

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUACAO EM MEDICINA ANIMAL: EQÜINOS

**DENSIDADES HISTOLÓGICA E ECOGRÁFICA DO CORPO LÚTEO DE
ÉGUAS.**

AUTOR:

GUSTAVO ADOLFO MARTINEZ NUÑEZ

ORIENTADOR:

DRA. ADRIANA PIRES NEVES

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUACAO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

**DENSIDADES HISTOLÓGICA E ECOGRÁFICA DO CORPO LÚTEO DE
ÉGUAS.**

AUTOR:

GUSTAVO ADOLFO MARTINEZ NUÑEZ

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos
da Faculdade de Medicina Veterinária
da UFRGS como requisito parcial para obtenção de
grau de Mestre.

ORIENTADOR:

DRA. ADRIANA PIRES NEVES

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Martinez Nunez, Gustavo Adolfo
DENSIDADES HISTOLÓGICAS E ECOGRÁFICA DO CORPO LÚTEO
DE ÉGUAS / Gustavo Adolfo Martinez Nunez. -- 2014.
44 f.

Orientadora: Adriana Pires Neves.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Corpo lúteo . 2. Ovário . 3. Ciclo estral. 4.
Pixéis lúteos. 5. Densidade celular . I. Pires
Neves, Adriana , orient. II. Título.

GUSTAVO ADOLFO MARTINEZ NUÑEZ

**DENSIDADES HISTOLÓGICA E ECOGRÁFICA DO CORPO LÚTEO DE
ÉGUAS.**

APROVADO POR:

Profa. Dra. Adriana Pires Neves.

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky.

Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho.

Profa. Dra. Sandra Fiala Rechsteiner.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Adriana Pires Neves, pela orientação e olho crítico construtivo.

Ao Prof. Dr. Sergio Ivan Dos Santos, pela ajuda na análise estatística do trabalho.

A equipe do Frigorífico Foresta de São Gabriel - RS, pela ajuda e oportunidade de coletar o material.

Ao Médico Veterinário Henrique Boll de Araujo Bastos pela colaboração no processo de coleta de amostras.

A Médica Veterinária Zootecnista Erika Brigith Quesada Navarro, pela ajuda na fase prática do projeto.

Ao Médico Veterinário Fabio Dos Santos Teixeira pela ajuda e colaboração na obtenção de imagens ultrasonográficas.

Ao pessoal do REPROLAB por dois anos de troca de experiências e conhecimento.

DEDICATORIA

*De todo corazón, quiero dedicarles este trabajo a mis padres,
Carmen Felina Niñez Grazziani y Gustavo Adolfo Martínez Reyes,
quienes por mas lidia que les puede dar, siempre confiaron en mí,
en mis decisiones y quienes muchas veces,
aun estando en contra tal vez de alguna de mis ideas,
siempre optaron por permitir que fuese yo quien tuviese la última palabra.
Gracias por colocar cada uno lo mejor de sí para forma
la persona que hoy con orgullo puedo decir que soy.
Gracias infinitas por estar siempre conmigo.*

DENSIDADES HISTOLÓGICA E ECOGRÁFICA DO CORPO LÚTEO DE ÉGUAS .

RESUMO

A morfologia e a fisiologia ovariana nos equinos têm sido motivo de estudo devido a seu córtex e medula invertidos em comparação às das outras espécies mamíferas e seu ciclo reprodutivo fotoperíodo-dependente e à existência de uma fossa de ovulação. Estes aspectos levam ao profissional do campo da reprodução equina a se interessar em aprofundar cada vez mais no desenvolvimento de pesquisas que possam auxiliar oferecendo métodos e técnicas que ajudem no trabalho de campo. Uma das melhores técnicas utilizadas para o estudo da atividade ovariana têm sido as imagens ultrassonográficas nos seus diferentes modos de operação. Uma das estruturas ovarianas que se pode avaliar e acompanhar com o ultrassom é o Corpo Lúteo (CL), sendo ele vital pela produção de Progesterona (P4), hormônio encarregado da preparação do endométrio para oferecer um ambiente ao embrião. É relatada uma relação positiva entre quantidade de células lúteas e produção de P4. O objetivo deste estudo foi testar uma metodologia que permitisse avaliar a densidade celular por meio da histologia e determinar se existe relação com o número de pixéis lúteos numa imagem de ultrassom e assim ter um dado confiável para tomar decisões. Foram coletados 29 ovários de éguas crioulas em diferentes fases do diestro, analisados todos dentro de um único grupo. As amostras foram passadas pelo ultrassom para obter a imagem ultrasonográfica salva diretamente do ultrassom. Posteriormente, os CLs foram dessecados para fazer laminas corada pela Hematoxilina Eosina. Os resultados mostraram que entre as variáveis existe correlação inversa de $R=-0.61$. O coeficiente de determinação achado foi de aproximadamente $R^2=40\%$ com uma probabilidade $P=0.04\%$. Os resultados indicam que, existem variações no número de pixéis lúteos que podem explicar em grande percentagem os valores totais do número de células presentes no tecido lúteo.

Palavras chave: Corpo lúteo, ovário, ciclo estral, luteinização, pixéis lúteos, densidade celular, imagem, equinos.

ABSTRACT

The ovarian morphology and physiology in horses has been the subject of study due to its reversed cortex and medulla in comparison to other mammalian species, the existence of an ovulation fossa and for its photoperiod-dependent reproductive cycle. These aspects lead to the field practitioner specialist on equine to develop research that may help at fieldwork. One of the best techniques for the study of ovarian activity has been the ultrasonographic images in its different modes of operation. The corpus luteum (CL) is one of the ovarian structures that can be assessed and followed by ultrasound, being vital for the production of progesterone (P4), hormone which prepares the endometrium to provide a good environment for embryo development. A positive relationship between amount of luteal cells and P4 production has been reported before. The aim of this study was to test a methodology that would assess cell density by histology and determine whether there is a correlation between the number of ultrasound image pixels and the luteal cells concentration and thus have a really trusted ultrasound data which might help veterinarians to make decisions. Twenty nine ovaries from criollo mares were collected at different stages of diestrus, and all analyzed within a unique group. Samples were assessed by ultrasound to obtain the ultrasonographic image. After that, the CLs were dried to make microscopy slides stained with hematoxylin-eosin. The results showed that an inverse correlation ($r = -0.61$) exists between the variables studied. The determination coefficient found was approximately $R^2 = 40\%$ with a probability of $P = 0.04\%$. The results indicate that there are variations in the number of pixels that can explain differences in the numbers of luteal cells in the corpus luteum tissue.

Key words: Corpus luteum, ovary, estrus cycle, luteinitation, luteal pixels, cellular density, image, equine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Estrutura da parede do folículo de Graaf _____ **16**
- Figura 2-** Imagens de 2 CL de uma prenhez equina de 48 dias mostradas em modo colour-flow (A) e powerflow (B) de secções similares. (Adaptado de Ginther & Utt; 2004). _____ **24**
- Figura 3-** (A) delimitação da imagem lutea no programa Image Pro Plus, (B) contagem dos píxeis luteais no programa Image Pro Plus. _____ **28**
- Figura 3-** Contagem celular de um dos campos das lâminas histológicas do CL com o programa Image J em 40x. _____ **29**
- Figura 4-** Regressão Linear. Correlação entre LPV e densidade celular achada na histologia _____ **30**

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Analise de resíduos_____	40
ANEXO B. Histologia, CL em fase não funciona_____	41
ANEXO C. Resumo dos resultados_____	42
ANEXO D. Analise de Variância (ANOVA)_____	43

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	11
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	12
2.1. Ovário _____	12
2.2 Folículos _____	14
2.3. Corpo lúteo _____	17
2.3.1. Desenvolvimento do corpo lúteo _____	17
2.3.2. Morfologia do corpo lúteo _____	19
2.3.4. Síntese de progesterona _____	20
2.3.5. LH e o CL _____	20
2.3.6. Avaliação e imagem ultrassonográfica do corpo lúteo _____	21
2.3.7. Luteólise _____	24
2.3.8. Insuficiência lútea _____	26
3.1. Objetivo geral _____	26
3.2. Objetivos específicos _____	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS _____	27
4.1 LOCALIZAÇÃO _____	27
4.1.1. Local de recuperação de tratos reprodutivos _____	27
4.1.2. Local de estudo _____	27

4.2. Seleção de animais	27
4.3. Processamento dos ovários	27
5. ANÁLISE DE DADOS	29
6. RESULTADOS	29
7. DISCUSSÃO	30
8. CONCLUSÕES	32
9. BIBLIOGRAFIA	33
ANEXOS	40

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. INTRODUÇÃO

O ovário das éguas tem sido descrito macroscopicamente há vários anos utilizando peças tomadas após o abate ou com aparelhos de ultrassom. A disposição da medula vascular e a córtex ovárica, que é contrária dos ovários da vaca e a existência de uma fossa de ovulação (TIMOTHY, 2007), fazem com que os ovários da égua não possam ser avaliados da mesma maneira que em outras espécies. Estas diferenças morfológicas influem na fisiologia do ovário. Portanto, existem vários eventos na fisiologia da reprodução da égua ainda não são conhecidos em profundidade e necessitam de maior estudo.

Embora a égua seja poliéstrica estacional, em condições do trópico não se tem observado estacionalidade, com exceção de éguas que passam por um stress nutricional. Neste caso, os animais têm uma diminuição na atividade ovariana, levando em muitos casos a confundir com estacionalidade (SAMPER, 2000). Além da nutrição, outro fator determinante pode ser a raça. Em alguns casos, raças que não tem sangue do cavalo Árabe na sua estrutura genética possuem ciclos estrais mais curtos, contrário ao puro sangue de corrida, que apresenta ciclos mais longos (MOREL, 2005)

Sendo o corpo lúteo uma das estruturas mais importantes para o ótimo desempenho reprodutivo dos mamíferos, é também uma das estruturas que ainda oferece uma gama muito alta de aspectos, características e variáveis por descobrir, analisar e compreender, por isto é importante o desenvolvimento de técnicas que permitam o análise da estrutura lútea, utilizando as tecnologias que hoje temos disponíveis como o caso da ultrassonografia que permite analisar as diferentes estruturas internas dos animais sem ter que leva-los ao abate, neste caso poder determinar a viabilidade de um CL obtendo o dado aproximado da sua densidade celular por meio do valor de pixéis lúteos na ultrassonografia. A técnica ajudaria aos profissionais que comandam os programas de reprodução assistida de equinos, facilitando a escolha de fêmeas que seriam utilizadas como receptoras nas transferências de embriões tanto como na escolha do momento o ciclo estral certo para obter gestações exitosas seja por inseminação artificial ou monta direta, baseados no principio de que

um bom corpo lúteo oferece uma maior confiabilidade e aumenta as possibilidades de êxito nas gestações.

Atualmente, o profissional que trabalha com reprodução animal, conta com o ultrassom, o que hoje se considera a técnica mais confiável para identificação dos diferentes estados do corpo lúteo (CL) baseados na sua morfologia (FRAZER, 2003), porém, ainda não existem as referências exatas dos diversos fenômenos fisiológicos do ovário, incluindo os processos de formação, manutenção e lise do corpo lúteo. Na fêmea equina, a puberdade inicia entre os 15 e 18 meses de idade. É caracterizada por ter um ciclo poliéstrico estacional. Isto equivale a vários cios durante uma estação reprodutiva. É fotoperíodo-dependente, já que para iniciarem os ciclos precisa-se de um aumento de horas-luz diárias, as quais têm efeito através do olho sobre a glândula pineal. Quando há dias longos, ou seja, mais horas de luz, a melatonina diminui. No caso contrário, de mais horas de escuridão, observa-se um aumento na melatonina. Quando a melatonina acha-se em valores mais elevados inibe a liberação do hormônio luteinizante (LH). No caso de valores menores da melatonina, registram-se elevações nos níveis de LH. No trópico, acredita-se que as fêmeas equinas ciclem regularmente ao longo do ano todo, mas alguns resultados de pesquisas recentes demonstram a existência de certo tipo de estacionalidade com a máxima atividade reprodutiva presente do mês de março a maio e de agosto a outubro (HERRERA ALVAREZ, 2004).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ovário

Diferente das gônadas do macho (testículos), os ovários ficam dentro da cavidade abdominal. Suas funções são tanto exócrinas (liberação de óvulos) como endócrinas (esteroidogênese). No momento da fase de formação do ovário dentro do feto, as células germinais primordiais originam-se fora da gônada para depois migrar pelo mesentério do saco vitelino até as cristas genitais (CINTORA, 2009).

O ovário conta com uma camada epitelial superficial modificada que provem da cobertura peritoneal visceral. Este epitélio é cúbico durante a etapa de desenvolvimento

ovárico inicial e a ovogenese, isto muda a epitélio escamoso com a idade. No ovário podem se diferenciar duas zonas caracterizadas por sua morfologia, fisiologia e funcionalidade. O córtex esta composta por tecido conectivo altamente denso e pouco vascularizado, onde estão os folículos, desde os primordiais até os de GRAFF. A Medula do ovário esta formada por uma mistura de fibras conectivas, fibras musculares e uma grande quantidade de vasos sanguíneos.

Ao nascimento, forma-se uma camada de células foliculares que rodeia os oócitos primários dentro do ovário para formar o conhecido como folículo primordial. A égua apresenta um maior número de folículos primordiais em relação às outras espécies de produção (CINTORA, 2009). O começo da atividade reprodutiva ou puberdade das éguas começa em torno aos 12 e 24 meses, nesta fase da vida o trato reprodutivo começa a ter interação com outras partes do corpo levando a ter a primeira ovulação (ovulação e o processo por o qual a célula reprodutora de fêmea – ovulo – e liberada do folículo com a finalidade de ser fecundada por o espermatozoide). Também são produzidas mudanças físicas e comportamentais ligadas a este evento com o objetivo de garantir que a fêmea seja coberta por o macho no momento certo para ter uma prenhes exitosa (CINTORA, 2007). A forma e tamanho do ovário variam de acordo com a espécie e etapa do ciclo estral. Na égua, estas glândulas estão localizadas abaixo da quarta ou quinta vértebra lombar, sob os rins. Medem de 7 a 8 centímetros de comprimento por 3 a 4 cm de largura, têm forma de rim e pesam entre 70 e 80 gramas (BRINSKO et al., 2011). A avaliação do ovário equino tem grande importância na área clinica já que pode ajudar em os diagnósticos de possíveis patologias do trato reprodutivo, anestros, tumores e outras coisas (TIMOTHY, et al., 2007., FRAZER, GS. 2003). Durante a atividade da temporada reprodutiva os ovários podem aumentar em tamanho entre 6 e 8 cms de cumpridos e 3 a 4 de largos dependendo das estruturas presentes como os folículos em as diferentes etapas, e algumas éguas múltíparas podem atingir até 10 cm a mais durante a temporada reprodutiva (GINTHER, 1992, 1995; KAINER,1993., SERTICH,1998).

Os ovários apresentam: uma face medial e face lateral lisa e de forma arredondada, uma borda de inserção ou mesovárico (convexo), borda livre (localizado na fossa de ovulação), extremidade anterior ou tubárica (relacionada com a tuba

uterina), extremidade posterior ou uterina (contra o colo do útero) (CINTORA et al., 2009).

Na maioria dos animais domésticos a medula do ovario encontra-se na parte mais central do órgão e é rodeada pelo córtex (tecido produtor de gametas ativo). Na espécie equina a medula forma a camada mais externa da estrutura (tecido de suporte), por isto para poder ter uma ovulação, os folículos preovulatorios devem-se posicionar perto da fossa de ovulação, por este lugar o oócito consegue sair do folículo ovulado e chegar ao oviduto (HAFES. 2000).

No caso da égua o epitélio que cobre a fossa de ovulação tem continuidade com o resto do ovário como uma camada serosa simples. O estroma cortical é considerado um tecido especial, pois nele encontram-se células que normalmente seriam encontradas no tecido colágeno laxo, mas é considerado um tecido hiperplásico onde podemos achar uma alta presença de fibroblastos, com a particularidade de que não são fibroblastos normais, são fibroblastos pleomórficos e adaptativos, logrando assim adquirir diferentes características como ser epitelióide como teca folicular ou células pertencentes a glândulas intersticiais com relação a os folículos. Por outra parte a medula está conformada por tecido colágeno laxo com alto conteúdo de fibras elásticas e reticulares. O conteúdo da medula inclui grandes vasos, vasos linfáticos, nervos e alguns restos embrionários, os últimos são parte da rede ovarica sendo o homólogo na fêmea da *rete testis* (BANKS. W.J. 1996).

2.2 Folículos.

Os folículos são uma das estruturas funcionais dos ovários. Tem a função de produzir hormônios como o estradiol e a inibina. Guardam no seu interior o oócito (gameto da fêmea), oferecendo para ele todos os requerimentos necessários para reiniciar o processo de meiose. (GINTHER, OJ., et al. 2001) Após o nascimento inicia o processo de crescimento em formato de onda de grupos de folículos, mais só até alcançar a puberdade é que ocorre a ovulação (GINTHER., et al. 2001). Com o crescimento e maturação do folículo ocorrem algumas mudanças morfofisiológicas. Dependendo da etapa do desenvolvimento, os folículos podem ser classificados como:

- **Folículos primordiais:** são aqueles que ainda não chegaram a uma onda de crescimento. São caracterizado por ter um oócito rodeado por células foliculares planas. Estes folículos contem no seu interior um oócito primário isolado ou agrupados na zona cortical (BANKS. W.J 1996).
- **Folículos primários:** Ao iniciar o desenvolvimento, os folículos primordiais viram folículos primários ao sofrer algumas alterações no oócito primário, células foliculares e alguns outros elementos do estroma. Acumulam-se grânulos de vitelio (plasma germinativo) no interior do oócito primário e das células foliculares de planas a cúbicas (SHDOW e HAFES. 1996).
- **Folículos secundários:** Acontece um aumento no tamanho folicular por a multiplicação de células foliculares, que geram varias camadas alrededor do oocito fromando uma membrana conhecida como zona pelúcida que protegera ao oócito e embrião durante o desenvolvimento inicial (SHDOW e HAFES. 1996., BRINSKO, et al. 1996). As células foliculares mitoticamente ativas adquirem o nombre de células da granulosa que iniciam em pequenas quantidades a produção de liquido folicular (BANKS. W.J. 1996).
- **Folículos terciários ou antrais:** devido ao acumulo de liquido folicular aumenta consideravelmente o tamanho do folículo, levando a que as células foliculares migrem até a periferia e que o liquido fique em seu interior. São reconhecidas claramente duas camadas de células em a periferia do folículo, as células de a granulosa e as da teca. Conseguem-se achar pequenos espaços cheios de liquido folicular que eventualmente formarão o antro folicular. Nessa etapa o oócito primário encontra-se rodeado por u grupo de células da granulosa que não migraram até a periferia folicular e encontram-se em contato direto com a zona pelúcida. Este grupo de células e conhecido como cumulo ooforo. (BANKS. W.J. 1996).

- **Folículos de GRAFF:** Na égua, e considerado que um folículo é preovulatório quando chega a um tamanho de 3.5 a 6.0 cm de diâmetro e o antro folicular encontra-se totalmente formado. A posição do oócito é excêntrica e a parede folicular esta composta de células da granulosa, teca externa e teca interna.(BRINSKO, et al, 2011). As células da teca interna nasceram das células epitelioides grandes e uma importante rede vascular; enquanto as células da teca externa são fibroblastos que provem do estroma ovárico (BANKS. W.J. 1996).

Endocrinologicamente o ovário é de grande importância pois um numero considerável de substâncias estrogênicas são secretadas por ele a partir de precursores androgênicos (HAFEZ, 2000). Os estrógenos são produzidos nas células da teca interna e da granulosa do folículo ovárico (FIGURA 1) com o controle sinergista da FSH e LH e tal vez com influencia local de fatores locais como a inhibina (McDONALD, 1991).

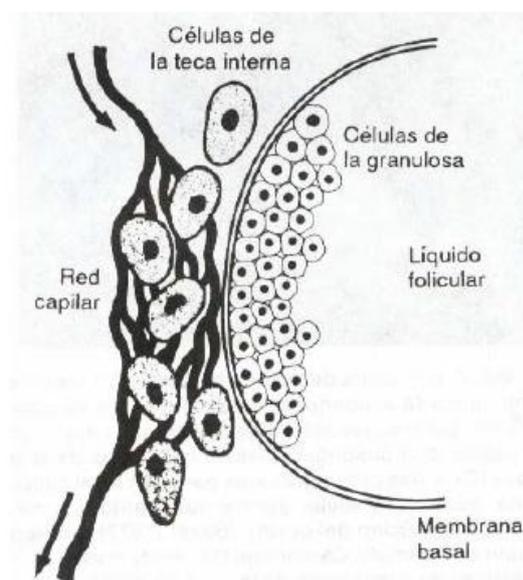


FIGURA 1. Estrutura da parede do folículo de Graaf

Outra das estruturas internas dos ovários que também tem função endócrina é o CL, principal produtor de Progesterona, vital por sua função progesteronal. A progesterona também é produzida pela placenta e glândulas adrenais e é transportada pelo sangue em forma de estrógenos unidos da globulina e sua secreção esta ligada diretamente ao hormônio LH (HAFEZ, 2000).

2.3. Corpo lúteo.

O corpo lúteo é uma glândula endócrina temporal que tem como principal função a produção de progesterona, vital para manter a gestação (WEBB et al., 2002). A formação do corpo lúteo começa após o rompimento do folículo na ovulação. Na parede interna do folículo colapsado começam se gerar pregas micro e macroscópicas que entram na cavidade central, compostos pelos núcleos centrais dos tecidos do estroma e vasos sanguíneos. A hipertrofia e luteinização das células da granulosa começam após a ovulação (HAFEZ, 2000).

2.3.1. Desenvolvimento do corpo lúteo

Imediatamente após a ovulação, no dia que consideraremos o dia 0 do ciclo, na maioria dos casos, fios de sangue preenchem rapidamente o espaço ovulatório formando a *Corpora Hemorrhagica* ou Corpo Hemorrágico (CH), que aparece aproximadamente em 10% dos CL (GINTHER, 1995). Esta estrutura aparece na ultrassonografia como partículas ecogênicas ocupando o espaço folicular, produto do sangue contido dentro deste espaço durante um ou dois dias após a ovulação (YOUNGQUIST, 1997). A fibrina e o coágulo de sangue são ecogênicos, mas algumas imagens do CL apresentam áreas em forma de rede com espaços brancos e pretos intercalados. Os dois tipos de estrutura apresentam uma forma de cogumelo na ultrasonografia em modo B (Ginther, 1995). A aparição ou não desse CH não é funcionalmente importante, pois aparece apenas na metade das glândulas lúteas e não altera o tempo em que a glândula é captada pela ultrasonografia nem o tempo de intervalo inter-ovulatório (PIERSON e GINTHER, 1985).

Após a ovulação, as células do folículo são estimuladas pelo LH e são hipertrofiadas mostrando mudanças morfofisiológicas. Assim, as células da granulosa tornam-se células lúteas grandes e as células da teca interna tornam-se células lúteas pequenas. (HAFEZ e HAFEZ, 2000). O processo é caracterizado pelo acúmulo de pigmento lipídico amarelo que se conhece como luteína além de outros lipídios. Além disso, estas células dão início à liberação de progesterona dentro das primeiras 24 a 48 hrs post-ovulacao. (HAFEZ e HAFEZ, 2000). Todo este processo de maturação completa do CL ocorre normalmente entro o dia 5 e 6 após ovulação, tempo em que são

atingidos níveis de Progesterona de 10 Ng/ml. O CL tem um incremento no seu peso bastante rápido no início. Geralmente o tempo de crescimento é só um pouco maior que a metade do ciclo estral. Nas espécies de produção, o diâmetro do CL geralmente é maior que o diâmetro de um folículo maduro, o que é totalmente diferente com o que acontece com a égua, já que nesta espécie o diâmetro é menor (HAFEZ e HAFEZ, 2000). A Progesterona tem um efeito de inibição de gonadotrofinas nos animais de produção e o ciclo estral não pode começar até os níveis de progesterona tenham decido até 1ng/ml (GINTHER e FIRST, 1971). Normalmente um CL equino de um ciclo não fértil o tempo funcional é entre 14 e 15 dias (DAELS e HUGHES, 1993).

Tem-se utilizado diferentes termos pra se referir ao CL nas diferentes etapas do seu desenvolvimento, seja durante a gestação ou do ciclo estral:

- ❖ CL primário: É o resultado de uma ovulação simples ou múltipla durante a parte folicular do ciclo (SAMPER et al., 2007).
- ❖ CL secundário: aquele que aparece durante a fase lútea do ciclo, podendo ser resultado de ovulações de diestro (após 2 dias da ovulação primária) ou durante a gestação sob a dominância da Progesterona (SAMPER et al., 2007).
- ❖ CL acessório: resultado da luteinização de um folículo anovulatório durante a gestação, geralmente por ação da gonadotrofina coriônica equina. (SAMPER et al., 2007).

Após a perda de líquido folicular no processo de ovulação, cerca de 30% a 50% dos CL desenvolvem-se uniformemente, sem a formação de uma cavidade intraluteal, enquanto 50% a 70% das glândulas lúteas acumulam líquido dentro da cavidade antral, formando os CL hemorrágicos (KURJAK e CHERVENAK, 2008).

A reabsorção da estrutura lútea começa por um decréscimo na vascularização, crescimento e organização de tecido conjuntivo (regressão estrutural) (GINTHER, 1992), momento também caracterizado pelo decréscimo na produção de progesterona (regressão funcional), sob a influência da PGF_{2a} produzida no útero (DOUGLAS e GINTHER, 1975). Durante o resto do diestro, o *corpus albicans*, como é conhecido o CL na sua etapa de eliminação, segue em regressão e seu pigmento é condensado, tornando-se mais escuro; atingindo cores como marrom, vermelho ou laranja, terminando numa cor amarela clara até desaparecer no estroma enquanto o ciclo reinicia. Em termos gerais a morte das células lútea é controlada por três mecanismos: Apoptose, necrose (Kerr et al., 1972) e diferenciação terminal (Stenn, 1983).

2.3.2. Morfologia do corpo lúteo

Algumas características no corpo lúteo nos equinos como trabeculações que resultam do colapso do folículo preovulatório na ovulação (LAWLER, HOPKINS, WATSON., 1999). As trabeculações estão formadas por matriz extracelular, fibroblastos e pequenas células (HARRISON, 1946), que ajudaram na abundante vascularidade do CL. As células grandes esteroidegênicas do corpo lúteo tem origem no tecido granuloso do folículo colapsado (VAN NIEKERK, MORGENTHAL, GERNEKE. 1975). Nas éguas tem sido demonstrado que o CL esta composto por três tipos de células: células lútea pequenas, células lúteas grande e células endoteliais. Foi demonstrado que na espécie equina as células lúteas grandes sofrem um decrescimento entre a metade e o final do diestro e que a proporção de células lúteas pequenas aumentam diretamente com o aumento nos dias do diestro (Watson and Sertich, 1990).

Diferente de as outras espécies, na égua, não tem sua origem na teca interna (VANNIEKERK et al., 1975, GINTHER. 1992), já que as células da teca interna são submetidas a uma regressão dentro das primeiras 24 hrs após a ovulação. (VAN NIEKERK et al., 1975). A repetida mitose das células esteroidegênicas durante o desenvolvimento do CL, esta acompanhada de alto e intenso processo de angiogênese que atinge seu pico nos dias 2 ou 3 após a ovulação (REYNOLDS, GRAZUL-BILSKA, REDMER., 2000).

2.3.3. Angiogênese lútea.

As rápidas mudanças no crescimento e regressão lúteas precisam também de uma rápida resposta nas mudanças vasculares (WEBB et al., 2002). A angiogênese consta por o menos de três etapas; o rompimento da membrana vasal de vasos existentes, migração de células endoteliais para obter um estímulo angiogênico e a proliferação de células endoteliais para ajudar na formação de os novos vasos sanguíneos (REDMER et al., 2001). Estudos em ruminantes demonstraram que os principais fatores angiogênicos são o fator básico de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) esses fatores estimulam a Ang II, PGF2 e a secreção de progesterona (REYNOLDS et al., 1999)

2.3.4. Síntese de progesterona.

A progesterona é o principal produto secretado por o CL. Após a estimulação da LH, a teca interna sintetiza androgênios, que, posteriormente, se difundem através de a membrana basal. Dentro de as células de a granulosa os androgênios são convertidos para estradiol-17 β por a enzima Aromatase que está sob o controle do hormônio folículo estimulante (FSH) (SQUIRES, 1993). A ligação entre a LH e seu receptor promove a secreção de progesterona, por ativação de Adenilciclase, que sintetiza o cAMP, um mensageiro intracelular que é responsável por a ativação de as enzimas envolvidas na síntese de progesterona (NISWENDER et al., 1994; WEEMS et al., 2006). No entanto em alguns estudos, a adição de LH, dbAMPc ou ionóforo de cultura de células não afetou consistentemente a secreção de progesterona nas células lúteas na égua (WATSON e SERTICH, 1990). O colesterol necessário para a síntese de progesterona pode ser obtido a partir de lipoproteínas de alta ou baixa DENSIDADE (HANSEL, ALILA, DOWD, YANG., 1997). Na égua a produção de progesterona começa no início da formação da estrutura lútea, esta síntese é acompanhada também por a formação de receptores de progesterona nas células lúteas grandes, microvascularização lútea, expressão de o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e de um grande número de células lúteas (ROBERTO DA COSTA et al., 2005).

2.3.5. LH e o CL

O LH é um hormônio que aumenta antes da ovulação sob o efeito de fatores do meio ambiente como a duração do fotoperíodo, já que depende da depleção do GnRH (IRVINE e ALEXANDER., 1993). A máxima concentração de este hormônio se apresenta no dia 2 após a ovulação. As concentrações de LH se mantêm baixas durante aproximadamente a metade do diestro, começa seu aumento alguns dias antes do estro alcançando seu valor Máximo após a ovulação para começar a diminuir até valores baixos do diestro (GINTHER, 1992). Particularmente na espécie equina o LH pode se manter alto dias após a ovulação o que é considerado importante para o bom desenvolvimento do CL (NODEN et al., 1975). O aumento dos níveis de LH em presença de folículos preovulatorios estimula seu crescimento, a ovulação e a formação

do CL. A maioria dos receptores de LH tem sido notificados presentes nas células lúteas pequenas (ALEXANDER e IRVINE, 1993)

2.3.6. Evacuação e imagem ultrassonográfica do corpo lúteo

Por a conformação anatômica do ovário da égua, a palpação transretal do CL não é factível, já que sua posição interna não permite sentir a estrutura lútea na superfície do ovário (SQUIRES et al., 1988).

O CL é, sem dúvida, a estrutura mais importante durante a fase lútea do ciclo estral dos mamíferos, sendo o maior responsável pela manutenção da gestação na maioria destas espécies (NISWENDER e NETT, 1993). A presença do CL foi determinada com metodologia complexa e indireta, como os níveis de progesterona em fluidos corporais como o plasma, ou por métodos invasivos, como laparotomia e laparoscopia (SCHRICK et al., 1993; GINTHER e KOT, 1994; LOPEZ, et al., 1997). Hoje se sabe que o CL pode ser avaliado com a ultrassonografia (BARTLEWSKI et al., 1999; GONZALEZ-BULNES et al., 2000), levando em consideração que a posição invertida da medula e do córtex torna difícil achar o CL por palpação retal (SAMPER et al., 2007).

A ultrassonografia converteu-se em uma ferramenta importante para o conhecimento e estudo de estruturas internas, como folículos e CL, com uma metodologia pouco invasiva na maioria das fêmeas domésticas (GRIFFIN E GINTHER, 1992; DUGGAVATHI et al., 2003), oferecendo imagens em tempo real e com uma frequência de repetição que não poderiam ser feitas com técnicas como a laparotomia. Assim, minimiza-se o manejo e estresse do animal, favorecendo o seguimento e estudo da dinâmica folicular e do CL entre outras coisas em espécies como ovelhas, vacas éguas e outras (SCHRICK *et al.*, 1993; GINTHER e KOT, 1994; LOPEZ-SEBASTIAN et al., 1997).

De fato com a utilização da ultrassonografia em modo B, o CL na égua pode ser identificado até o dia 17 após a ovulação ou até 5 dias antes da posterior ovulação (PIERSON e GINTHER, 1985). As características ultrassonográficas de alguns CLs são muito similares com as de o estroma ovárico, mas o tecido lúteo pode ser claramente identificado por uma margem que se forma por a impedância acústica de os tecidos (PIERSON e GINTHER, 1985). O brilho e contraste em a escala de cinzas, de acordo

com a porcao ecogênica da glândula lútea, pode ser um indicativo de a hemodinâmica da estrutura (PIERSON e GINTHER, 1985). As imagens ultrassonograficas do CL podem ser afetadas por o conteúdo sanguíneo no interior da estrutura já que o sangue é semi-ecogenico e o soro sanguíneo e anecóico. Geralmente, a luteinização começa na periferia da estrutura lútea. O CL é normalmente ecogênico em os dias 0 e 1 claramente por as características ecogênicas das paredes do folículo colapsado (SQUIRES et al., 1988). A ecogenisidade do CL diminui durante os primeiros 6 dias do diestro, se mantendo em um nível mínimo para aumentar o dia 12 até o dia 16 (PIERSON e GINTHER, 1985). Este aumento em o brilho durante a regressão do CL são indicativos de uma diminuição em o fluxo sanguíneo, aumento da densidade do tecido, e a infiltração de fibrina (PIERSON e GINTHER, 1985).

Algumas de as indicações para o estudo e analise do CL são: detecção de a ovulação, avaliar a formação do CL, determinar tamanho e características do CL, determinar se a falta de ciclisidade de uma égua e por presença prolongada de CL ou ausência de uma CL e atividade folicular, distinguir entre folículos anovulatórios hemorrágicos, folículos luteinizados que não ovularam e CLS e finalmente para determinar ovulações múltiplas (Townson e Ginther, 1989). Pierson e guinther (1989) sugerem que que a intensidade ecognica lutea pode refletir o frau de hemodinâmica do CL e diretamente a produtividade. Guinther achou que o período de diminuição de progesterona no começo do fim do diestro, coincide temporalmente com os valores ecogênicos mais altos, em quanto os níveis mais alto de producao de progesterona aparecem na metade do diestro e coincidem com os valores ecgênicos bais baixos (GUINTHER, 1992).

A mensuração da área ecográfica e o diâmetro do CL se realizam por meio de linhas perpendiculares similares às utilizadas na mensuração do diâmetro das estruturas foliculares pré-ovulatórias (SAMPER et al, 2007; KURJAK e CHERVENAK, 2008).

A primeira etapa, conhecida como corpo hemorrágico (CH) se caracteriza por ter uma parede grossa, que na imagem de ultrassom mostra-se hiperecólica, em volta de um centro hipoecóico (KURJAK e CHERVENAK, 2008). A ecogenicidade do CL talvez determine a localização em uma escala da proporção que a glândula ocupa dentro do ovário. Grandes áreas ecogênicas indicam valores baixos na escala ou menor porção lútea, enquanto altos valores na escala indicam maior porção lútea ou mais área ecogênica (SAMPER et al., 2007).

Devido à importância do ótimo funcionamento do CL durante os ciclos regulares ou na gestação, têm-se buscado determinar uma forma prática e eficiente de avaliar a viabilidade e funcionalidade do CL durante o exame clínico. Em humanos, foi desenvolvido um método de avaliação do CL por meio do Valor dos Pixeis Luteais (LPV= Luteal Pixel Value), onde, através da ultrassonografia, se determina se o CL tem ou terá a capacidade de manter uma gestação. Para tal, toma-se dados ecográficos como morfologia, tamanho e volume, além de parâmetros mais específicos como a vascularização por meio da dopplervelocimetria colorida, em busca de um CL eficiente com associação entre sua morfologia e funcionalidade (PAREJA et al., 2010). Baseado nesta prática em humanos, surgiu a iniciativa de comparar a densidade celular medida na histologia e o LPV. Algumas variáveis como peso do ovário completo contra peso do ovário com o CL extraído, número de células lúteas contadas na histologia contra o número de píxeis da imagem ultrasonográfica do CL foram mensuradas em equinos (NUNEZ et al., 2012). Em bovinos foram adiantados estudos sobre a relação entre LPV e sucesso em programas de transferência de embriões (J. SINGH, et al., 2007; ATHRIN H, 2007)

Outros estudos desenvolvidos em ovelhas de lã, não só têm assinalado a utilização do ultrassom para detecção de tecido lúteo, mas também para determinar a funcionalidade deste por meio do seu tamanho. O tamanho do tecido lúteo determinado pela ultrassonografia está diretamente correlacionado com a secreção de progesterona em ovinos (GONZALEZ-BULNES et al., 2000).

A ultrassonografia na sua função Color Doppler é outra das alternativas não invasivas que existem e podem ser utilizadas para a revisão e seguimento da atividade tanto do útero como dos ovários nas diferentes etapas do ciclo estral. Com esta técnica pode-se evidenciar em tempo real qualquer mudança fisiológica ou patológica no fluxo sanguíneo nas diferentes estruturas do trato reprodutivo da fêmea. (BOLLWEIN et al., 2002).

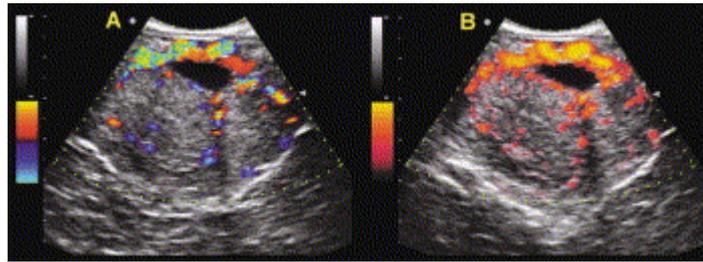


FIGURA 2- imagem de 2 CL em éguas de 48 dias de gestação em modo color-flow (A) e modo powerflow (B) de cortes similares (adaptado do Guinther &UTT; 2004)

O folículo pré-ovulatório tem alta capacidade de manter um rápido crescimento vascular e de responder aos diversos sinais angiogênicos durante o processo de ovulação. A formação de novos vasos é essencial para uma boa formação e funcionamento do CL. Eventos similares ocorrem no CL e em outros tecidos vasculares, que respondem aos sinais extracelulares durante os processos fisiológicos de desenvolvimento embrionário, reparação de feridas e em processos patológicos de formação vascular tumoral. Embora o CL seja uma estrutura transitória, é uma das que tem maior capacidade de crescimento vascular no corpo, com células endoteliais que representam até 50% das células totais (O'SHEA et al., 1989; REYNOLDS, 2002). A proliferação de células endoteliais e mudanças vasculares no CL têm sido estudadas em camundongo (TAMURA e GREENWALD, 1987; MEYERE, 1980.), coelho (NICOSIA et al., 1995) suínos (RICKE et al., 1999), ovelha (JABLONKA-SHARIFF et al., 1993; REDMER et al., 2001), bovinos (ZHENG et al., 1994; AMSELGRUBER et al., 1999), equinos (AL-ZI'ABI et al., 2002), macaco (YOUNG et al., 2000), macaco (CHRISTENSON e STOUFFER, 1996) e humanos (RODGER et al., 1997).

Outra das técnicas utilizadas na pesquisa é a Microscopia Tridimensional de Estruturas Internas (3D-ISM). O aparelho consta de um fatiador com controle computadorizado, uma câmera CCD (Charge Coupled Device), um gravador de disco laser e um computador. A técnica oferece imagens em 3D das estruturas foliculares e lúteas, que são reconstruídas com a técnica de segmentação, permitindo arranjar claramente a disposição de espaço das estruturas (HIRANO et al., 2009)

2.3.7. Luteólise.

É conhecido que a diminuição do fluido sanguíneo no ovário é uma das ações luteolíticas da PGF2- α (ACOSTA et al., 2004). Em os bovinos, após a administração de

PGF2- α acontece um incremento agudo no fluido sanguíneo intraluteal entre 30 min e 2 hrs (ACOSTA et al., 2002), sugerindo que um aumento no fluido sanguíneo intraluteal pode ser o disparador do início da cadeia da luteólise em bovinos (ACOSTA et al., 2004). Na égua a luteólise depende da liberação pulsátil de PGF2- α do endométrio (GINTHER, 1992). O ácido nítrico e outra substância vasodilatadora local que pode ter ação luteolítica direta na regressão do corpo lúteo (ACOSTA et al., 2004). Em geral as células lúteas morrem por 3 mecanismos conhecidos: apoptose, necrose ou diferenciação terminal (AL-ZI'ABI, 2002). Durante a necrose a permeabilidade da células incrementa causando uma expansão, degradação do DNA e inflamação do tecido ao redor da célula (AL-ZI'ABI, 2002). Na égua o momento da regressão funcional do CL ocorre entre o dia 10 e 12 e o tamanho de as células diminui no dia 16. Para o dia 20 dois tipos de degeneração celular são reportados por exame histológico: Picnose associada com citoplasmas e núcleos muito reduzidos e cariólise caracterizada por a lise da cromatina (VAN NIEKERK et al., 1975). O CL mostra mudanças na massa forma e cor ao longo do ciclo estral (AL-ZI'ABI, 2002). Na metade do diestro as células lúteas são poliédricas alongadas, abundante citoplasma e núcleos arredondados. A partir do dia 14 as células lúteas começam a apresentar mudanças degenerativas, células picnoticas e núcleos basófilos presentes entre células lúteas aparentemente saudáveis. No dia 17 todas as células lúteas diminuem de tamanho e apresentam vacuolas. Fibroblastos e tecido conectivo infiltra-se no CL e resíduos intracelulares e leucócitos se apresentam (AL-ZI'ABI, 2002).

Durante a diferenciação terminal se apresenta uma condensação progressiva de material nuclear que eventualmente termina em picnose e destruição do núcleo ou expulsão (VAN WEZEL et al., 1999). Propõe-se que a degeneração mitocondrial pode dar passo a uma diminuição na produção de progesterona e participar a acumulação de lipídeos. Em contraste com outras espécies (Azmi y O'Shea, 1984), em a égua e a vaca, as células endoteliais no CL não apresentam sinais morfológicas de apoptose, geralmente apresentam aumento de tamanho e descolamento de as paredes dos vasos sanguíneos, o que demonstra que existem diferenças entre espécies em o final das células endoteliais durante a luteólise e que a vascularidade retrocede de jeito similar em equinos e bovinos (AL-ZI 'ABI et al., 2002).

2.3.8. Insuficiência lútea.

Falhas na manutenção de um corpo lúteo e quedas nos níveis normais de progesterona ($< 2\text{ng/ml}$) são a maior causa de perda embrionária, pois a progesterona é vital para o desenvolvimento do endométrio e a sobrevivência do embrião (GINTHER, 1985; MARTIN e LAURENCE, 1994; WEBB et al., 2002). Este é mais um dos casos onde a égua é fisiologicamente diferente do resto das espécies. No caso do corpo lúteo, nos primeiros dias de prenhez sua atividade secretora diminui em torno dos dias 14 a 16 após a ovulação, o mesmo tempo em que ocorreria a luteólise em um animal que estivesse no seu ciclo normal. Isto causa uma queda lenta nos níveis das concentrações de progesterona plasmática durante os seguintes 20 a 25 dias, quando normalmente começa uma segunda etapa em torno do dia 35-45, com a secreção da Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) produzida pelos recentemente formados cálices endometriais (ALLEN, 1984). Nesta segunda etapa, a secreção de progesterona é atribuída aos corpos lúteos secundários formados no ovário da égua entre os dias 40-150. Nos eqüinos, a placenta tem a capacidade de produzir progesterona suficiente para manter a prenhez após o dia 100 (ALLEN, 1984).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Testar o uso do Image Pro Plus como método computadorizado de contagem de píxeis lúteos em uma imagem ultrasonográfica para obter um dado da densidade celular *in situ* no CL de éguas, baseados na importância da densidade celular para a produção da progesterona nas quantidades ideais.

3.2. Objetivos específicos

Determinar por meio do programa “IMAGE PRO PLUS” aplicado a imagens de ultrassonografia, o LPV do CL de éguas para compará-lo com a densidade celular real obtida por contagem de células em lâmina histológica utilizando o programa “IMAGE J” e assim determinar se existe uma correlação.

Analisar a possibilidade da utilização da técnica de LPV no exame clínico-reprodutivo de éguas

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCALIZAÇÃO

4.1.1. Local de recuperação de tratos reprodutivos

Os tratos reprodutivos de éguas Crioulas foram coletados no Frigorífico Foresta, localizado na cidade de São Gabriel, no sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul.

4.1.2. Local de estudo

O local de estudo foi o Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Veterinária da UFRGS (REPROLAB).

4.2. Seleção de animais

Fêmeas acima de 18 meses de idade, conferidas por condição dentária, que não possuísem aparentes patologias ou alterações no trato reprodutivo e com presença de CL em algum dos seus ovários.

4.3. Processamento dos ovários

Foram coletados cinquenta (50) tratos reprodutivos completos de éguas. Após realizar uma inspeção, foram retirados os ovários com presença de corpos lúteos de tratos de éguas sem patologias aparentes. Imediatamente as peças completas foram fixadas em formalina tamponada a 10% e levadas ao Laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB). O total de ovários desconsiderados foi de 21; 16 por não ter presença de CL, dois (2) sofreram dano na fixação e três (3) estavam numa fase lútea não funcional que foi determinada na histologia. O total de CL analisados foi de (29).

No laboratório, os ovários foram lavados com água destilada para remover a formalina e resíduos de sangue, gordura e outros tecidos. A peça completa foi submersa

em água destilada para realizar as medições ecográficas da área e densidade do CL. Para a ultrassonografia foi utilizado um ultrassom ESAOTE MYLAB 40 com sonda linear em uma frequência de 7.5 MHz. As imagens ultrasonográficas dos CL armazenadas foram analisadas com o programa “Image Pro Plus” que tem a capacidade de fazer a contagem do número de píxeis lúteos. Para ter um dado mais exato, se fez a contagem de píxeis de cinco (5) diferentes zonas da imagem que ofereceram tonalidades de cinzas diferentes para obter um único dado da somatória das contagens parciais.

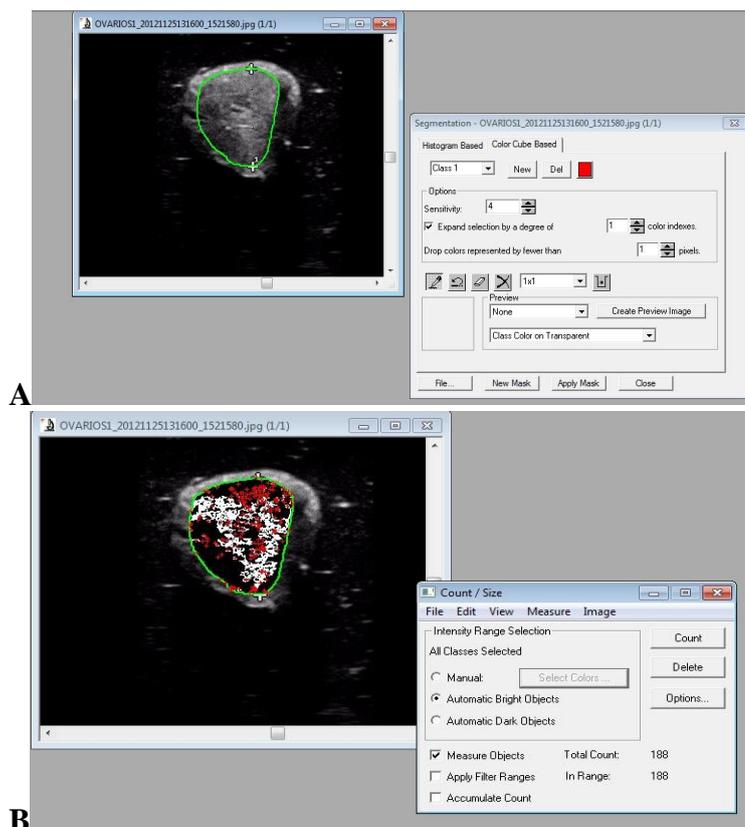


FIGURA 2- (A) delimitação da imagem lútea no programa IMAGE PRO PLUS, (B) contagem dos píxeis luteais no programa image pro plus.

O corpo lúteo foi então dissecado e retirado do ovário. Uma amostra de cada um foi fixada em formalina tamponada a 10% e enviada ao laboratório de Histologia, Departamento de Morfologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), onde foram submetidas à coloração com hematoxilina eosina.

Após a confecção das lâminas histológicas, as mesmas foram observadas no microscópio óptico trinocular acoplado a uma câmera digital. Precisaram-se fotos digitais de cada uma das amostras, as quais foram analisadas com o programa “Image

J". Com esta ferramenta se obtiveram os dados de cinco (5) campos ópticos por CL tomados de diferentes lâminas, relativos ao número de núcleos por campo óptico (40x) para obter a média das cinco (5) contagens.

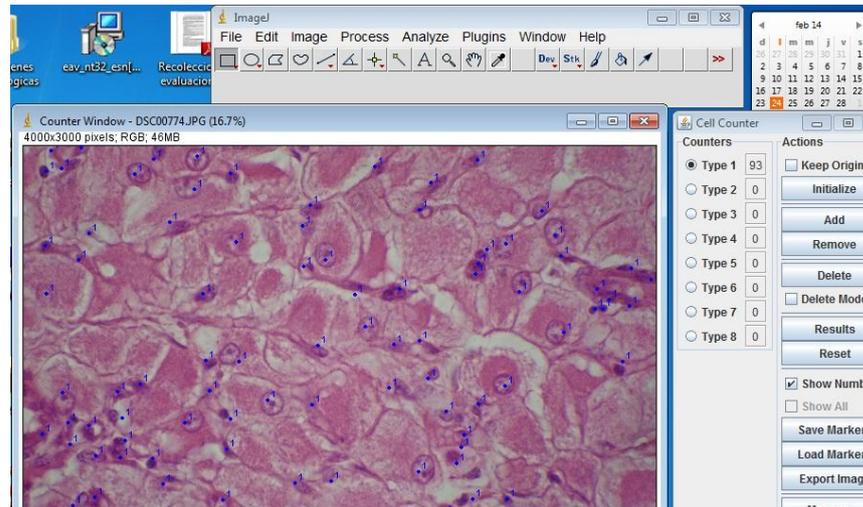


Figura 4- Contagem celular de um dos campos das lâminas histológicas do CL com o programa IMAGE J em 40x

5. ANÁLISE DE DADOS

Na análise estatística testou-se a existência de correlação de dados, foi realizada a regressão linear e análise de resíduos, utilizando o software SAS. Foi considerada como variável independente (x) o número de píxeis lúteos de uma imagem de ultrassom e como variável dependente (y) o número de núcleos de células lúteas na histologia.

6. RESULTADOS

Pode se evidenciar que entre as variáveis existe uma correlação inversa de $R=-0.61$, o que é considerado para alguns autores como uma percentagem média para alta de explicação da correlação. O coeficiente de determinação achado foi de $R^2=37\%$ com uma probabilidade aproximada de $P=0.04\%$.

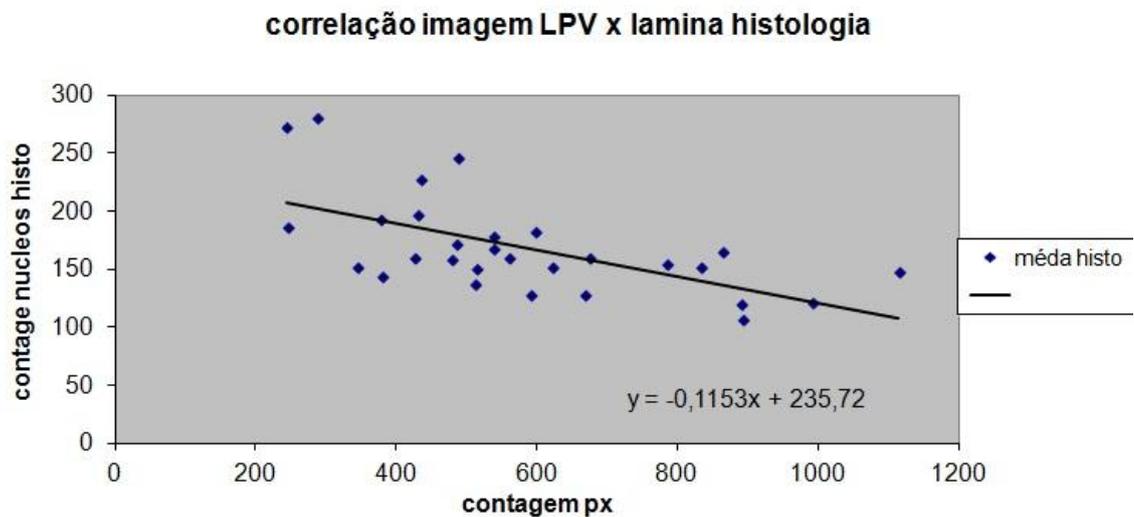


Figura 4- Regressão Linear. Correlação entre LPV e densidade celular achada na histologia.

7. DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi provar que na espécie equina é possível obter um dado confiável da densidade celular do CL por meio da contagem de píxeis em uma imagem ultrasonográfica, baseados em imagens descritas previamente por Ginther (1992). Neste estudo foi achada uma correlação entre o número de píxeis lúteos que podem ser contados de uma imagem ultrasonográfica e a quantidade de células presentes no tecido lúteo. Em trabalho feito em ultrassonografia do trato genital de mulheres (BAERWALD et al., 2005) utilizando medida do número de píxeis lúteos (LPV) achou-se uma relação entre os mesmos e a densidade celular, mensurada na histologia. Esta converteu-se em uma técnica comum na reprodução assistida em humanos, ajudando na decisão de transferir ou não embriões em possíveis mães. Também em mulheres, se achou uma relação importante entre LPV e grão de desenvolvimento e receptividade endometrial (KUPESIC et al., 2002). Os resultados encontrados no presente estudo indicam que no caso das éguas existe uma correlação entre o número de píxeis que contem uma imagem ultrasonográfica do CL e o número de núcleos celulares lúteos contados na histologia. Ginther (1995) estudou as diferentes escalas de cinza segundo o grau de luteinização, tentando padronizar o brilho da imagem segundo os dias pós-ovulação. De acordo com isto, foi proposto que as imagens

lúteas tendem a ser mais brilhantes 1 ou 2 dias após a ovulação e de novo no começo da fase de regressão do CL. Aspectos importantes, como mudanças no grau de ecogenicidade, foram avaliados por Ginther (1995), utilizando duas metodologias em fêmeos pôneis: uma técnica subjetiva que qualificava as imagens de 1 a 8 (branco e preto) e outra técnica computadorizada objetiva de análise de imagens digitais com capacidade de mensurar 256 tipos de sombra baseado nos píxeis. Ambos os métodos tiveram resultados similares, mas parece ser mais confiável o método objetivo para localizar diferenças significativas. M estudo com mulheres, Kupesic (2002) encontrou uma alta relação entre LPV (número de píxeis lúteos) e o desenvolvimento e receptividade endometrial. Foi demonstrada uma correlação representativa entre a densidade celular e os LPV (BAERWALD et al., 2005). A técnica é usada comumente na reprodução assistida em humanos, onde é determinado o LPV e com base nesse dado se toma a determinação de transferir embriões a possíveis mães. Acredita-se que um CL com uma maior densidade celular, ou seja, com maior número de células, deve produzir maiores quantidades de progesterona (P4) na hora de transferir embriões (geralmente dia 7 em bovinos). A importância da P4 é vital no desenvolvimento do embrião (KLEIN et al., 2010) pois é sabido que a P4 tem receptores não só no endométrio (HARTT et al., 2005) mas também nas células embrionárias (RAMBAGS et al., 2008), por isto, a P4 não só tem um efeito indireto sobre o embrião, estimulando as glândulas endometriais na produção do histotrofo (MERKL et al., 2010; KLEIN et al., 2010) mas também um efeito direto sobre o embrião. A natureza dessa via não é conhecida com exatidão ainda (RAMBAGS et al., 2008). Diferentes softwares têm sido utilizados para complementar as imagens do ultrassom, tais como a microscopia tridimensional de estruturas internas (3D-ISM) utilizado por Hirano et al. (2006). Nesse estudo, CLs foram classificados morfológicamente; com mais de 20 mm de diâmetro e um alongamento em direção a fossa de ovulação foram classificados como CH (com presença de coágulo no centro) ou CL (sem presença de coágulo no centro). As amostras foram congeladas e posteriormente cortadas em fatias em forma serial. Posteriormente, uma câmera CCD (Charge-Coupled Device) traduziu as imagens em 3D. Há relato de estudos sobre a relação entre os LPV e os resultados em programas de transferência de embriões em bovinos (HERZOG et al., 2007; SINGH et al., 2007). Mas, em equinos devido ao grande tamanho e diâmetro folicular e lúteo, em comparação com outras espécies; e ao fato da presença de um coágulo de sangue nas primeiras fases de formação do CL, a

técnica poderia ser facilmente utilizada, com ajustes pertinentes. Em recente estudo foram determinadas características morfométricas e ecográficas do CL de éguas de raça Crioula Colombiana. Neste trabalho, encontrou-se uma relação direta entre o número de píxeis lúteos de uma imagem ultrassonográfica e o número total de núcleos de células lúteas contados na histologia (NUÑEZ, et al., 2012). Dentro das limitações do método podemos levar em consideração a falta de um software mais moderno que tal vez pudesse oferecer o análise de uma maior variedade de tonalidades de cinzas sem ter que fazer varias contagens da mesma imagem para poder obter uma dado mais real do número de píxeis que conformam a imagem lútea.

8. CONCLUSÕES

- Foi evidenciada correlação entre o número de píxeis lúteos que podem ser contados de uma imagem ultrassonográfica e a quantidade de células presentes no tecido lúteo.
- Com alguns ajustes na metodologia, pode-se chegar a ter uma técnica confiável e prática de análise de imagem ultrassonográfica do CL.

9. BIBLIOGRAFIA

ACOSTA, T.J., MIYAMOTO, A. (2004). Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, 82-83, 127-140.

ALLEN, W.R. Hormonal control of early pregnancy in the mare. **Animal Reproduction Science**, 7, 283-304. 1984.

ALEXANDER, S.L., IRVINE, C. FSH and LH. In McKinnon, A., Voss, J, **Equine Reproduction**, Philadelphia, Lea & Fabiger. 1993.

AL-ZI'ABI M.O, FRASER HM, WATSON ED. Cell death during natural and induced luteal regression in mares. **Reproduction** , **23**:67-77. 2002.

AMSELGRUBER W.M, SCHAFER M, SINOWATZ F. Angiogenesis in the bovine corpus luteum: an immunocytochemical and ultrastructural study. **Anatomy Histology Embryology**, **28**:157-166. 1999.

BANKS, W.J. **Histología Veterinaria Aplicada. 2ª edición. El Manual Moderno.** 730 paginas. 1996

BRINSKO, SP. BLANCHARD, TL. VARNER, DD. SCHUMACHER, J. LOVE, CC. HINRICHS, K. HARTMAN, D. **Manual of equine reproduction.** 3.ed. Mosby Elsevier. 325 p. 2011.

BAERWALD, A.R. ADAMS, G.P. PIERSON, R.A. Form and function of the corpus luteum during the human menstrual cycle. **Ultrasound Obstetrics & Gynecology.** Vol. 25(5):498-507. 2005.

BARTLEWSKI, P. M., A. P. BEARD, AND N. C. RAWLINGS, An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. **Theriogenology.** 52 115. 1999.

H BOLLEIN, R MAYER, F WEBER, R STOLLA. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, 65, 2043-2051. 2002.

CARLENTON, C. Clinical Examination of the Nonpregnant Equine Female Reproductive Tract. **Current therapy in large animal theriogenology. Segunda Edición.** Saunders Elevier. 74-90.2007.

CINTORA, I. Anatomía y Fisiología del aparato reproductor de la yegua. **Revista virtual Ergormix 8.**

http://www.engormix.com/anatomia_fisiologia_aparato_reproductor_s_articulos_216_CAB.htm (2007).

CINTORA, I. Anatomía y fisiología del aparato reproductor de la yegua. [En línea] [Citado en 15 de Abril de 2011] **Disponibile en internet:**http://mundopecuario.com/tema238/ovarios_animales/yegua-1370.html, 2009.

CHRISTENSON L.K, STOUFFER R.L. Proliferation of microvascular endothelial cells in the primate corpus luteum during the menstrual cycle and simulated early pregnancy. **Endocrinology**, **137**:367-374, 1996.

COUTINHO DA SILVA, M.A. When should a mare go for assisted reproduction? **Theriogenology**. Vol. 70 (3): 441-444, 2008.

DA SILVA GOMEZ, T. Equine corpus luteum vascular evaluation by power-doppler ultrasound. **Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária**. universidade técnica de Lisboa faculdade de medicina veterinária. 2008.

DOUGLAS R.H, GINTHER, O.J. Effects of prostaglandin F2a on the oestrous cycle and pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement** 23: 257–261, (1975)

DUGGAVATHI, R., P. M. Bartlewski, A. P. Pierson and N. C. Rawlings, Luteogenesis in cyclic ewes: echotextural, histological and functional correlates. **Biology of Reproduction**. 69: 634.2003.

FRAZER, G.S. Evaluation of the equine ovary. **Current therapy in equine medicine**. Elsevier. 260-263, 2003.

GINTHER, O. J. Endocrinology of the ovulatory season. **Reproductive Biology of the Mare. Basic and Applied Aspects**, 2nd ed. (O. J. Ginter, ed.), Cross Plains, WI: Equiservices, pp. 233–290, 1992.

GINTHER, O. J. e K. KOT, Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology**. 42: 987, 1994.

GINTHER, O.J. Changes in average luteal echogenicity: **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Horses**. Book 2, 1995.

GINTHER, O.J. BEG, MA. BERGFELT, DR. DONADEU, FX. KOT, K. Follicle selection in Monovular species. En: **Biology of Reproduction**. Estados Unidos. Vol 65, no. 3 p. 638-647. 2001.

GINTHER, O.J. BEG, MA. BERGFELT, DR. DONADEU, FX. KOT, K. Follicle selection in Monovular species. **Biology of Reproduction**. Vol 65 (3): 638-647.

GINTHER, O.J. e FIRST, N.L. **Maintenance of the corpus luteum in hysterectomised mares**. *American Journal of Veterinary Research* 32(11), 1687–1691. 1971

GONZALEZ-BULNES A, SANTIAGO-MORENO J, GOMEZ-BRUNET A, LOPEZ-SEBASTIAN A. Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. **Reproduction of Domestic Animals** ;35:65–8, 2000.

GRIFFIN, P. G. AND O. J. GINTHER, Research application of ultrasonic imaging in reproductive biology. **Journal of Animal. Sci.** 70: 953, 1992.

HARRISON. The early development of the corpus luteum. **Journal of Anatomy**, 80, 160-168. 1946.

HANSEL, W., ALILA, H., DOWD, J., YANG, X. Control of steroidogenesis in small and large bovine luteal cells. **Aust Journal Biol Science**, 40 , 331-347. 1987.

HARTT, L.S. CARLING, S.J. JOYCE, M.M. JOHNSON, G.A. VANDERWALL, D.K. OTT, T.L. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. **Reproduction**. 130 (2): 241-250, 2005.

HAFEZ, B. **Reproducción e Inseminación Artificial en Animales**. Séptima Edición. Kiawah Island, South Carolina: McGraw Hill, 2000. p. 16

HAFEZ, E.S.E. HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**, 7th edn. Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore, 509 pp. (2000)

HERRERA ALVAREZ, O. Confirmación de la estacionalidad reproductiva de las yeguas en el trópico. **Tesis de grado para optar el título de Médico Veterinario. Universidad de Antioquia. Facultad de Medicina Veterinaria**. 2004. p.57

HERZOG, K. KIOSSIS, E. BOLLWEIN, H. Examination of cyclic changes in bovine luteal echotexture using computer-assisted statistical pattern recognition techniques. **Animal Reproduction Science**. Vol. 106 (3): 289-297, 2008.

HIRANO, Y. KIMURA, J. NAMBO, Y. YOKOTA, H. NAKAMURA, S. TAKEMOTO, S. HIMENO, R. MISHIMA, T. MATSUI, M. MIYAKE, MI. Population of Follicles and Luteal Structures during the Oestrous Cycle of Mares Detected by Three-Dimensional Internal Structure Microscopy. **Journal of veterinary medicine**. 38: 214-218. 2009.

LAWLER, D., HOPKINS J., WATSON E. Immune cell populations in the equine corpus luteum throughout the oestrous cycle and early pregnancy: an immunohistochemical and flow cytometric study. **Journal of Reproduction and Fertility**, 117 281-290. 1999

LOPEZ-SEBASTIAN, A., A. GONZALEZ DE BULNES, J. SANTIAGO MORENO, A. GOMEZ BRUNET, E. C. TOWNSEND AND E. K. Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular. **Animal Reproduction. Sci.** 48: 279, 1997.

JABLONKA-SHARIFF A. Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Endocrinology** 1993, **133**:1871-1879.

SINGH, J. PIERSON, R.A. ADAMS, G.P. Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. **Journal of reproduction and Fertility**. 109(1): 35-44, 1997.

KAINER, R.A. **Reproductive organs of the mare**. In: MCKINNON, A.O. e VOSS, J.L. (eds) *Equine Reproduction*. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 3–19. . (1993)

KAPS, M. and LAMBERSON, W. **Biostatistics for animal science**. CABI Publishing, Oxfordshire, UK, 2004.

KERR, J.F, WYLLIE, A.H, CURRIE A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer** 26: 239–257, (1972)

KLEIN, C. SCOGGIN, K.E. EALY, A.D. TROEDSSON, M.H. Transcriptional profiling of equine endometrium during the time of maternal recognition of pregnancy. **Biology of Reproduction**. 83(1):102-13, 2010.

KUPESIĆ, S. HAFNER, T. BJELOS, D. Events from ovulation to implantation studied by three-dimensional ultrasound. **Journal of Perinatal Medicine**. 30(1): 84-98, 2002.

KURJAK, A. CHERVENAK. F. **Donald School: Ecografía en obstetricia y ginecología. 2da edición. Medica Panamericana**. 1012 páginas, 2008.

MANUAL DO CAVALO CRIOULO, **ABCCC**. Agosto 2010. Pag 1.

MARTIN, K., LAWRENCE, L. EARLY embryonic death in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, 14, 11, 617-618, 1994.

MERKL, M. ULBRICH, S.E. OTZDORFF, C. HERBACH, N. WANKE R. WOLF, E. HANDLER, J. BAUERSACHS, S. Microarray analysis of equine endometrium at days 8 and 12 of pregnancy. **Biology of Reproduction**. 83(5):874-86, 2010.

MEYER G.T, BRUCE N.W. Quantitative cell changes and vascularisation in the early corpus luteum of the pregnant rat. **Anatomy Record**, **197**:369-374, 1980.

MOREL, D. Fisiología de la Reproducción de los équidos, cría y manejo de la yeguada. **España: Editorial Acribia**, 2005.

NUNEZ, G. A. Caracterización de parámetros morfométricos y ecográficos del cuerpo lúteo en la yegua criolla Colombiana, **Tesis de grado para optar el título de Médico Veterinario Zootecnista, Facultad de Medicina Veterinaria y Zotecnia, Universidad Cooperativa de Colombia**. 2012.

NICOSIA S.V, DIAZ J, NICOSIA R.F, SAUNDERS B.O, MURO-CACHO C. Cell proliferation and apoptosis during development and aging of the rabbit corpus luteum. **Annals of Clinical Laboratory Science**, **25**:143-157, 1995.

NISWENDER, G. D. AND T. M.NETT. Corpus luteum and its control in infraprimata species. In: E. Knobil and J. D. Neill, (Ed.). **The Physiology of Reproduction**, Vol 1, Raven Press, New York, 1993.

NISWENDER, G., JUENGEL, J., MCGUIRE, W., BELFIORE, C., WILTBANK, M. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, **50**, 239-247. 1994.

NODEN, P., OXENDER, W., HAFS, H. The cycle of oestrus, ovulation and plasma levels of hormones in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.** **23**, 189-192. 1975.

O'SHEA J.D, RODGERS R.J, DOCCHIO M.J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**; **85**:483-487, 1989.

PAREJA, O.S. URBANETZ, A.A. LARA-URBANETZ, L.A.M. CARVALHO, NS. PIAZZA, MJ. Características ecográficas do corpo lúteo em gestações iniciais: morfologia e vascularização. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**. **32**(11): 549-555, 2010.

PIERSON, R, GINTHER, O. Ultrasonic evaluation of the corpus luteum of the mare. **Theriogenology**, Vol.23; n 5; pp: 795- 806, 1985.

RAMBAGS, B.P. Van TOL, H.T. Van den ENG, M.M. COLENBRANDER B. STOUT, T.A. Expression of progesterone and oestrogen receptors by early intrauterine equine conceptuses. **Theriogenology**. **69** (3): 366-375, 2008.

REDMER, D., DORAISWAMY, V., BORTNEM, B., FISHER, K., JABLONKA-SHARIFF, A., GRAZUL-BILSKA, A.,REYNOLDS, L. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, **65**:879 889, 2001.

REYNOLDS, L., REDMER,D. Growth and development of the corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl 54, 181-191. 1999.

REYNOLDS, L., GRAZUL-BILSKA, A., REDMER, D. Angiogenesis in the corpus luteum, **Endocrine**, **12**, 1-9. 2000

REYNOLDS L.P, GRAZUL-BILSKA A.T, REDMER D.A. Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. **International Journal of Experimental Pathology**, **83**:151-163, 2002.

RICKE W.A, REDMER D.A, REYNOLDS L.P. Growth and cellular proliferation of pig corpora lutea throughout the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, **117**:369-377, 1999.

ROBERTO DA COSTA, R., BRANCO, V., PESSA, P., ROBALO SILVA, J., FERREIRA-DIAS, G. Progesterone receptors and proliferating cell nuclear antigen expression in the equine luteal tissue. **Journal of Reproduction and Fertility**, **17**, 659-666. 2005.

RODGER F.E, YOUNG F.M, FRASER H.M. Endothelial cell proliferation follows the mid-cycle luteinizing hormone surge, but not human chorionic gonadotrophin rescue, in the human corpus luteum. **Human Reproduction**, **12**:1723-1729,1997.

SAMPER, JC. **Current Therapy in Equine Reproduction**. Saunders- Elsevier. 929 páginas. 2007.

SHDOW e HAFES. **Reproduccion e inseminacion artificial en animals sexta edicion**. 1996.

SERTICH, P.L. Cervical problems in the mare. In: MCKINNON, A.O. e VOSS, J.L. (eds) **Equine Reproduction**. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 404–407. (1993)

SCHRICK F.N, SURFACE R.A, PRITCHARD J.Y, DAILEY R.A, TOWNSENDEC, INSKEEP E.K.INSKEEP E.K. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. **Biology Reproduction**. **49**: 1133, 1993.

SQUIRES, E. PROGESTERONE, IN MCKINNON, A., VOSS, J. **Equine reproduction**, Philadelphia, Lea & Fabiger. 1993.

TAMURA H, GREENWALD GS. Angiogenesis and its hormonal control in the corpus luteum of the pregnant rat. **Biology of Reproduction**, **36**:1149-1154, 1987.

TIMOTHY, J. EVANS, T.J. CONSTANTINESCU, G.M. GANJAM, V.K. Clinical Reproductive Anatomy and Physiology of the Mare. **Current therapy in large animal theriogenology**. Segunda Edicion. Saunders Elevier. 47-67, 2007.

Van Niekerk, Morgenthal, J., Gerneke, W. Relationship between the morphology of and progesterone production by the corpus luteum of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, **23**, 171-175. 1975.

WATSON e SERTICH. Secretion of prostaglandins and progesterone by cells from corpora lutea of mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, **88**, 223-229. 1990.

WEBB, R., WOAD, K., ARMSTRONG D. Corpus luteum (CL) function local control mechanisms. **Domestic Animal Endocrinology**, **23**, 277-285, 2002.

WEEMS, C., WEEMS, Y., RANDEL, R. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **The Veterinary Journal**, **171**, 206-228. 2006.

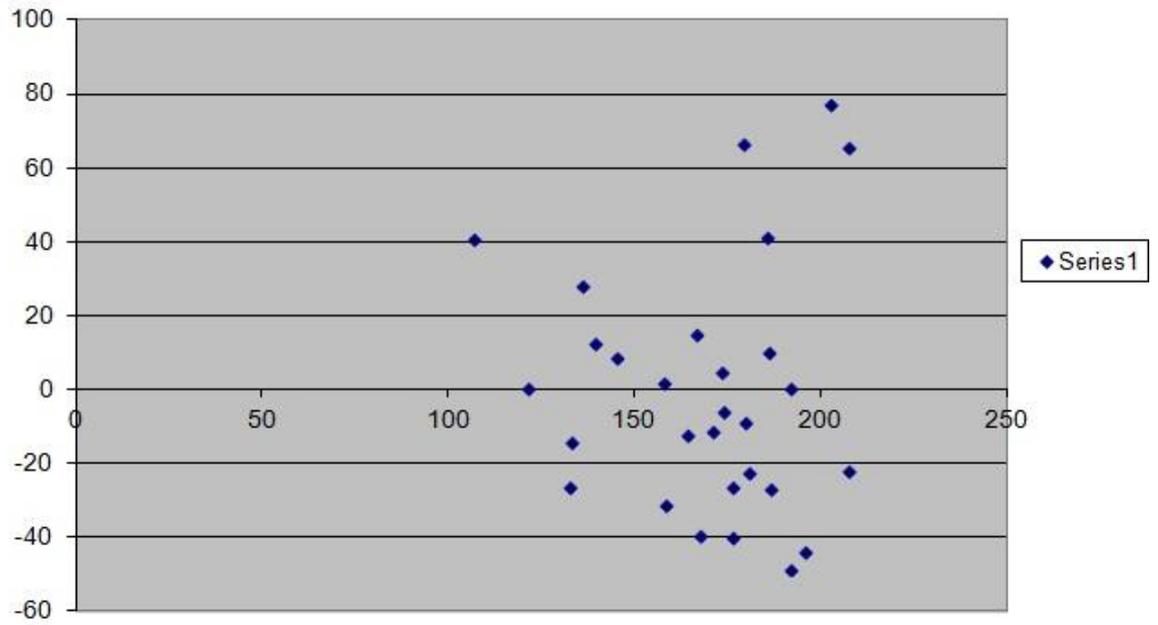
YOUNGQUIST, R. **Current therapy in large animal theriogenology**. Philadelphia; Saunders , 1997.

ZHENG J, FRICKE P.M, REYNOLDS L.P AND REDMER D.A. Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, **51**:623-632, 1994.

ANEXOS

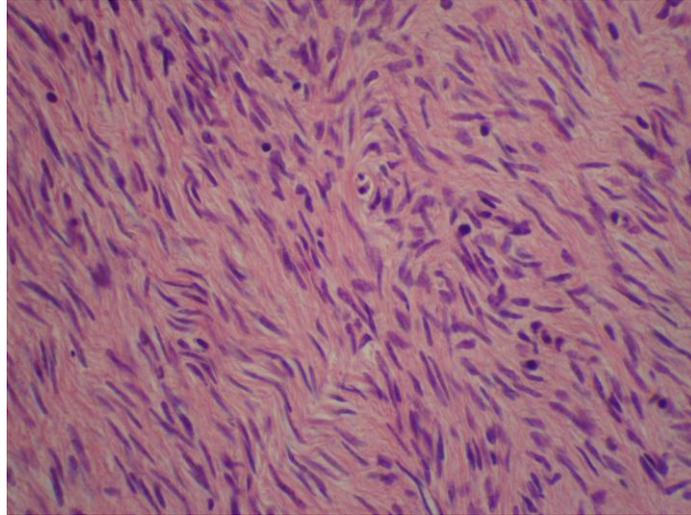
ANEXO A.

analise de residuos



Analise de resíduos.

B)



Histologia, CL em fase não funcional.

C)

Resumo dos resultados.

<i>Estadística de regressão</i>	
R múltiplo	0,611353707
R-Quadrado	0,373753355
R-quadrado ajustado	0,350559035
Erro padrão	34,12431434
Observações	29

D)

Análise de Variância (ANOVA).

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	18764,25472	18764,2547	16,114	0,00042622
Resíduo	27	31440,65838	1164,46883		
Total	28	50204,9131			