Fields (1996). As células luteínicas maiores foram classificadas pelo seu formato esférico ou poliédrico, citoplasma grande, núcleo grande circular centralizado com nucléolo distinto. As células menores estavam compactadas, entre as células maiores, e foram identificadas por seu formato estrelado (irregular), núcleo irregular (forma de taça), citoplasma menor, menos corado comparado com a célula luteínica maior (Fig. 3A e 3B).

Foram observados fibroblastos por todo o tecido luteal, entre as fibras colágenas, e contornando as células luteínicas. Estes fibroblastos apresentavam-se como células menores de citoplasma irregular, núcleo claro e grande, podendo ser ovóide ou

alongado (Fig. 3A). De acordo com Fields e Fields (1996), os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e responsáveis pela formação das fibras e do material intercelular amorfo.

O corpo lúteo é uma estrutura altamente vascularizada. O fluxo sanguíneo vem da artéria ovariana, passa pela arteríola aferente que se ramifica dando origem a outras arteríolas de vários tamanhos e aos capilares sinusóides (Yamada *et al.*, 1995). Estes capilares estavam distribuídos por todo o tecido luteal, sendo que a maioria das células esteroidogênicas pareciam estar justapostas por um capilar sanguíneo (Fig. 3D). Também foi observado a presença de arteríolas maiores e menores distribuídas pelo CL (Fig. 3C). Esta alta vascularização do CL justifica-se devido a sua grande demanda metabólica e, segundo Wiltbank (1994), o fluxo sanguíneo para o CL é maior que para qualquer outro tecido, sendo de 65 a 95% durante o diestro.

Em alguns corpos lúteos avaliados, foi observada uma cicatriz que se localizava na região central do tecido. Essa cicatriz era formada por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos (Fig. 3E e F). Segundo Junqueira e Carneiro (2008), após a ovulação, um pouco de sangue pode fluir para a cavidade do antro folicular e, ao mesmo tempo, ocorrer uma invasão de tecido conjuntivo originário do estroma ovariano. O coágulo é gradualmente substituído e, juntamente com o tecido conjuntivo, permanece no interior do corpo lúteo formando uma cicatriz central, a qual aparentemente não interfere com a atividade fisiológica do corpo lúteo.

Ao serem analisadas as lâminas coradas com Tricrômico de Gomory, algumas mostraram grânulos densos, corados em vermelho, agrupados no citoplasma das células luteais esteroidogênicas maiores (Fig. 5) e que não foram encontrados nas células luteais esteroidogênicas menores. Esses grânulos

não tinham um padrão de ocorrência entre os terços de gestação, sendo observados em todos os estádios, com maior ocorrência no final do segundo terço e durante o terceiro. Diante deste achado, foram realizadas colorações histoquímicas especiais na tentativa de identificação do tipo de grânulo presente nas células. O primeiro corante utilizado foi o Periodic Acid Schiff Reaction (PAS), utilizado para identificar glicogênio, glicoproteínas e proteoglicanos. A reação é considerada positiva quando a região se cora de púrpura ou magenta. Durante a análise das lâminas, não foi observada reação positiva dos grânulos nas células luteínicas maiores, sendo considerada uma reação negativa ao PAS (Fig 6 A e B).

Posteriormente, foi utilizado o corante Xylidine Ponceau na tentativa de se identificar a presença de proteínas nos grânulos das células. A reação é considerada positiva quando a região se cora de vermelho alaranjado. Ao analisar as lâminas, observamos a presença de grande quantidade de grânulos corados de vermelho alaranjado no citoplasma das células luteínicas maiores, indicando que a coloração foi positiva para proteína (Fig. 6 C e D).

Segundo Fields e Fields (1996), as células maiores do corpo lúteo possuem grânulos no citoplasma que estão relacionados com sua alta capacidade de sintetizar proteínas e que também as diferem das células menores. Algumas proteínas como a oxitocina, relaxina, metaloproteinases 1 e 2 e as apolipoproteínas E e A-1 foram identificadas nos grânulos das células, sendo que a oxitocina e as metaloproteinases estão envolvidas na luteólise e remodelação tecidual. Fields *et al.* (1992), descreveu que estes grânulos secretórios estão presentes em grande quantidade no 2º terço de gestação e começam a diminuir consideravelmente no terceiro terço. Neste experimento, a ocorrência destes grânulos não apresentou um padrão, sendo observados em todos os terços de gestação apresentando, portanto,

uma resposta individual. Não foi encontrado, na literatura, explicação para tal achado e nem porque o corante Tricrômico de Gomory foi capaz de corar os grânulos presentes nas células. Podemos relacionar a ocorrência dos grânulos com a redução das células esteroidogênicas observadas também desde o início da gestação, já que a presença destes grânulos podem estar relacionados com o processo de luteólise.

Comparando a histologia do corpo lúteo, nos 3 terços de gestação, observou-se que as características morfológicas das células esteroidogênicas luteais não se alteram. Entretanto, foi observado um aumento de tecido conjuntivo, fibroblastos e matriz extracelular, à medida que se aproximava do final da gestação, sendo mais pronunciado a partir dos 190 dias de gestação. Células em degeneração foram observadas em todos os terços de gestação, porém com maior intensidade no final do 3º terço (Fig. 4E, F).

### 4.3 Proporção volumétrica do corpo lúteo

Os valores médios da proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo estão compilados na Tab. 2.

Os resultados mostraram diferença significativa para citoplasma e núcleo das células maiores e menores, nos três terços de gestação ( $P < 0,05$ ).

Ainda, mostraram consistência, na diminuição a cada terço das CCL, comparando-se com o encontrado para NCL, o que demonstra a coerência do método utilizado. Estes resultados revelam uma redução das células esteroidogênicas, observada desde o primeiro terço de gestação, embora com menor intensidade em relação ao último terço. Segundo Fields e Fields (1996), somente após os 200 dias de gestação, é que se observa um elevado declínio das células esteroidogênicas, devido ao processo de luteólise. Embora a apoptose das células luteínicas observada, neste experimento, aparentemente não interfira na atividade mínima do CL para manter a gestação, estudos são necessários para verificar se este tipo de evento ocorre também no animal não gestante. O futuro entendimento desse evento fisiológico poderia contribuir para o desenvolvimento ou ampliação e refinamento de métodos utilizados em biotecnias reprodutivas, que demandam o controle do corpo lúteo em zebuínos, na busca de terapêutica de indivíduos ou para incrementar a produtividade do rebanho.

**Tabela 2.** Médias e desvios-padrão da proporção volumétrica (%) do citoplasma das células luteínicas (CCL), núcleo das células luteínicas (NCL), células endoteliais e pericito (CE e P) e tecido conjuntivo e fibroblastos (TC e F) do corpo lúteo de vacas Nelore gestantes no primeiro (0-100), segundo (100-180) e terceiro (180-280) trimestre de gestação.

Período de gestação	CCL	NCL	CE e P	TC e F
0-100	54,9 ± 6,3 <sup>a</sup>	10,0 ± 3,0 <sup>a</sup>	1,7 ± 1,1 <sup>a</sup>	29,3 ± 7,4 <sup>c</sup>
100-180	48,7 ± 6,6 <sup>b</sup>	6,8 ± 2,0 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	40,0 ± 7,2 <sup>b</sup>
180-270	42,7 ± 7,5 <sup>c</sup>	5,1 ± 1,5 <sup>c</sup>	0,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	47,7 ± 8,0 <sup>a</sup>

Números com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

Para as células endoteliais e pericito, verificou-se que há uma maior proporção destes no primeiro terço de gestação e se mantendo estatisticamente iguais no segundo e terceiro terços.

O processo de angiogênese é muito importante para a formação e desenvolvimento adequado do CL. Segundo Acosta *et al.* (2003), o fluxo sanguíneo aumenta, gradualmente, de acordo com o aumento do volume do corpo lúteo e concentração plasmática de progesterona.

Observou-se um aumento gradativo do tecido conjuntivo e fibroblastos, com o avanço da gestação (Fig. 4 C e D). Durante o processo de regressão, o corpo lúteo passa por intensas modificações estruturais, até a formação de um tecido cicatricial chamado *corpus albicans*. Neste processo de

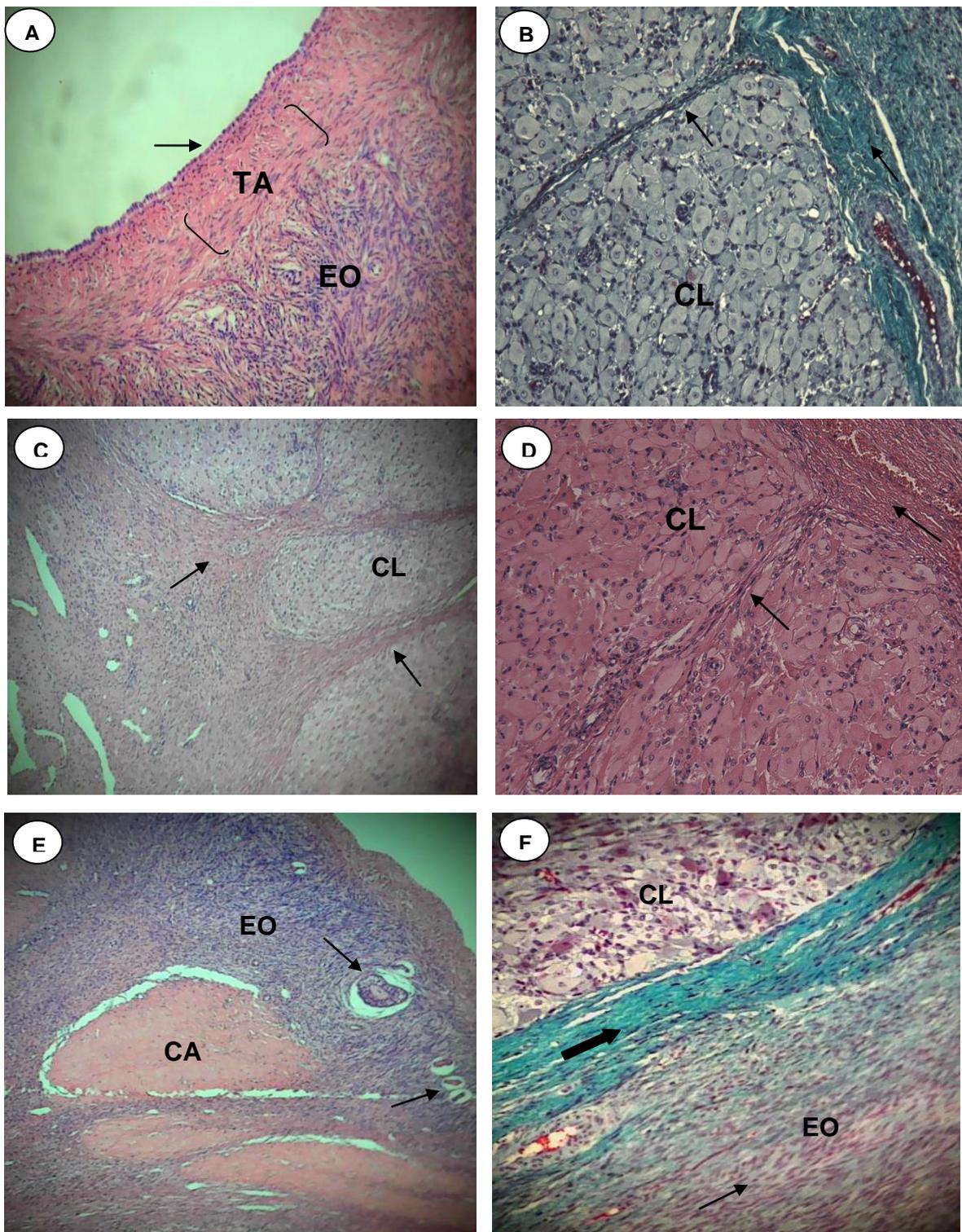
cicatrização, ocorre a proliferação de fibroblastos e deposição de matriz extracelular. Fato que coincide com o observado na análise estrutural, após 190 dias de gestação.

As médias do diâmetro nuclear das células maiores e menores não tiveram diferença entre os três terços de gestação (Tab. 3). Ao comparar dois grupos gestantes e não-gestantes, Neves e Marques Júnior (2006) não observaram diferença entre eles, sugerindo que o diâmetro nuclear das células maiores e menores não varia com o estágio fisiológico reprodutivo do animal.

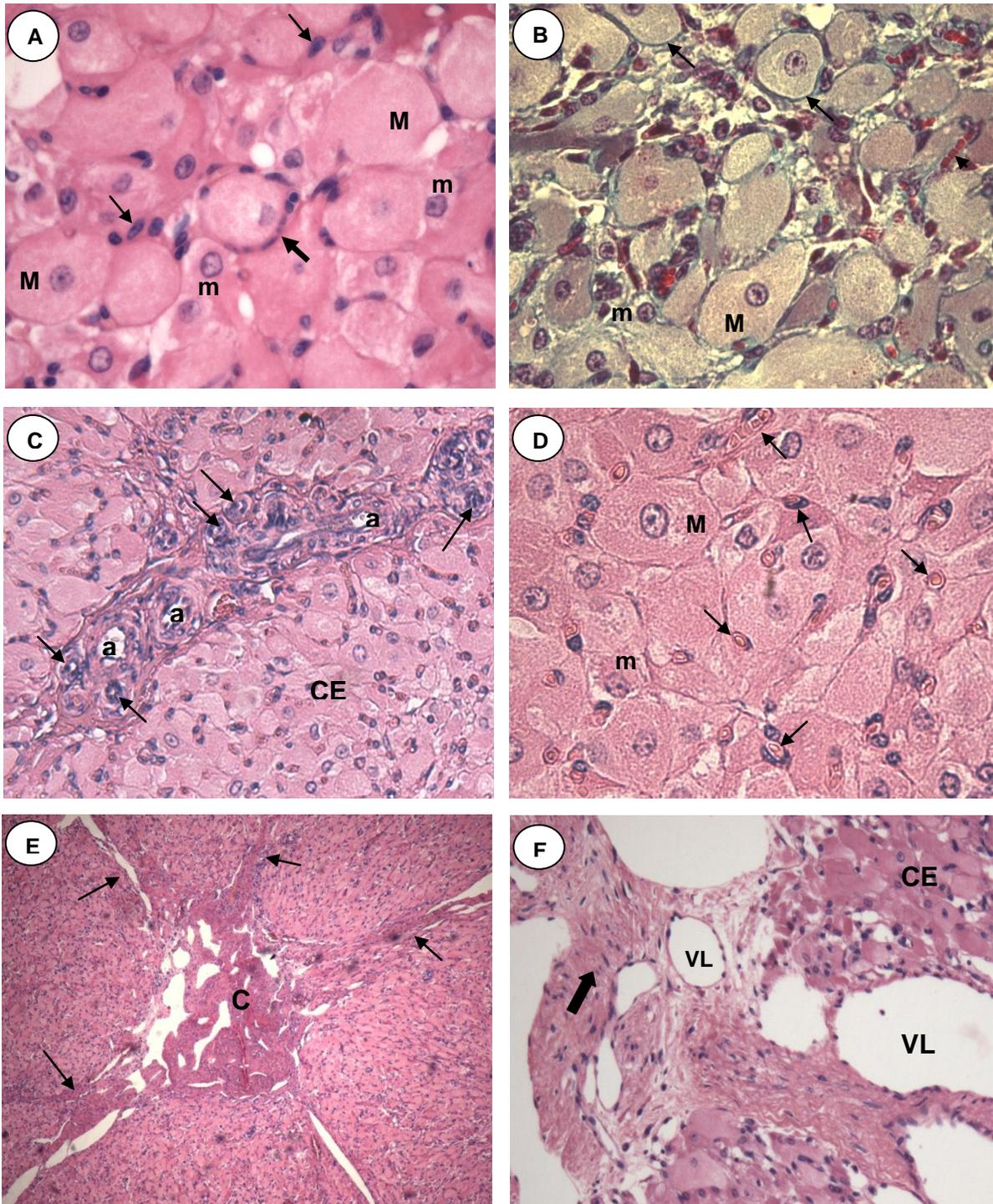
**Tabela 3.** Diâmetro nuclear médio, em micrômetros ( $\mu$ ), das células luteínicas maiores e menores do corpo lúteo de vacas Nelore gestantes no primeiro (0-100), segundo (100-180) e terceiro (180-280) trimestre de gestação.

Período de gestação	Cel.	Cel. Lut. Menor
0-100	22,31 $\pm$ 0,97 <sup>a</sup>	16,35 $\pm$ 2,03 <sup>a</sup>
100-180	21,01 $\pm$ 1,20 <sup>a</sup>	16,14 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>
180-270	21,00 $\pm$ 1,98 <sup>a</sup>	15,77 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>

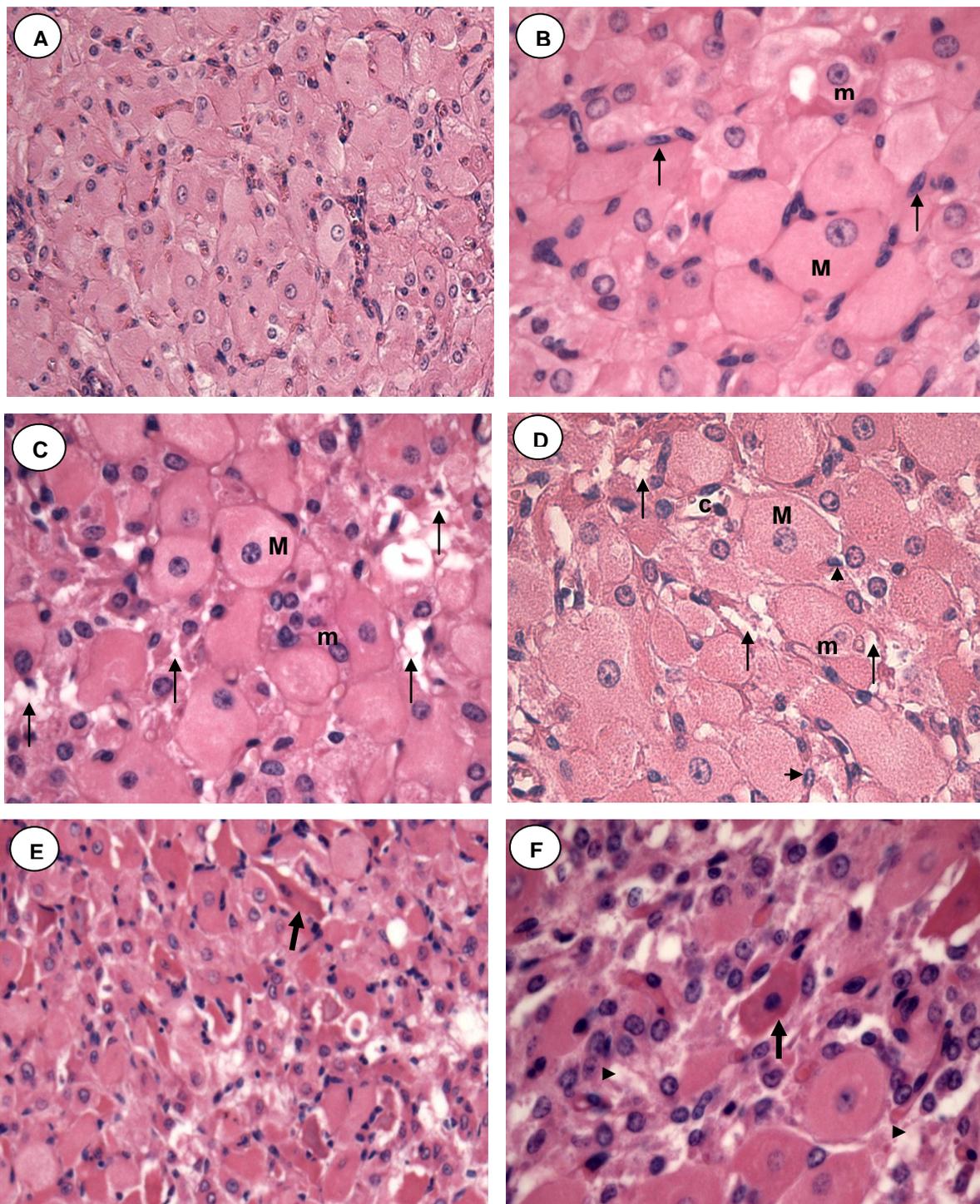
Números com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).



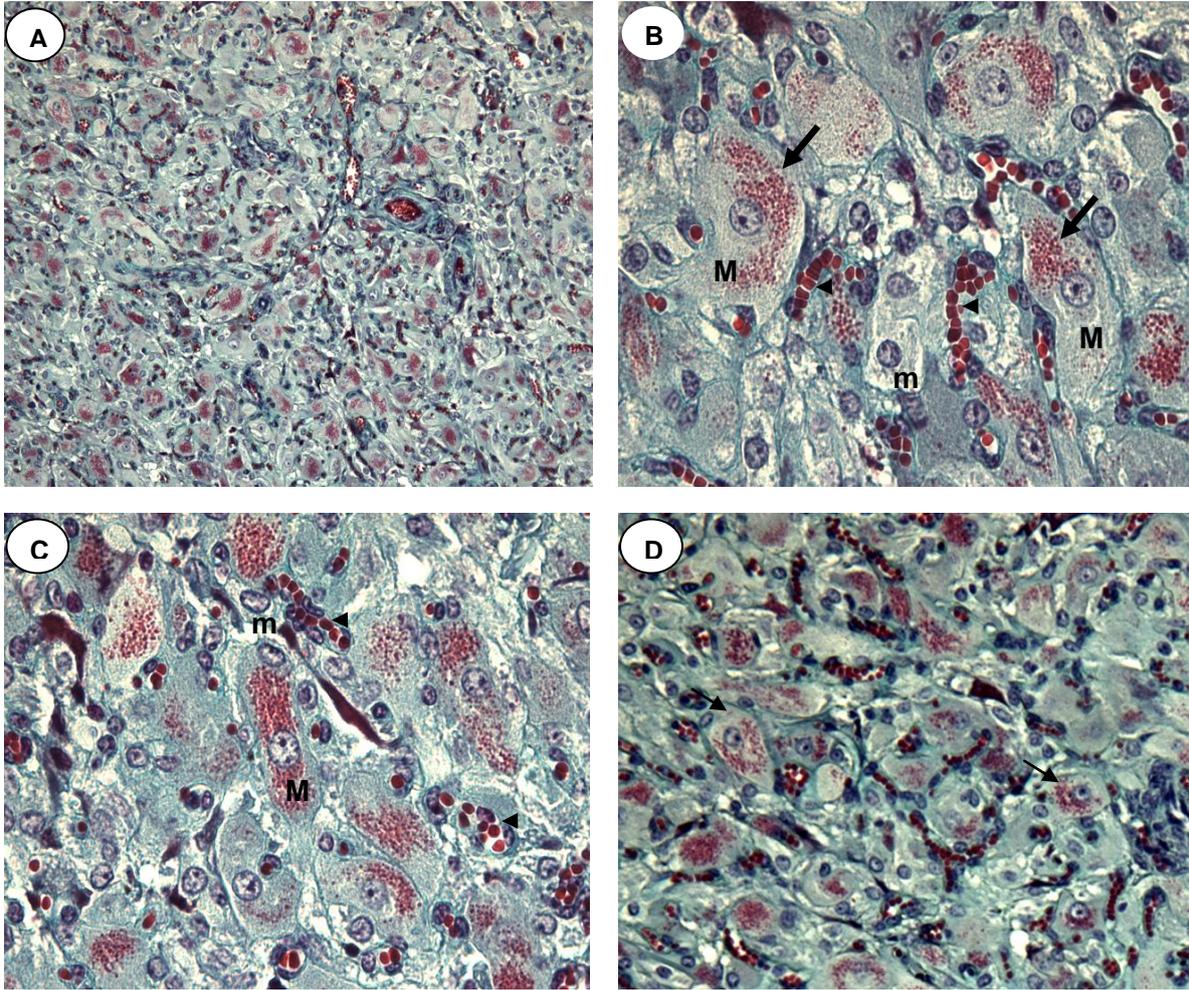
**Figura 2.** Fotomicrografias de ovário e corpo lúteo de animais Nelore gestantes: A) Epitélio simples cúbico (seta), estroma ovariano (EO) e túnica albugínea (TA). HE-10x. B,C e D) Tecido conjuntivo presente no estroma ovariano e emitindo septos para o interior do CL (setas). (B) tricrômico de Gomory-10x, (C e D) HE-10x. E) Estroma ovariano (EO) apresentando folículos em desenvolvimento (setas) e *corpus albicans* (CA). HE-10x. F) Estroma ovariano (EO) apresentando núcleo de fibroblastos (seta) e cápsula de tecido conjuntivo ao redor do CL (seta em negrito). Tricrômico de Gomory-10x.



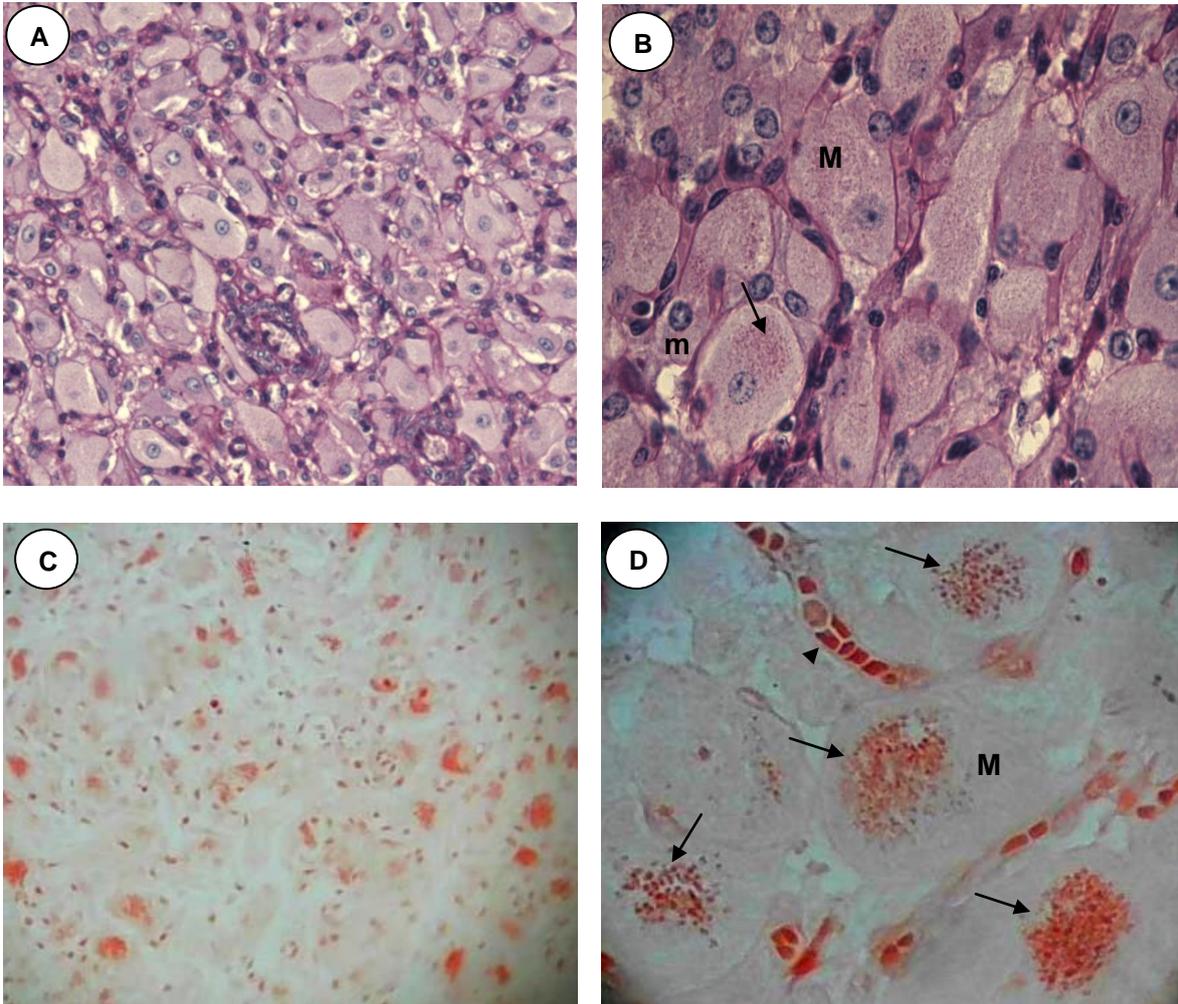
**Figura 3.** Fotomicrografias do corpo lúteo de animais Nelore gestantes: A) 141 dias de gestação (2º terço), destacando célula luteínica maior (M), célula luteínica menor (m), núcleo de fibroblastos (seta) e fibroblastos contornando a célula esteroidogênica (seta grossa). HE-40x. B) 185 dias de gestação (2º terço), evidenciando tecido conjuntivo ao redor das células esteroidogênicas (setas), célula luteínica maior (M) e menor (m) e capilar (cabeça de seta). Tricrômico de Gomory-40x. C) 79 dias de gestação (1º terço), destacando grande vascularização do CL com a presença de arteríolas de vários diâmetros. HE-40x. D) 77 dias de gestação (1º terço), destacando diversos capilares distribuídos entre as células esteroidogênicas. HE-40x. E) 160 dias de gestação (2º terço), com área de cicatriz central (C) no CL e septos de tecido conjuntivo (setas). HE-10x. F) 241 dias de gestação (3º terço), também com área de cicatriz central e evidenciando a presença de vasos linfáticos (VL), tecido conjuntivo cicatricial (seta grossa) e células esteroidogênicas (CE). HE-10x.



**Figura 4.** Fotomicrografias do corpo lúteo de animais Nelore gestantes: A) com 79 dias de gestação (1º terço), mostrando células esteroidogênicas compactas com pouco espaço intercelular. HE-10x. B) 141 dias de gestação (2º terço), células esteroidogênicas compactas, célula luteínica maior (M) e menor (m) e fibroblasto (seta). HE-40x. C) 261 dias de gestação (3º terço), células esteroidogênicas menos compactas destacando espaço intercelular com aumento de matriz extracelular (setas), mostrando célula luteínica maior (M) e menor (m). HE-40x. D) 241 dias de gestação (3º terço) apresentando também células esteroidogênicas menos compactas, matriz extracelular (setas), célula luteínica maior (M) e menor (m), fibroblastos (cabeça de seta) e capilar (c). HE-40x. E) 141 dias de gestação (2º terço), destacando célula em apoptose (seta). HE-10x. F) 119 dias de gestação (2º terço), célula em apoptose (seta) e matriz extracelular (cabeça de seta). HE-40x.



**Figura 5.** Fotomicrografias do corpo lúteo de animais Nelore gestantes: A) 3º terço de gestação mostrando a presença de grânulos corados em vermelho em grande parte das células luteínicas maiores do CL. Tricrômico de Gomory-5x. B) 3º terço de gestação evidenciando os grânulos (setas) presentes nas células luteínicas maiores (M) e ausência de grânulos nas células luteínicas menores (m), capilares (cabeça de seta). Tricrômico de Gomory-40x. C) 2º terço de gestação, célula luteínica maior com grânulos (seta) e célula menor (m), capilares (cabeça de seta) Tricrômico de Gomory-40x. D) 2º terço de gestação, células esteroidogênicas com grânulos (setas) Tricrômico de Gomory-10x.



**Figura 6.** Fotomicrografias do corpo lúteo de animais Nelore gestantes: A) 202 dias de gestação (3º terço) mostrando células esteroidogênicas do CL sem a presença de grânulos. PAS-10x. B) 234 dias de gestação (3º terço) evidenciando célula luteínica maior (M) e menor (m), podemos observar pouca reação do corante com os grânulos encontrados na célula (seta). PAS-40x. C) 202 dias de gestação (3º terço), mostrando a presença de grânulos no citoplasma das células esteroidogênicas. Xylidine Ponceau-10x. D) 202 dias de gestação (3º terço), destacando a presença de grânulos no citoplasma das células esteroidogênicas maiores (setas), capilar (cabeça de seta). Xylidine Ponceau-40x.

## 5 CONCLUSÕES

A frequência do corpo lúteo é maior no ovário direito.

A proporção de citoplasma e núcleo de células esteroidogênicas diminui a partir do segundo terço de gestação.

No terceiro terço de gestação, ocorre menor proporção de citoplasma e núcleo de células luteais esteroidogênicas, maior número de células em degeneração e um aumento da proporção de tecido conjuntivo, fibroblastos e matriz extracelular, confirmando à análise histológica.

As células luteínicas maiores apresentam em seu citoplasma, grânulos secretórios de conteúdo protéico observados em toda a gestação e com mais intensidade durante o 3º terço.

O diâmetro nuclear médio das células luteínicas maiores e menores não variou durante a gestação.

Corpos lúteos de até 100 dias apresentam maior proporção para células endoteliais e pericitos.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No conjunto das informações até então encontradas na literatura sobre o corpo lúteo e sua fisiologia na raça Nelore, incluindo os achados relevantes desta dissertação, verifica-se, ainda, que há muito caminho a ser descoberto e percorrido para dar à raça Nelore, o *status* de ser melhor conhecida em sua fisiologia e seu potencial para responder, com propriedade e ao melhor uso de biotecnias reprodutivas, no concerto de sua importância econômica inquestionável.

Mais estudos são necessários para um melhor entendimento das alterações que ocorrem no corpo lúteo gestacional na vaca

Nelore principalmente no que diz respeito a redução da proporção de células luteínicas desde o início da gestação, avaliação de células apoptóticas e análise da presença, ocorrência e conteúdo dos grânulos nas células esteroidogênicas maiores, encontrados neste experimento.

## 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.
- ADEYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v.14, n.6, p.411-420, 1980.
- ALILA, W.; HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine *corpus luteum* as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biology of Reproduction*, v.31, p.1015-1025, 1984.
- ALLRICH, R.D. Estrous behavior and detection in cattle. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, v.9, n.2, 1993.
- AKINPELUMI, O.P.; ORJI, B.I. Gross morphological and morphometric changes in ovaries of cycling white Fulani cows – *Bos indicus*. *Bulletin Animal Health*, v.38, n.4, p.431-436, 1990.
- BANKS, J.W. *Histologia Veterinária Aplicada*. 2.ed. São Paulo: Manole, 1992. 629p.
- BADINGA, L.; THATCHER, W.W.; WILCOX, C.J. *et al.* Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol-17 $\beta$ , progesterone and luteinizing hormone in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, v.42, p.1263-1274, 1994.
- BALL, P.J.H.; PETERS, A.R. *Reprodução em bovinos*. 3.ed. São Paulo: Roca, 2006. 232p.
- BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; PINHEIRO, O.L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.19, n.1-2, p.9-22, 1995.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v.56, p.1483-1496, 2001.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.2, p.205-211. 2007.
- BERTAN, C.M.; CESAR, M.C.; PUGINE, S.M.P. *et al.* Indução da ovulação em vacas com gonadotrofina coriônica humana (hCG) purificada por cromatografia de afinidade. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*, v.43, n.3, p.379-386, 2006.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos Taurus indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.307-326, 2003.
- BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M. *et al.* Desenvolvimento luteal e concentrações plasmáticas de progesterona em vacas das raças Gir e Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, n.2, p.276-283, 2003.
- BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; ROCHA JÚNIOR, V.R. *et al.* Dinâmica folicular e momento da ovulação em vacas não lactantes das raças Gir e Nelore durante duas estações do ano. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.3, p.346-354, 2004.
- CHACUR, M.G.M.; VALENTIM, N.C.; MARTINEZ, A.I.S. *et al.* Morfometria de ovários de fêmeas zebu *Bos taurus indicus* coletados em matadouro. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, n.1, p.65-70, 2006.

- COUTINHO, G.T.R.M.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F. *et al.* Avaliação ultra-sonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzerá. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.5, p.1089-1096, 2007.
- DAVIS, J.S.; MARY, J.V.; KEEL, B.A. Mechanisms of hormone and growth factor action in the bovine *corpus luteum*. *Theriogenology*, v.45, p.1351-1380, 1996.
- DELLMANN, H.D.; BROWN, E.M. Sistema reprodutor feminino. In: DELLMANN, H.D.; BROWN, E.M. *Histologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Coogan, 1982. cap.13, p.257-266.
- DEMMERS, K.J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction*. v.121, p.41-49, 2001.
- FIELDS, M.J.; FIELDS, P.A. Morphological characteristics of the bovine *corpus luteum* during the estrus cycle and pregnancy. *Theriogenology*, v.45, n.7, p.1295-1325, 1996.
- FIELDS, M.J.; BARROS, C.M.; WATKINS, W.B. *et al.* Characterization of Large Luteal Cells and Their Secretory Granules during the Estrous Cycle of the Cow. *Biology of Reproduction*, v.46, p.535-545, 1992.
- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L. *et al.* Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v.47, p.1489-1505, 1997.
- FITZ, A.; MAYAN, M.H.; SAWYER, H.R. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine *corpus luteum*. *Biology of Reproduction*, v.27, p.703-722, 1982.
- FOOTE, R.H. Estrus Detection and Estrus Detection Aids. *Journal of Dairy Science*, v.58, n.2, p.248-256, 1975.
- FORTUNE, J.E. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. *Biology of Reproduction*, v.50, p.225-232, 1994.
- FRANÇA, J.L.; VASCONCELLOS, A.C. *Manual para normalização de publicações técnico-científicas*. 7.ed. Belo Horizonte: UFMG, 2004.
- GALINA, C.S.; McCLOSKEY, M.; CALDERÓN, A. Detection of signs of estrus in Charolais cow and its Brahman cross under continuous observation. *Theriogenology*, v.17, n.5, p.485-495, 1982.
- GALINA, C.S.; ORIHUELA, A.; BUBIO, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.465-470, 1996.
- GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; MADUREIRA, E.H. *et al.* Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos indicus*). *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, supl.1, p.210, 2005.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.239-257, 2003.
- GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. *Journal Reproduction and Fertility*, v.87, p.223-230, 1989.
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M. *et al.* Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, v.55, p.1187-1194, 1996.

- HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. 513p.
- HANSEL, W.; BLAIR, R.M. Bovine *corpus luteum*: a historic overview and implications for future research. *Theriogenology*, v.45, p.1267-1294, 1996.
- HIXON, J.E; HANSEL, W. Evidence for preferential transfer of prostaglandin F2alpha to the ovarian artery following intrauterine administration in cattle. *Biology of Reproduction*, v.11, p.543-52, 1974.
- HUNTER R.H.F.; WILMUT, I. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reproduction Nutrition Development*, v.24, n.5, p.597-608, 1984.
- HUSSEIN, F.M.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E. *et al.* Comparison of ovarian palpation, milk progesterone and plasma progesterone in the cow. *Theriogenology*, v.38, p. 431-439, 1992.
- IRELAND, J.J.; MURPHEE, R.L.; COULSON, P.B. Accuracy of predicting stages of bovine estrus cycle by gross appearance of the *corpus luteum*. *Journal of Dairy Science*, v.63, n.1, p.155-160, 1980.
- JONES, L.S.; OTTOBRE, J.S.; PATE, J.L. Progesterone regulation of luteinizing hormone receptors on cultured bovine luteal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.85, p.33-39, 1992.
- JUENGEL, J.L; SMITH, M.F.; YOUNGQUIST, R.S. *et al.* Pattern of protein production by bovine *corpora lutea* during luteolysis and characterization of expression of two major secretory products of regressing *corpora lutea*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.100, p.515-520, 1994.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Coogan, 2008. 542 p.
- 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.1269-1278, 1990.
- LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, R.L.S. *et al.* Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science*, v.70, p.3615-3626, 1992.
- LYIMO, Z.C.; NIELEN, M.; OUWELTJES, W. *et al.* Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology*, v.53, n.9, p.1783-95, 2000.
- MARQUES, V.S. *Detecção de estro em reprodutrizas nelore com o uso de ruifões com buçal marcador*. 2004. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.
- MCCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews*, v.79, n.2, 1999.
- MCGEE, E.A.; HSUEH, A.J.W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, v.2, p.1200-214, 2000.
- MEGALE, F.; COUTO, E.S. Aspectos anatômicos do aparelho reprodutor de vacas azebuadas abatidas em matadouro. *Arquivo da Escola Superior de Veterinária - UREMIG*, v.12, p.529-535, 1959.
- MEIDAN, R.; MILVAE, R.A.; WEISS, S. *et al.* Intraovarian regulation of luteolysis. *Reproduction Fertility Supplement*, v.54, p.217-228, 1999.

- MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico*. 1.ed. São Paulo: EPU, 1980. 277p.
- MILVAE, R.A.; HINCKLEY, J.C.; CARLSON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine *corpus luteum*. *Theriogenology*, v.45, p.1327-1349, 1996.
- MIYAMOTO, A.; LUTZOW H.V.; SCHMS, D. Acute actions of prostaglandin F2 alpha, E2 and I2 in microdialyzed bovine *corpus luteum in vitro*. *Biology of Reproduction*, v.49, p.423-430, 2003.
- MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K. Luteolysis in the cow: a novel concept of vasoactive molecules. *Animal Reproduction*, v.6, n.1, p.47-59, 2009.
- MUKASA-MUGERWA, E.; TEGEGNE, A. Peripheral plasma progesterone concentration in zebu (*Bos indicus*) cows during pregnancy. *Reproduction Nutrition Development*, v.29, p.303-308, 1989.
- NALBANDOV, A.; CASIDA, L.E. Ovulation and its relation to estrus in cows. *Journal of Animal Science*, v.1, p.189-198, 1942.
- NEVES, M.M.; MARQUES JÚNIOR, A.P. Tamanho da amostra para estudo da proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo bovino. *Archives of Veterinary Science*, v.7, n.2, p.81-85, 2002.
- NEVES, M.M.; MARQUES JÚNIOR, A.P. Proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo de Nelore. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.5, p.944-946, 2006.
- NEVES, M.M.; MARQUES JÚNIOR, A.P.; SANTANA, C.V. *et al.* Características de ovários de fêmeas zebu (*Bos taurus indicus*), colhidos em abatedouros. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54, n.6, p.651-654, 2002.
- NISWENDER, G.D.; NETT, T.M. *Corpus luteum* an its control in infrapimate species. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. *Physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Raven, 1994. v.2, p.781-816.
- NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J. *et al.* Mechanisms controlling the function and life span of the *corpus luteum*. *Physiological Reviews*, v.80, n.1, p.1-29, 2000.
- NOGUEIRA, Ériklis. *Efeitos da suplementação energética e lipídica no perfil metabólico, desenvolvimento folicular e produção in vitro de embriões em novilhas da raça Nelore (Bos taurus indicus)*. 2008. 67f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- ORIHUELA, A. Some factors affecting the behavioral manifestation of oestrus in cattle: a review. *Applied Animal Behaviour Science*, v.70, p.1-16, 2000.
- O'SHEA, J.D.; RODGERS, R.J.; DÓCCHIO, M.J. Cellular composition of the cyclic *corpus luteum* of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.85, n.2, p.483-487, 1989.
- PARKINSON, T.J.; TURVEY, A.; JENNER, L.J. A morphometric analysis of the *corpus luteum* of the cow during the estrus cycle and early pregnancy. *Theriogenology*, v.41, n.5, p.1115-1126, 1994.
- PATE, J. L. Intercellular communication in the bovine *corpus luteum*. *Theriogenology*, v.45, n.7, p.1381-1397, 1996.

- PATE, J.L.; KEYES, P.L. Immune cells in the *corpus luteum*: friends or foes? *Reproduction*, v.122, p.665-676, 2001.
- PATHIRAJA, N.; OYEDIPE, E.O.; VOH JR, A.A. *et al.* Accuracy of rectal palpation in the diagnosis of *corpora lutea* in zebu cows. *British Veterinary Journal*, v.142, n.5, p.467-471, 1986.
- PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, v.29, p.21-37, 1988.
- PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A. *et al.* Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*bos indicus*) with natural oestrus or estrus induced with prostaglandin F2 $\alpha$  or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, v.49, p.667-681, 1998.
- RAMOS, E.M.; CAVALCANTE, T.V.; NUNES, R.R.M. *et al.* Morfometria ovariana de vacas zebuínas criadas na Amazônia Oriental. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.9, p.696-702, 2008. Disponível em: <<http://www.rbspa.ufba.br>> Acesso em: nov. 2010.
- RANDEL, R.D. Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). *Theriogenology*, v.21, p.170-185, 1984.
- RANDEL, R.D. Unique reproductive traits of Brahman and Brahman based cows. In: FIELDS, M.J; SAND, R.S. Factors affecting calf crop. Boca Raton, 1994. p.23-43.
- REIS E SILVA, A.R.; REYES, A.; GAMBARINI, M.L. *et al.* Dinâmica folicular por ultra-sonografia em novilhas pré-púberes da raça Gir. *Archive Latino American Production Animal*, v.13, n.2, p.51-55, 2005.
- REKAWIECKI, R.; KOTWICA, J. Involvement of progesterone, oxytocin, and noradrenaline in the molecular regulation of steroidogenesis in the *corpus luteum* of the cow. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v.52, p.573-580, 2008.
- RHODES, R.C.; RANDEL, R.D.; LONG, C.R. *Corpus luteum* function in the bovine: in vivo and in vitro evidence for both a seasonal and breedtype effect. *Journal of Animal Science*, v.55, p.159-167, 1982.
- RICHARDSON, C. Personal communication. The development of the conceptus. In: ARTHUR, G.H.; PARKINSON, T.J. (Ed.). *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8nd ed. London: WB Saundres, 1996. p.68.
- ROBERTS, S.J. *Veterinary obstetrics and genital diseases theriogenology*. 3nd ed. Woodstock: Veremont, 1986. 981p.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3.ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. 264p.
- SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R. *et al.* Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, v.63, p.2382-2394, 2005.
- SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.P. *et al.* Follicular deviation and acquisition ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1403-1409, 2001.
- SAWYER, H.R. Structural and functional properties of the *corpus luteum* of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.45, Suppl., p.97-110, 1995.
- SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of *corpus luteum* function in cattle - an

- overview. *Reproduction of Domestic Animals*, v.39, n.1, p.241-251, 2004.
- SENGER, P.L. Reproductive cyclicity: the follicular fase. In: SENGER, P.L. *Pathways to pregnancy and parturition*. 2nd ed. USA: Current Conception, 2003. cap.8, p.164-187.
- SILVESTER, L.M.; LUCK, M.R. Distribution of extracellular matrix components in the developing ruminant *corpus luteum*: a wound repair hypothesis for luteinization. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.116, n.1, p.187-198, 1999.
- SIMPSON, R.B.; CHASE, J.R.; SPICER, C.C.; VERNON, R.K. *et al.* Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular estradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus an Brahman cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.102, p.483-492, 1994.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Heifers Monitored by Real-Time Ultrasonography. *Biology of Reproduction*, v.39, p.308-317, 1988.
- SISSON, S.; GROSSMAN, J.D. *Anatomia dos animais domésticos*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 1986. 887p.
- SMITH, M.F.; McINTUSH, E.W.; SMITH, G.W. Mechanisms associated with *corpus luteum* development. *Journal of Animal Science*, v.72, n.7, p.1857-1872, 1994.
- SOLANO, R.; CARAL, J.; MARTINEZ, C. *et al.* Distribución, duración y detección del estro en el ganado bovino. Momento de la ovulación. *Revista Cubana de Reproducción Animal*. v.8, n.2, p.69-82, 1982.
- STOUFFER, R.J. Structure, function, and regulation of the *corpus luteum*. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. *Physiology of Reproduction*. 3rd ed. St.Louis: Elsevier, 2006. v.1. cap.12, p.475-526.
- TAMANINI, C.; DE AMBROGI, M. Angiogenesis in developing follicle and *corpus luteum*. *Reprod. Domest. Anim*, v.39, p.206-216, 2004.
- TAYLOR, C.; RAJAMAHENDRAN, R. Follicular dynamics and *corpus luteum* growth and function in pregnant versus non pregnant dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.74, n.1, p.115-123, 1991.
- TOM, J.W.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Quantitative ecotexture analysis of bovine *corpora lutea*. *Theriogenology*, v.49, n.1, p.115-123, 1998.
- VIANNA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F. *et al.* Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.51, n.3, p.251-256, 1999.
- VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F. *et al.* Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.12, p.2501-2509, 2000.
- VIZCARRA, J.A.; WETTEMANN, R. P.; BRADEN, T. D. *et al.* Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on serum and pituitary concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone, GnRH receptors, and messenger ribonucleic acid for gonadotropin subunits in cows. *Endocrinology*, v.138, p.594-601, 1997.
- WILTBANK, M.C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle *corpus luteum* function. *Journal of Animal Science*, v.72, p.1873-1883, 1994.
- WILTBANK, M.C.; NISWENDER, G.D. Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the

*corpus luteum* in domestic ruminants. *Animal Reproduction Science*, v.28, p.103-110, 1992.

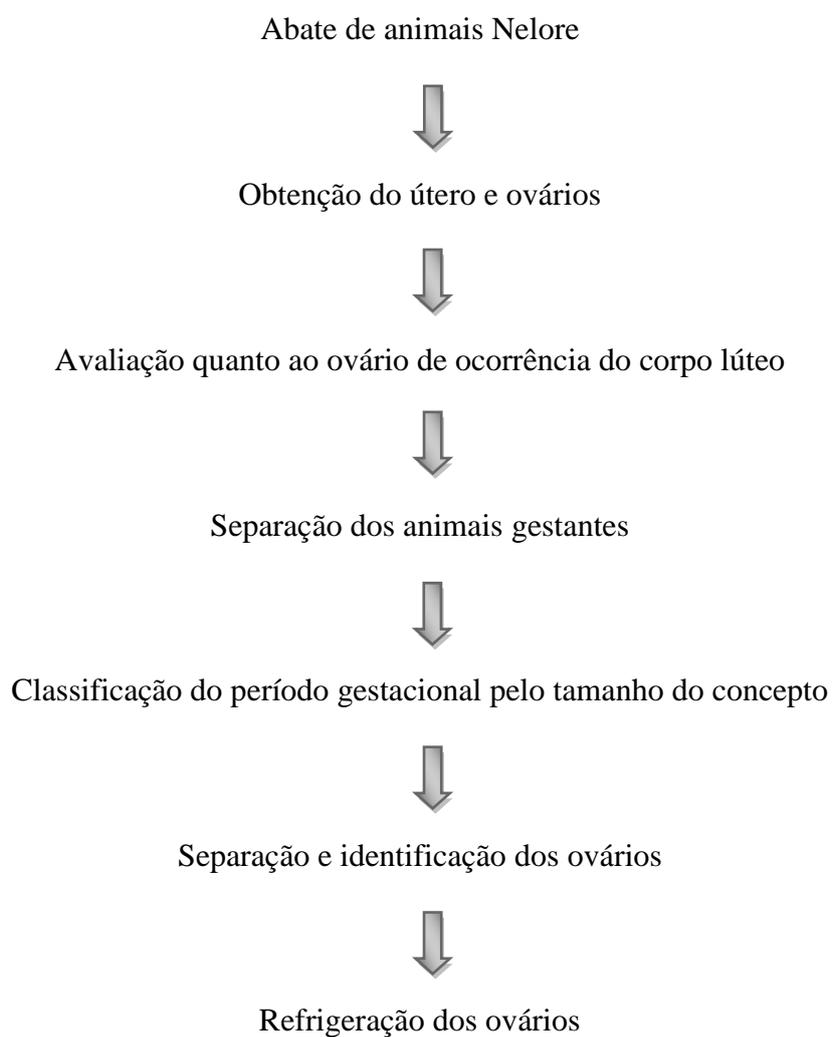
YAMADA, O.; ABE, M.; TAKEHANA, K. *et al.* Microvascular changes in the bovine *corpus luteum* during pregnancy. *Journal of*

*Veterinary Medical Science*, v.57, n.1, p.75-79, 1995.

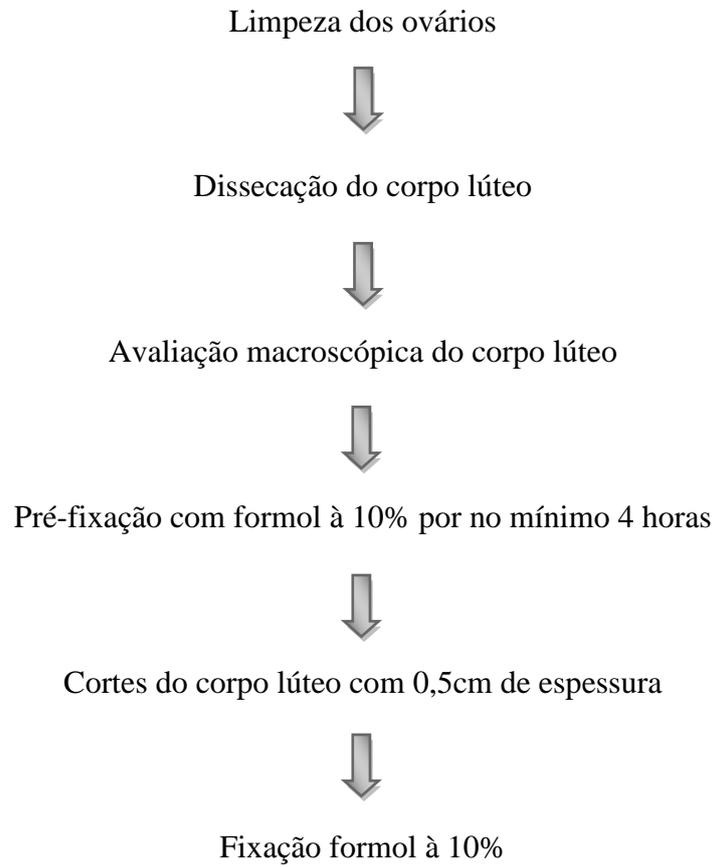
ZEITOUN, M.M.; RODRIGUEZ, H.F.; RANDEL, R.D. Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. *Theriogenology*, v.45, p.1577-1581, 1996.

## ANEXOS

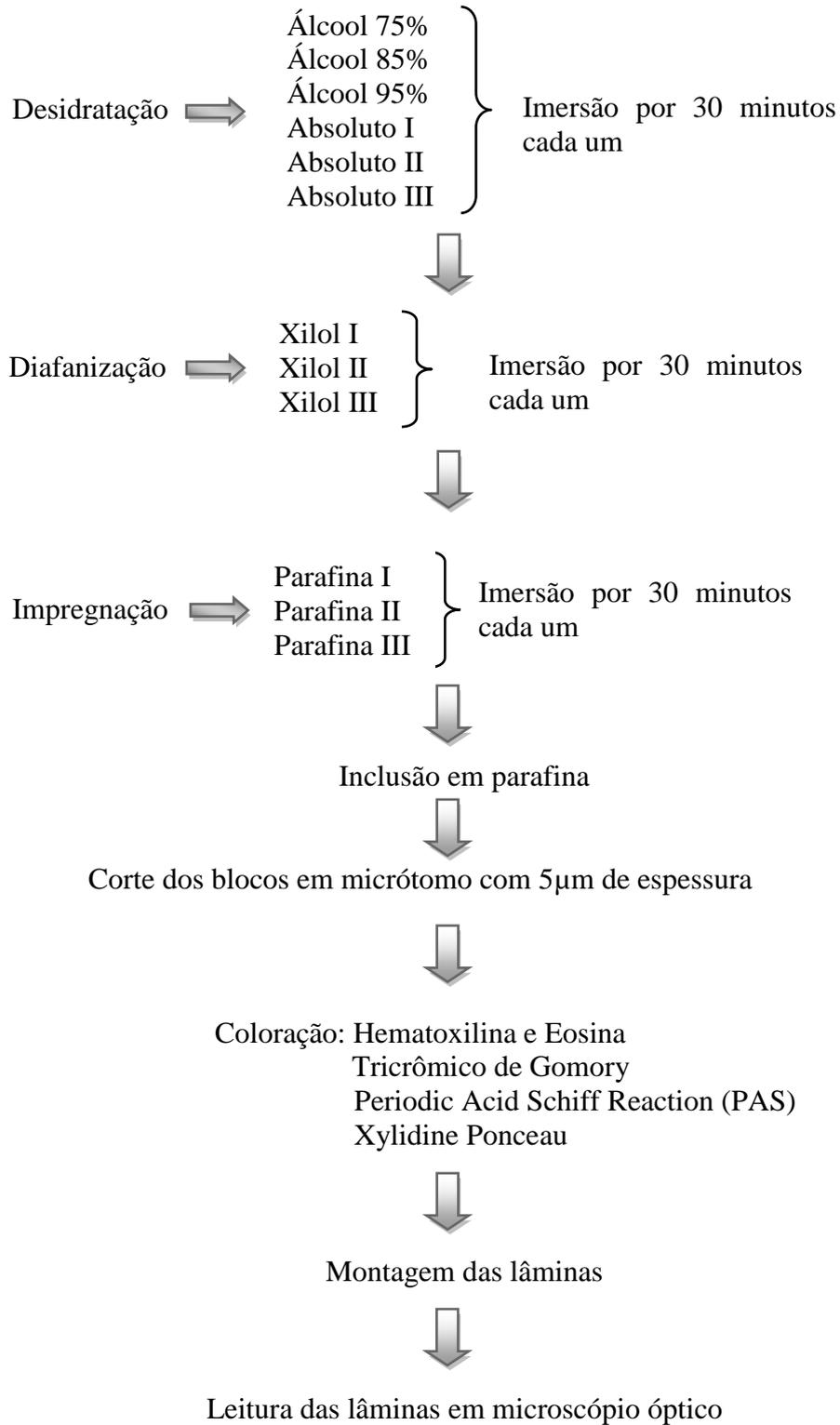
### Anexo I: coleta do material no frigorífico



## Anexo II: avaliação laboratorial



### Anexo III: processamento histológico do corpo lúteo



## Anexo IV

1. Mensurações do corpo lúteo, avaliando sua localização nos ovários esquerdo ou direito, submetidas à análise de variância referente à tabela 1.

Análise de Variância

<b>Fontes de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>
Total (48-1)	47
Tratamentos (3-1)	2
Erro	45

2. Mensurações do corpo lúteo para avaliação da proporção volumétrica submetidas à análise de variância referente à tabela 2.

Análise de Variância

<b>Fontes de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>
Total (48-1)	47
Tratamentos (3-1)	2
Erro	45

3. Mensurações do corpo lúteo para avaliação do diâmetro nuclear médio submetidas à análise de variância referente à tabela 3

Análise de Variância

<b>Fontes de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>
Total (18-1)	17
Tratamentos (3-1)	2
Erro	15

## Anexo V



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 31/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Características morfológicas do corpo lúteo de vacas nelore (*bos taurus indicus*) ao longo da gestação**", que tem como responsável(is) **Antônio de Pinho Marques Júnior**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **12/ 05/2010**.

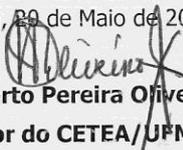
Este certificado expira-se em **12/ 05/ 2015**.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 31/2010**, related to the project entitled "**Morphological characteristics of the corpus luteum of nelory cows (*bos taurus indicus*) throughout gestation**", under the supervisors of **Antônio de Pinho Marques Júnior**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 12, 2010**.

This certificate expires in **May 12, 2015**.

Belo Horizonte, 29 de Maio de 2010.

  
**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Coordenador do CETEA/UFMG**

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  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)