



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

EDUARDO KENJI NUNES ARASHIRO

**FUNÇÃO LUTEAL EM CAPRINOS: CARACTERÍSTICAS
MORFOLÓGICAS, ENDÓCRINAS E ATRIBUTOS DE IMAGEM**

**NITERÓI
2008**

EDUARDO KENJI NUNES ARASHIRO

**FUNÇÃO LUTEAL EM CAPRINOS: CARACTERÍSTICAS
MORFOLÓGICAS, ENDÓCRINAS E ATRIBUTOS DE IMAGEM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão

Co-orientador: Dr. João Henrique Moreira Viana

NITERÓI
2008

FUNÇÃO LUTEAL EM CAPRINOS: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, ENDÓCRINAS E ATRIBUTOS DE IMAGEM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão – Orientador
Faculdade de Veterinária – UFF

Dr. João Henrique Moreira Viana – Co-orientador
Embrapa Gado de Leite

Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca
Embrapa Caprinos / Núcleo Sudeste

Prof^a. Dr^a Eunice Oba
Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – Unesp Botucatu

Prof. Dr. Luiz Altamiro Garcia Nogueira
Faculdade de Veterinária - UFF

NITERÓI
2008

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela dedicação, carinho e apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

Aos meus queridos irmãos Roberto e Leandro pela fiel amizade e companheirismo.

À minha amada esposa Adriana, minha melhor amiga e eterna namorada; agradeço por todo o amor, carinho, dedicação e incentivo, fundamentais para vencer mais esta etapa da vida.

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFF pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e financiamento do projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão, pela orientação e dedicação dispensadas durante o período do mestrado.

Ao Dr. João Henrique Moreira Viana por toda paciência, dedicação e o conhecimento passado desde a época de graduação, fundamentais para minha formação pessoal e profissional.

Ao Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca, por todo empenho e fundamental ajuda para a realização desta dissertação.

Ao setor de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite pela disponibilidade dos equipamentos e instalações do laboratório para a realização deste estudo.

Ao Laboratório de Endocrinologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, em nome da Prof^a. Dr^a. Eunice Oba, pela receptividade e apoio na realização das dosagens hormonais.

Ao Dr. José Henrique Bruschi, Dr^a. Marlene e seus funcionários pela receptividade, apoio e empenho para a realização deste estudo, abrindo as portas da granja e permitindo o uso das instalações e dos animais.

À Prof^a Beatriz Brener pela orientação durante os dois anos como monitor de sua disciplina que fez despertar em mim o interesse em seguir a carreira acadêmica.

Aos queridos amigos Maurício Campos, Letícia e Sabine, que sempre torceram por mim, dando forças para vencer as dificuldades da vida.

Aos queridos amigos Rodrigo e Tatiana presentes em momentos felizes e tristes, sempre dando apoio e palavras de conforto.

Ao amigo Luiz Gustavo pelos agradáveis e divertidos momentos vividos durante as épocas de estágio e mestrado; e pela sua ajuda para a realização deste experimento.

Ao amigo Del (Gilmar Pereira Alvim) por toda ajuda prestada durante todos estes anos.

Aos estagiários, e agora colegas de profissão, Joanna Souza, Pedro Leopoldo, Carine e Cadu pela dedicação e apoio durante o experimento.

À minha turma de mestrado, Fernanda, Paula, Thalita, Marcela e Bruno.

Aos professores das disciplinas cursadas (Rui Verneque – UFJF, Daniel Lessa – UFF, Felipe Zandonadi – UFF, Daniel Salvador – Cederj, José Ribas – UFF,

Roberto Sartori – Unesp, Rômulo Cerqueira – UFMG, Rita Paixão – UFF, Ivan Sampaio – UFMG).

Aos meus colegas da Epamig (CT/ILCT) pela amizade e companheirismo durante o tempo em que estive na instituição.

A todos que de alguma forma ajudaram neste trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1 Valores médios da área luteal (●) e da concentração plasmática de P₄ (■) durante o período de luteogênese, p. 60

Figura 2 Valores médios da área luteal (●) e da concentração plasmática de P₄ (■) durante o período de luteólise, p. 61

Figura 3 Média da concentração plasmática de P₄ de animais gestantes (▲) e não-gestantes (■) durante o período de luteogênese, p.62

Figura 4 Média da concentração plasmática de P₄ de animais gestantes (▲) e não-gestantes (■) durante o período de luteólise, p. 62

CAPÍTULO 2

Figura 1 Percentual de variação das áreas de amostragem em relação a maior área (100x100 pixels) para a determinação da área mínima representativa, p. 86

Figura 2 Valor médio dos pixels (colunas) e área luteal (●) durante o período de luteogênese, p. 88

Figura 3 Valor médio dos pixels (colunas) e área luteal (●) durante o período de luteólise, p. 89

Figura 4 Valor médio dos pixels (colunas) e concentração plasmática de P₄ (■) durante o período de luteogênese, p. 89

Figura 5 Valor médio dos pixels (colunas) e concentração plasmática de P₄ (■) durante o período de luteólise, p. 90

Figura 6 Heterogeneidade do CL (colunas) e área luteal (●) durante o período de luteogênese, p. 90

Figura 7 Heterogeneidade do CL (colunas) e área luteal (●) durante o período de luteólise, p. 91

Figura 8 Valor médio dos pixels (colunas) e concentração plasmática de P₄ (■) durante o período de luteogênese, p. 91

Figura 9 Heterogeneidade do CL (colunas) e concentração plasmática de P₄ (■) durante o período de luteólise, p. 92

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 Dados de controle climatológicos obtidos durante o período experimental (média \pm erro padrão), p. 51

Tabela 2 Dia e área de tecido luteal no momento da 1ª visualização do CL em cabras com uma ou múltiplas ovulações (média \pm erro padrão), p. 57

Tabela 3 Área luteal durante o período de desenvolvimento do CL (média \pm erro padrão), p. 58

Tabela 4 Área de tecido luteal durante a fase final ciclo estral das fêmeas não gestantes após a correção para o momento da luteólise natural (Hora 0) (média \pm erro padrão), p. 58

Tabela 5 Concentração plasmática de P4 (média \pm erro padrão) durante o período de luteogênese, p. 59

Tabela 6 Concentração plasmática de P4 das fêmeas não gestantes após a correção para o momento da luteólise natural (Hora 0), p. 60

Tabela 7 Área de tecido luteal e concentração plasmática de P4 no momento do ciclo em que atingiu sua área máxima (D9), p. 61

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Dados de controle climatológicos obtidos durante o período experimental (média \pm erro padrão), p.80

Tabela 2 Ecotextura (valor médio de pixels) do CL durante o período de luteogênese, p. 87

Tabela 3 Ecotextura do CL durante o período de luteólise (hora 0 = início da luteólise), p. 88

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3 β HSD - 3 β hidroxisteroide desidrogenase
- AMR – Área Mínima Representativa
- ANUALPEC – Anuário Brasileiro da Pecuária
- bFGF – Fator de crescimento básico de fibroblastos
- CL – Corpo Lúteo
- E₂ – Estrogênio
- eCG – Gonatrofina Coriônica Eqüina
- EDTA – Ácido Etilinodiamino Tetra-Acético
- FSH – Hormônio Folículo Estimulante
- GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina
- IA – Inseminação Artificial
- IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo
- IGF-I – Fator de crescimento semelhante a insulina I
- LH – Hormônio Luteinizante
- MAP – Acetato de Medroxiprogesterona
- P-450_{SCC} – Enzima clivadora da cadeia lateral do colesterol
- P-450_{17 α} - 17 α hidroxilase
- P-450_{arom} - Aromatase
- PGF_{2 α} - Prostaglandina F_{2 α}
- P₄ – Progesterona
- PIVE – Produção *in vitro* de Embriões
- RIA – Radioimunoensaio
- TE – Transferência de Embriões
- VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

- 1. INTRODUÇÃO GERAL, p.11**
- 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, p. 15**
 - 2.1 CICLO ESTRAL E COMPORTAMENTO SEXUAL EM CAPRINOS, p. 15
 - 2.2 DINÂMICA FOLICULAR, p.18
 - 2.2.1 Estacionalidade, p. 23**
 - 2.3 DINÂMICA LUTEAL: OVULAÇÃO, LUTEOGÊNESE E LUTEÓLISE, p.25
 - 2.3.1 Breve Histórico, p. 25**
 - 2.3.2 Ovulação e Luteogênese, p. 27**
 - 2.3.3 Luteólise, p. 29**
 - 2.4 ULTRA-SONOGRAFIA, p. 31
 - 2.4.1 Fundamentos da Ultra-sonografia, p. 31**
 - 2.4.2 Ultra-sonografia em pequenos ruminantes, p. 33**
 - 2.4.3 Análise computacional de imagens ultra-sonográficas, p. 34**
- 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 37**

CAPÍTULO 1

RESUMO, p.47

ABSTRACT, p. 48

- 1. INTRODUÇÃO, p. 49**
- 2. MATERIAL E MÉTODOS, p. 51**
 - 2.1 LOCAL, PERÍODO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS, p.51
 - 2.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS, p. 52
 - 2.3 AVALIAÇÕES ULTRA-SONOGRÁFICAS OVARIANAS, p. 52
 - 2.4 COLETA DE SANGUE E DOSAGEM PLASMÁTICA DE P₄, p. 53
 - 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 54
- 3. RESULTADOS, p. 56**
 - 3.1 CICLO ESTRAL, p. 56
 - 3.2 FOLÍCULOS OVULATÓRIOS, p.56
 - 3.3 DINÂMICA LUTEAL, p. 57
 - 3.4 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE P₄, p. 59

- 4. DISCUSSÃO, p. 63**
- 5. CONCLUSÃO, p. 70**
- 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 71**

CAPÍTULO 2

RESUMO, p. 76

ABSTRACT, p. 77

1. INTRODUÇÃO, p. 78

2. MATERIAL E MÉTODOS, p. 80

2.1 LOCAL, PERÍODO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS, p. 80

2.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS, p. 81

2.3 AVALIAÇÕES ULTRA-SONOGRÁFICAS OVARIANAS, p. 81

2.4 CAPTURA E ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS IMAGENS, p. 83

2.5 COLETA DE SANGUE E DOSAGEM PLASMÁTICA DE P₄, p. 84

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 85

3. RESULTADOS, p. 86

3.1 ÁREA MÍNIMA REPRESENTATIVA (AMR), p. 86

3.2 ECOTEXTURA (VALOR MÉDIO DOS PIXELS E HETEROGENEIDADE),p.
87

4. DISCUSSÃO, p. 93

5. CONCLUSÃO, p. 97

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 98

ANEXOS, p. 101

ANÁLISES ESTATÍSTICAS, p. 105

1. INTRODUÇÃO GERAL

A ovinocaprinocultura vem apresentando um crescimento significativo nestes últimos anos. Este aumento foi mais pronunciado nos países em desenvolvimento e de clima tropical, em função da estabilização, ou até mesmo redução nos rebanhos dos países considerados desenvolvidos (FONSECA e BRUSCHI, 2005). Dados da ANUALPEC de 2005 mostram que houve um crescimento de 6% em relação ao ano anterior, entretanto o efetivo nacional, que poderia ser superior a 100 milhões de cabeças, não ultrapassa 30 milhões (FONSECA e BRUSCHI, 2005). Atualmente o Brasil conta com uma população de 15.200.000 de ovinos e 10.050.000 de caprinos, o que representa uma relação por habitante de 0,08 e 0,05; respectivamente. Somando esses dados, a existência de 390,8 milhões de hectares disponíveis para expansão, percebe-se um grande potencial do país de assumir um papel de destaque internacional dentro desta atividade, a exemplo do que já ocorre com a bovinocultura, suinocultura e avicultura (ANUÁRIO BRASILEIRO DE CAPRINOS E OVINOS, 2008).

O real crescimento observado na caprinocultura nacional trouxe consigo um grande interesse do governo brasileiro em melhorar a genética do plantel nacional. Recentemente teve início o teste de progênie de animais das raças Saanen, Anglo Nubiana e Parda Alpina, parte integrante das ações previstas pelo Programa Nacional de Melhoramento Genético de Caprinos Leiteiros, coordenado pela Embrapa Caprinos (RUMINANDO..., 2005).

A razão para a crescente expansão da caprinocultura observada nos últimos anos pode ser encontrada nas características produtivas e reprodutivas dos caprinos. São animais dóceis e com grande

capacidade de adaptação aos mais diversos tipos de sistema de criação, desde os familiares e extensivos até os sistemas intensivos, mais modernos e tecnificados. Estes apresentam ciclos produtivos curtos, sendo possível o abate de alguns animais com apenas três meses de vida, e com machos e fêmeas aptos a reprodução a partir dos seis meses de idade (FONSECA *et al.*, 2007). Segundo estes autores, os caprinos possuem um período de gestação de cinco meses, que aliado a um curto período de puerpério e a uma elevada prolificidade, fazem com que o sistema de criação seja mais dinâmico e o retorno do capital investido mais rápido, quando comparado à bovinocultura.

No entanto, estas espécies apresentam uma característica bastante peculiar: a estacionalidade reprodutiva. As cabras são fêmeas poliétricas estacionais, apresentando atividade ovariana luteal cíclica somente durante os meses onde os períodos de luminosidade são menores (dias curtos). No Brasil, este período compreende os meses referentes ao final do verão e outono. Contudo, com o desenvolvimento e a utilização das biotecnologias aplicadas à reprodução animal é possível fazer com que estes animais apresentem um ciclo produtivo e reprodutivo durante o ano inteiro.

A reprodução assistida na espécie caprina por meio de biotecnologias (p.ex., manipulação hormonal do ciclo, IA, TE e PIVE) com o objetivo de elevar a eficiência reprodutiva do rebanho já é uma realidade (BALDASSARE e KARATZAS, 2004). A implementação de programas de reprodução assistida em caprinos permite obter três partos em dois anos, o que representa uma redução no intervalo de partos de 12 para oito meses, o período seco de cinco para dois meses e o período improdutivo de cinco para três meses por ano, quando comparado com o manejo reprodutivo tradicional de apenas um parto por ano. Com isso, é possível aumentar o número de crias (de 1,5 para 2,25 cabritos/ano) e o período produtivo (de sete para nove meses/ano) sem alterar o período de lactação (FONSECA e BRUSCHI, 2005).

A TE é uma biotecnologia em expansão na espécie caprina e consiste em uma eficiente ferramenta para a multiplicação de animais geneticamente superiores e de elevado custo, assim como os geneticamente modificados (transgênicos) e os clones (GOOTWINE *et al.*, 1997).

Um dos fatores mais importantes para o sucesso de um programa de TE é a seleção das receptoras, etapa considerada decisiva para se obter uma taxa de gestação satisfatória (VIANA, 1996). Além dos cuidados sanitários e nutricionais, as receptoras devem estar em condições fisiológicas adequadas, ou seja, apresentar uma sincronia entre a fase do ciclo estral e a idade dos embriões a serem transferidos, fornecendo assim um perfil hormonal e uma condição uterina favorável ao desenvolvimento do conceito. Para isso, a receptora deve apresentar um corpo lúteo (CL) funcional, capaz de sintetizar progesterona (P_4) em quantidade adequada para o desenvolvimento embrionário inicial e manutenção da futura gestação. Além de ser fundamental para a gestação, estudos anteriores demonstraram que a P_4 influencia a dinâmica folicular, refletindo diretamente nos resultados de um programa de TE (MENCHACA e RUBIANES, 2002; RUBIANES e MENCHACA, 2003).

A ultra-sonografia em tempo real consiste em uma técnica não-invasiva que permite a identificação e avaliação, *in situ*, dos diversos órgãos e tecidos que compõem o sistema reprodutivo de machos e fêmeas. Utilizando esta técnica é possível realizar avaliações individuais e seriadas, o que permitiu a compreensão e a caracterização dos inúmeros eventos reprodutivos como, por exemplo, a dinâmica folicular e a ovulação (GRIFFIN e GINTHER, 1992). Além disto, a ultra-sonografia é considerada uma técnica segura e não causa alterações fisiológicas no paciente, o que garante a integridade física e o bem-estar do animal, uma preocupação cada vez maior por parte das comissões de ética e da sociedade em geral.

Nos pequenos ruminantes, como não é possível a realização da palpação transretal, o impacto da ultra-sonografia foi ainda maior. O uso desta técnica permite avaliar a resposta de doadoras ou receptoras de embriões aos protocolos hormonais utilizados, evitando assim procedimentos cirúrgicos desnecessários.

Diversos experimentos vêm sendo realizados utilizando a ultra-sonografia como ferramenta para estudos em fisiologia ovariana, e para a avaliação dos diferentes protocolos hormonais utilizados para sincronização do estro e superovulação. Especificamente no caso da função luteal, a ultra-

sonografia vem se tornando uma ferramenta auxiliar importante e eficiente na identificação e avaliação do CL em cabras e ovelhas (DICKIE *et al.*, 1999; VIÑOLES *et al.*, 2004; SIMÕES *et al.*, 2006). Entretanto, na grande maioria dos estudos, o uso da ultra-sonografia limita-se apenas à identificação do CL e na mensuração do seu diâmetro, área ou volume, e essa forma de avaliação não elimina por completo possíveis equívocos (PIETERSE *et al.*, 1990).

Atualmente, uma nova abordagem nos estudos envolvendo a ultra-sonografia vem sendo utilizada. Trata-se da análise das imagens utilizando algoritmos computacionais para quantificar a ecotextura dos diferentes tecidos dos órgãos reprodutivos, visando estabelecer uma correlação entre a aparência ultra-sonográfica da imagem e a função fisiológica do tecido estudado. A utilização destes algoritmos computacionais permite uma avaliação da ecotextura mais precisa, identificando variações imperceptíveis ao olho humano e eliminando as inconsistências obtidas por uma avaliação visual subjetiva (SINHG *et al.*, 2003). O uso desta nova tecnologia permitiria a realização de uma avaliação e seleção de receptora mais eficiente, além de ser uma excelente ferramenta para estudos sobre a fisiopatologia de determinadas condições como, por exemplo, a regressão luteal precoce e falhas nos processos de ovulação e de luteogênese.

Com base nestas informações, o presente estudo teve como objetivo estudar a dinâmica luteal em caprinos da raça Toggenburg, e estabelecer uma metodologia para análise computacional de imagens ultra-sonográficas do CL em caprinos, e avaliar sua eficiência no estabelecimento da função luteal em diferentes fases do ciclo estral.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CICLO ESTRAL E COMPORTAMENTO SEXUAL EM CAPRINOS

O ciclo estral compreende o intervalo entre dois estros consecutivos, sendo caracterizado por uma seqüência de eventos endócrinos, morfológicos e comportamentais. É o resultado de uma interação coordenada, envolvendo quatro órgãos diferentes: sistema nervoso central (hipotálamo), hipófise, gônadas (ovários) e o útero. A regulação do ciclo estral é endócrina, e os principais hormônios envolvidos são: GnRH, de origem hipotalâmica; as gonadotropinas hipofisárias (FSH e LH), os esteróides ovarianos (E_2 e P_4) e a $PGF_{2\alpha}$, principalmente de origem uterina (GONZÁLEZ, 2002).

O ciclo estral é dividido em quatro fases: (1) proestro, que tem início logo após a regressão do CL do ciclo anterior, e compreende o desenvolvimento da onda folicular ovulatória; (2) estro, período de receptividade sexual da fêmea, com a ovulação geralmente ocorrendo no final desta fase em algumas espécies; (3) metaestro, fase onde ocorre o desenvolvimento inicial do CL (luteogênese) e em determinadas espécies (p.ex., caprina) a ovulação e (4) diestro, período onde há a atividade de um CL maduro, terminando com a regressão do mesmo (luteólise). Entretanto, outros autores consideram que o ciclo estral apresenta somente duas fases: (1) folicular, englobando o proestro e o estro; e (2) luteínica, correspondendo ao metaestro e diestro; em caprinos, estas duas fases possuem uma duração média de 4 e 17 dias, respectivamente (SWENSON e REECE, 1996; GONZALEZ, 2002; FONSECA e BRUSCHI, 2005).

A duração do ciclo estral varia em função da espécie, nas cabras domésticas (*Capra hircus*) o ciclo estral se completa, em média, a cada 21 dias, podendo variar de 19 a 24 dias (de CASTRO *et al.*, 1999; MENCHACA e RUBIANES, 2002). Alguns fatores podem fazer com que o ciclo estral seja mais longo ou curto. O mais conhecido é o efeito da sazonalidade, sendo comum a ocorrência de ciclos curtos durante o período de transição, fase esta compreendida entre a estação de acasalamento e a estação de anestro (CAMP *et al.*, 1983). A ocorrência de ciclos curtos também pode estar associada a um fenômeno conhecido como regressão luteal precoce ou regressão prematura do corpo lúteo. Este fenômeno é freqüente em cabras superovuladas com eCG, sendo caracterizado por uma acentuada queda da concentração plasmática de P₄ por volta do terceiro dia após a ovulação (STUBBINGS *et al.*, 1986; ESPINOZA-MARQUEZ *et al.*, 2004). Um ciclo estral com duração longa (>25 dias) pode estar associado a presença de cistos foliculares luteinizados (de CASTRO *et al.*, 1999).

A progesterona também exerce efeito sobre o intervalo entre dois estros. Menchaca e Rubianes (2001), através da inserção de dispositivos intravaginais impregnados com P₄ em cabras mestiças (Anglo Nubiano x Saanen) durante um período de cinco dias após a detecção do estro, demonstraram que uma elevação prematura na concentração plasmática de P₄ durante a fase inicial do ciclo estral determinou o encurtamento do mesmo (<12 dias). No referido estudo, sugeriu-se que a exposição prematura a elevadas concentrações de P₄ causou uma inibição dos fatores luteotrópicos (principalmente o LH), importantes para o desenvolvimento inicial do CL.

Simões *et al.* (2006) avaliaram o efeito do número de partos sobre a duração do ciclo estral. Nesse estudo, não foi observada diferença no intervalo entre dois estros de cabras multíparas (21,0 ± 0,7 dias) ou nulíparas (20,4 ± 1,1 dias). Contudo, o intervalo entre duas ovulações consecutivas foi mais longo nas cabras multíparas (21,2 ± 0,8 vs 20,4 ± 0,7 dias).

O estro constitui o período de receptividade sexual da fêmea. O estro nas cabras pode ser facilmente evidenciado através dos seguintes sinais: aumento da atividade e estado de alerta, vocalização freqüente, poliúria, diminuição da produção de leite, procura o macho, vulva hiperêmica e edematosa, batimento lateral da cauda e aceitação da monta, sendo somente este último, o sinal confirmatório (GORDON, 1997).

O comportamento de estro descrito acima e o período de receptividade sexual duram em média 30 horas, podendo sofrer importantes variações em função da raça e estação do ano (GONÇALVES *et al.*, 2001). Em um estudo com cabras da raça Alpina (FONSECA *et al.*, 2008), foi observado uma duração média do estro induzido de 25 horas, enquanto que em outros estudos envolvendo as raças Saanen (MAFFILI *et al.*, 2005) e Toggenburg (MAFFILI *et al.*, 2006) a duração do estro induzido foi bem superior (58 e 36 horas, respectivamente). Blaszczyk *et al.* (2004) observaram que o estro induzido foi mais prolongado durante a estação reprodutiva do que na de anestro (32 horas vs. 27 horas, respectivamente).

O ciclo estral pode ser facilmente manipulado e controlado, podendo ser encurtado ou prolongado através da utilização de hormônios exógenos. Estes protocolos hormonais têm por objetivo elevar a eficiência reprodutiva, e conseqüentemente a produção. Assim, tornam-se componentes importantíssimos dentro de um programa de reprodução assistida, pois exercem influência direta sobre a eficiência das diversas biotecnologias da reprodução, como por exemplo, a IA, IATF, TE e a PIVE. Nos animais com reprodução sazonal, como ocorre com os caprinos, a utilização destes protocolos permite manter uma produção de leite e crias durante o ano todo (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004).

2.2 DINÂMICA FOLICULAR

Em 1983, Camp *et al.* estudaram a dinâmica ovariana em caprinos e, em virtude da técnica utilizada (laparoscopia), suas conclusões foram limitadas, porém importantíssimas para as pesquisas subseqüentes. O advento da ultrasonografia permitiu grandes avanços no conhecimento sobre a fisiologia ovariana. Um dos primeiros estudos com dinâmica folicular na espécie caprina utilizando esta ferramenta foi realizado por Ginther e Kot (1994). Neste estudo os autores constataram, assim como em bovinos (PIERSON e GINTHER, 1984), que o crescimento folicular também ocorre em ondas. Desde então diversos outros estudos foram realizados, obtendo-se resultados semelhantes.

Segundo Lucy *et al.* (1992) a dinâmica folicular consiste de um processo contínuo de crescimento e regressão de folículos antrais que termina com o desenvolvimento do folículo ovulatório. Neste processo é possível observar quatro momentos distintos: (1) o recrutamento ou emergência, evento dependente das gonadotropinas hipofisárias onde um grupo de folículos adquire a habilidade de responder a este estímulo hormonal e assim continuar seu crescimento; (2) seleção ou desvio, onde somente alguns folículos recrutados são selecionados, não entrando em atresia; (3) a dominância, momento onde o folículo pré-ovulatório inibe o crescimento de outros folículos, continuando o seu desenvolvimento até a última etapa que consiste na (4) ovulação ou atresia (IRELAND, 1987).

No entanto, considerando-se a fase pré-antral (antes mesmo do recrutamento), o desenvolvimento e crescimento folicular pode ser iniciado muitos meses antes, em bovinos cerca de quatro meses antes. Nesse momento o desenvolvimento folicular parece ser dependente de fatores de crescimento locais, não existindo uma dependência completa das gonadotropinas, embora já tenha sido evidenciada a presença de receptores para FSH já nesta fase (WEBB *et al.*, 2004).

Durante o ciclo estral, as cabras podem apresentar de duas a cinco ondas foliculares, sendo mais freqüente um ciclo de quatro ondas (GINTHER e

KOT, 1994; de CASTRO *et al.*, 1999; MENCHACA e RUBIANES, 2002; RUBIANES e MENCHACA, 2003; MEDAN *et al.*, 2005; SIMÕES *et al.*, 2006). Em um ciclo com quatro ondas foliculares, Simões *et al.* (2006) observaram que a emergência da primeira onda ocorreu no dia $1,4 \pm 1,0$ do ciclo, a segunda no dia $6,9 \pm 1,4$, a terceira no dia $11,6 \pm 1,8$ e a quarta no dia $16,8 \pm 1,6$. Comparando com ciclos de três e cinco ondas, observou-se que a emergência da terceira onda folicular foi mais precoce no ciclo com cinco ondas ($8,9 \pm 2,1$) do que no ciclo de três e de quatro ondas ($14,8 \pm 1,3$ e $11,6 \pm 1,8$; respectivamente). E a emergência da quarta onda foi mais tardia no ciclo de quatro ondas quando comparado ao ciclo de cinco ondas ($16,8 \pm 1,6$ vs $12,6 \pm 1,3$; respectivamente). O dia da emergência da primeira e da segunda onda não diferiu entre os ciclos com três, quatro ou cinco ondas.

Neste mesmo estudo (SIMÕES *et al.*, 2006) não foi detectado um efeito da ordem de parto, tipo de estro (natural ou induzido), intervalo interovulatório, número de CL e momento da emergência da primeira onda folicular sobre o número total de ondas no ciclo. Analisando somente a última onda de crescimento folicular nos dois ovários, foi verificada uma diferença em relação ao momento da emergência da onda e na morfologia do folículo. No ovário onde ocorreu a ovulação a emergência da última onda folicular ocorreu mais tardiamente e com menor variabilidade, sugerindo que uma nova onda emergiu durante a luteólise natural. O diâmetro máximo do maior folículo foi maior no ovário onde houve a ovulação ($7,1 \pm 1,0$ mm vs $5,7 \pm 0,4$ mm, respectivamente). Estes resultados demonstram a existência de mecanismos envolvidos na regulação da última onda folicular do ciclo estral que ainda precisam ser elucidados.

O controle hormonal da dinâmica folicular é realizado pelas gonadotropinas hipofisárias (FSH e LH). Durante a fase de recrutamento, sob ação do FSH, os folículos se desenvolvem para prosseguir o desenvolvimento até a ovulação. Na fase de seleção um único folículo se destaca, desenvolvendo a capacidade de ovular. Na fase seguinte (dominância), o

folículo selecionado, sob ação do LH, continua o seu desenvolvimento e passa a exercer um efeito de dominância sobre os demais folículos através do efeito negativo do E_2 e da inibina sobre a liberação do FSH. Se neste momento houver um CL presente e ativo, a concentração plasmática de P_4 estará elevada e o folículo dominante entra em atresia. A P_4 exerce um efeito negativo sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, reduzido a amplitude e a frequência dos pulsos de LH, inviabilizando o processo de maturação final e ovulação. Caso não haja a presença de um CL, ou se este já entrou em processo de regressão (luteólise), o folículo dominante termina o seu desenvolvimento e ocorre o processo de ovulação (GINTHER *et al.*, 1996).

Assim como ocorre na espécie bovina (GINTHER *et al.*, 1996), nos pequenos ruminantes (ovinos e caprinos) existe uma forte evidência de que a emergência de uma onda folicular esteja associada a uma elevação na concentração plasmática do FSH (GINTHER *et al.*, 1995; VIÑOLES, 2003; MEDAN *et al.*, 2003; MEDAN *et al.*, 2005). Entretanto, foi reportado que durante o ciclo estral de ovinos algumas ondas foliculares não foram precedidas por um aumento detectável na concentração plasmática de FSH. Da mesma forma, observou-se que algumas elevações na concentração deste hormônio não foram acompanhadas pela emergência de uma nova onda folicular (VIÑOLES *et al.*, 2002).

Estudos em caprinos observaram uma correlação positiva e significativa ($r=0,80$; $P<0,001$) entre o número de ondas de crescimento folicular e o número de picos do hormônio FSH (MEDAN *et al.*, 2003; MEDAN *et al.*, 2005). Nestes mesmos estudos foi demonstrado que a elevação na concentração plasmática do FSH era seguida por uma diminuição progressiva, estando negativamente correlacionada com a elevação nas concentrações de estradiol- 17β e inibina produzidos pelo folículo de maior diâmetro, demonstrando o efeito de retroalimentação negativa destes dois hormônios sobre a liberação do FSH.

Em relação ao estradiol- 17β , de Castro *et al.* (1999) observaram que a concentração deste esteróide se elevou no momento da ovulação e depois diminuiu até atingir as concentrações basais, permanecendo baixa até o dia 16

do ciclo, quando ocorreu um novo pico associado ao processo de luteólise e de ovulação do ciclo subsequente. Tal observação foi atribuída ao fato de que no meio do ciclo, em função da elevada concentração de P_4 e conseqüente inibição do LH, o estímulo ao desenvolvimento folicular seria menor, levando assim a uma menor produção do estrogênio.

Um outro esteróide importante no controle da dinâmica folicular é a P_4 , que apresenta um efeito inibidor sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, diminuindo a secreção do LH. Concentrações mais baixas de LH reduzem a persistência do maior folículo da onda e aceleram o processo conhecido como *turnover* folicular, o que determina o início mais precoce de uma nova onda. Menchaca e Rubianes (2002) observaram que a elevação na concentração plasmática de P_4 através do uso de progestágenos exógenos (dispositivos intravaginais) no início do ciclo estral, afetou negativamente o crescimento e a persistência do maior folículo da primeira onda de crescimento, sendo observada a emergência mais precoce da segunda onda.

Semelhantemente, de Castro *et al.* (1999) acompanharam o ciclo estral de sete cabras da raça Saanen, e observaram o efeito da concentração plasmática de P_4 sobre o intervalo entre as ondas de crescimento folicular. Neste estudo o intervalo médio entre a emergência da primeira e segunda onda folicular foi de sete dias, e o intervalo entre as ondas subsequentes (segunda, terceira e quarta) foi de quatro dias.

Simões *et al.* (2006) observaram que a concentração de P_4 apresentou um efeito negativo sobre o diâmetro e sobre o período de crescimento e de regressão do folículo dominante. O diâmetro folicular máximo, em mm, foi maior na primeira, quarta e quinta onda ($7,5 \pm 1,0$; $6,6 \pm 0,9$ e $6,9 \pm 1,1$; respectivamente) do que na segunda e na terceira onda ($5,9 \pm 0,7$ mm e $6,0 \pm 1,0$ mm, respectivamente). Na primeira e na quinta onda de crescimento folicular foi observada uma fase de crescimento do maior folículo ($3,3 \pm 1,2$ e $4,1 \pm 1,2$ dias, respectivamente) mais longa do que na segunda, terceira e quarta onda ($2,4 \pm 0,9$; $2,7 \pm 1,3$ e $2,8 \pm 1,3$ dias, respectivamente). O mesmo efeito foi observado durante a fase de regressão do maior folículo, sendo também mais demorada na primeira onda do que na segunda, na terceira e do que na quarta

onda ($4,3 \pm 1,4$; $3,6 \pm 1,1$; $3,0 \pm 1,3$ e $3,1 \pm 1,2$ dias). Tais resultados demonstram o efeito da concentração plasmática de P_4 sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, refletindo diretamente sobre o diâmetro e a dinâmica folicular ao longo do ciclo estral.

A existência do fenômeno de dominância folicular nos pequenos ruminantes ainda é um assunto bastante controverso (DRIANCOURT *et al.*, 1991; VIÑOLES, 2003). Alguns autores sugerem a existência desta relação de dominância, entretanto ela não seria tão aparente quanto na espécie bovina, o que permitiria a seleção de dois folículos ovulatórios, criando-se então o conceito de co-dominância (GINTHER e KOT, 1994; MEDAN *et al.*, 2005). Estudos mostram que durante a primeira e a última onda folicular ocorre uma grande produção de estrogênio, existindo uma forte relação de dominância do maior folículo sobre os demais. Entretanto, nas ondas foliculares que ocorrem no meio do ciclo, uma relação de dominância não foi possível ser estabelecida, já que elas não estavam associadas a uma grande elevação na concentração do estrogênio (de CASTRO *et al.*, 1999).

Estudos utilizando protocolos superovulatórios em caprinos evidenciaram a existência da dominância folicular durante a fase luteínica inicial. Foi observado que a presença de um folículo com diâmetro ≥ 5 mm no início do protocolo de superovulação apresentou um efeito deletério sobre a resposta ovariana, causando menor recrutamento folicular, menor taxa de ovulação e menor número de embriões com grau de qualidade 1 e 2 (MENCHACA *et al.*, 2002; MENCHACA *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de mais de um folículo dominante (co-dominância) presente nos pequenos ruminantes (ovinos e caprinos) permite a ocorrência de múltiplas ovulações. Em ovelhas dois mecanismos foram propostos para explicar a co-dominância: (1) a presença de um maior número de folículos responsivos às gonadotropinas e (2) um intervalo mais longo de ação do FSH sobre estes folículos (SCARAMUZZI *et al.*, 1993). Bartlewski *et al.* (1999b) observaram que em 10% das ovelhas estudadas pelo menos um dos folículos

ovulatórios foi originado na penúltima onda de crescimento, concluindo que uma maior taxa de ovulação esteja provavelmente associada a um maior período de recrutamento folicular.

2.2.1 Estacionalidade

A espécie caprina apresenta reprodução estacional, apresentando atividade reprodutiva nos períodos onde o período de luminosidade (fotoperíodo) é menor. O efeito da estacionalidade é mais observado em países de clima temperado, onde a latitude é superior a 35° N ou S (KARAGIANNIDIS *et al.*, 1999; GONÇALVES *et al.*, 2001; CHOE *et al.*, 2006). Apesar desta observação, a raça também parece exercer certa influência sobre a estacionalidade reprodutiva. Cruz *et al.* (2005) demonstraram que cabras de raças européias (Anglo Nubiana e Saanen), mesmo sendo criadas em regiões de clima tropical (latitude 14° 51'S) continuaram apresentando um período de anestro e inatividade ovulatória durante o verão (período do ano onde o fotoperíodo é maior).

As alterações que ocorrem na fisiologia reprodutiva das fêmeas domésticas consideradas estacionais (p.ex., gatas, éguas, cabras e ovelhas) são mediadas pela glândula pineal. Esta glândula, em resposta a fotoperíodos curtos, libera maiores quantidades do hormônio conhecido como melatonina, que desempenha um papel crítico na modificação da atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. A melatonina torna os centros hipotalâmicos de liberação tônica de GnRH menos sensíveis ao efeito negativo do E₂. Portanto, a capacidade do E₂ em inibir a secreção das gonadotropinas é o fator que regula a ciclicidade estacional destas espécies (PUGH, 2005). De forma geral, a melatonina indica a duração do fotoperíodo, resultando em uma resposta do sistema reprodutivo que varia de acordo com a espécie e a natureza particular de sua estratégia na estação reprodutiva (SWENSON e REECE, 1996).

Em caprinos, o ciclo reprodutivo é dividido em três estações distintas: a estação reprodutiva (de acasalamento), onde se observa uma atividade

ovariana luteal cíclica; a estação de anestro, onde esta atividade ovariana não é observada e a estação de transição (FONSECA e BRUSCHI, 2005). Na estação de anestro (dias longos), o ambiente de baixas concentrações de melatonina torna os centro hipotalâmicos liberador de GnRH mais sensível aos efeitos negativos do E₂, fazendo deste esteróide um potente supressor da frequência de liberação do LH. As concentrações plasmáticas de LH nesse momento permitem que haja crescimento folicular, contudo não são suficientemente altas para o desenvolvimento folicular final e a ovulação (SQUIRES, 2003).

Da estação de anestro para a fase de transição observa-se uma diminuição na sensibilidade do hipotálamo ao efeito supressor do E₂ sobre a liberação do GnRH, aumentando a frequência de liberação do LH (KARCSH, 1984). Contudo, quando ocorre o primeiro pico ovulatório de LH, o folículo pré-ovulatório nem sempre está completamente maduro a ponto de responder adequadamente ao estímulo hormonal, originando CL de vida curta e conseqüentemente ciclos estrais mais curtos (LEGAN *et al.*, 1985)

Na estação reprodutiva (dias curtos), a concentração da melatonina está mais elevada, e a sensibilidade do hipotálamo ao efeito negativo do estradiol sobre a secreção de LH bastante reduzida. Assim, o aumento na frequência do pulso de LH permite a maturação completa do folículo pré-ovulatório e posterior ovulação (SQUIRES, 2003).

Blaszczyk *et al.* (2004) observaram um efeito estacional sobre a concentração dos hormônios esteróides. Este estudo demonstrou uma diferença no padrão de secreção da melatonina dentro e fora da estação reprodutiva, que pode estar diretamente relacionada com a secreção de estradiol durante o período de estro, sendo maior durante a estação reprodutiva. Como o estradiol está diretamente relacionado com o comportamento sexual e o pico ovulatório de LH, cabras sincronizadas com MAP durante a estação reprodutiva apresentaram um intervalo entre a retirada do implante vaginal e a ovulação menor do que os animais sincronizados fora

da estação (PIERSON *et al.*, 2001). Apesar destas alterações, o estro pode ser eficientemente induzido dentro e fora da estação reprodutiva, contudo estas diferenças devem ser levadas em consideração nos protocolos que se destinam a IA ou IATF (PIERSON *et al.*, 2001; FONSECA, 2002; BLASZCZYK *et al.*, 2004).

A fisiologia reprodutiva dos machos também é influenciada pela estacionalidade, principalmente no que diz respeito a produção e qualidade espermática. Karangiannidis *et al.* (1999) avaliaram a quantidade e a qualidade espermática de três raças caprinas (Alpina, Saanen e Damascus) criadas em uma região na Grécia (40° 37'N). Neste estudo observaram que durante a estação reprodutiva a produção espermática (volume, concentração e quantidade total de espermatozoides por ejaculado) foi superior, o mesmo efeito foi observado na qualidade do sêmen (motilidade progressiva e patologia espermática). Estudando mais detalhadamente este assunto, La Falci *et al.* (2002) avaliaram as proteínas do plasma seminal de bodes da raça Saanen criados na região Sul do Brasil (30° 03'S) e observaram que o padrão eletroforético destas proteínas fora da estação reprodutiva foi diferente quando comparado com o padrão apresentado dentro da estação de acasalamento. Fora da estação foi observado que estas proteínas apresentaram um efeito deletério sobre a motilidade espermática e integridade do acrossoma. O efeito negativo foi atribuído a fosfolipase A₂, que apresentou uma maior concentração no plasma seminal coletado fora da estação.

2.3 DINÂMICA LUTEAL: OVULAÇÃO, LUTEOGÊNESE E LUTEÓLISE

2.3.1 Breve Histórico

McCracken *et al.* (1999) e Niswender *et al.* (2000) em suas respectivas revisões de literatura descrevem que um pesquisador chamado Volcher Coiter (1514 – 1576) observou a presença de cavidades amareladas preenchidas por um líquido nos ovários de seres humanos. Em 1672 o pesquisador Regnier de Graaf (1641 - 1673) apresentou a primeira descrição destas estruturas e percebeu que, em coelhos, após o coito tais estruturas globulares apareciam

nos ovários e permaneciam até o momento do parto. De Graaf também observou que o número de fetos estava diretamente relacionado ao número destas estruturas. Quase 20 anos mais tarde, Marcello Malpighi, em 1689, realizou uma detalhada avaliação microscópica destas estruturas e passou a denominá-las de *corpus luteum* (em português corpo lúteo), que significa corpo amarelo.

Entretanto somente no final do século XIX, Beard (1897) e Prenant (1898), postularam que o CL poderia funcionar como uma glândula, produzindo determinadas substâncias com a função de manter a gestação e de supressão da ovulação e do estro durante este período. Em 1901 esta observação foi confirmada por estudos realizados por Magnus e Fraenkel, que ao removerem os corpos lúteos presentes em ovários de coelhas causaram um abortamento ou reabsorção dos embriões presentes no útero dos animais. Em caprinos esta evidência foi observada em 1926 por Drumond-Robinson e Asdel (McCRACKEN *et al.*, 1999; NISWENDER *et al.*, 2000).

Apesar destes estudos, a natureza da substância produzida por esta estrutura permaneceu desconhecida por mais de duas décadas, quando em 1929 Allen e Corner demonstraram que o extrato lipídico extraído do CL era capaz de manter a gestação em coelhas ovariectomizadas. Cinco anos mais tarde foi denominada progesterona e pela primeira vez foi cristalizada pelos pesquisadores Allen e Wintersteiner (McCRACKEN *et al.*, 1999; NISWENDER *et al.*, 2000).

Classicamente, o CL é definido como sendo uma glândula transitória formada a partir das células da parede folicular logo após o processo de ovulação. Sua formação é resultado de um complexo mecanismo associado à alterações morfológicas e bioquímicas. Sua função consiste na síntese e liberação da progesterona, um esteróide essencial para o estabelecimento e manutenção da gestação (SMITH *et al.*, 1994; SANGHA *et al.*, 2002; WEBB *et al.*, 2002).

2.3.2 Ovulação e Luteogênese

A ovulação é o resultado de uma interação dinâmica entre o pico de LH e determinados fatores locais incluindo os esteróides, as prostaglandinas e peptídeos. O pico de LH inicia o processo de mudanças estruturais e bioquímicas que levam a ruptura do folículo ovulatório, resultando na expulsão do oócito e conseqüente formação do CL (ACOSTA e MIYAMOTO, 2004).

Durante o processo de ovulação é possível observar duas importantes alterações que vão facilitar a ruptura do folículo ovulatório: a degradação das fibras colágenas presentes na túnica albugínea e na parede folicular e um aumento da perfusão sangüínea na base do folículo ovulatório (MURDOCH *et al.*, 1986; ABISOGUN *et al.*, 1988; ACOSTA *et al.*, 1999). Este aumento na perfusão sangüínea para os ovários é mediado por peptídeos vasoativos (angiotensina II, endotelina I e peptídeo natriurético atrial), que são liberados durante o estímulo provocado pelo LH. Estes peptídeos vasoativos desempenham uma importante função durante o processo de ovulação e o desenvolvimento luteal inicial, pois regulam a secreção local de prostaglandinas e hormônios esteróides (ACOSTA *et al.*, 1999).

Após a ovulação, inicia-se o processo de formação do CL, denominado luteogênese. Este período é caracterizado por um intenso crescimento tecidual e proliferação celular semelhante a um tumor. Em ovelhas, o tecido do folículo ovulatório que pesa em média 40mg, dá origem a um CL com cerca de 600 a 700mg em apenas poucos dias (FARIN *et al.*, 1986). O CL dos ruminantes domésticos é composto por uma população heterogênea de células com propriedades morfológicas, endocrinológicas e bioquímicas distintas das células de origem (SMITH *et al.*, 1994). Esta população de células está dividida em duas classes: as células não-esteroidogênicas (fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas, leucócitos, macrófagos e eventualmente plasmócitos) e as células esteroidogênicas (células luteais grandes e células luteais pequenas) (ALILA e HANSEL, 1984).

As características morfológicas do CL de cabras são semelhantes às de outros ruminantes. As células luteais grandes são formadas a partir da diferenciação das células da granulosa. São células que apresentam um maior volume e apresentam uma grande capacidade de produção de P_4 , sendo responsáveis pela produção de 80% deste esteróide. Em caprinos e ovinos representam aproximadamente 40% e 35% do volume luteal, e somente 10% e 8-14% das células luteais, respectivamente (FARIN *et al.*, 1986; SHARMA e SHARMA, 1998). Tais células apresentam uma secreção basal de P_4 elevada, entretanto uma menor secreção quando estimulada pelo LH. Durante o processo de luteólise, secretam ocitocina (SANGHA *et al.*, 2002).

As células luteais pequenas são formadas a partir da diferenciação das células da teca. São células de menor volume, entretanto encontradas em maior número quando comparadas às células luteais grandes. Em caprinos, representam aproximadamente 20% do volume total do CL e 25% do total de células; em ovinos representam aproximadamente 18-23% e 23-26%, respectivamente (FIELDS e FIELDS, 1996). Estas células possuem uma secreção basal de P_4 reduzida, porém uma maior secreção sob o estímulo do LH, quando comparadas com as células luteais grandes (SANGHA *et al.*, 2002).

Contudo, a origem desses dois tipos celulares do CL ainda é um assunto bastante controverso. Alguns pesquisadores relatam que algumas células luteais pequenas podem se diferenciar em células luteais grandes no decorrer do ciclo, e vice-versa (ALILA e HANSEL, 1984; KALENDER e ARIKAN, 2007). Outros autores propõem a existência de células tronco no CL, que sofrem diferenciação em células luteais pequenas, e estas posteriormente em células luteais grandes, entretanto esta hipótese ainda não foi testada (SMITH *et al.*, 1994).

O processo de formação do CL (luteogênese) tem seu início logo após o processo de ovulação. É um processo rápido, caracterizado por migrações celulares para o interior do folículo, intensa proliferação e diferenciação celular, neovascularização e remodelamento tecidual sob a influência de fatores mitogênicos e angiogênicos, dentre eles o fator de crescimento de fibroblastos

básico (bFGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I), fator de crescimento ligador da heparina, fator de crescimento derivado de plaquetas e metaloproteinases (SMITH *et al.*, 1994; McCracken *et al.*, 1999; NISWENDER *et al.*, 2000; ACOSTA e MIYAMOTO, 2004).

Além destas mudanças estruturais, o pico de LH está diretamente relacionado às mudanças tanto na expressão quanto na regulação das enzimas esteroidogênicas, um evento chave dentro do processo de luteinização que torna as células luteais capazes de sintetizar a progesterona (SMITH *et al.*, 1994; SANGHA *et al.*, 2002).

Smith *et al.* (1994), em sua revisão de literatura, descrevem que durante o processo de luteogênese há uma elevação nas concentrações de mRNA codificador das enzimas clivadora da cadeia lateral do colesterol (P-450_{scc}) e 3 β -hidroxiesteroide-desidrogenase (3 β HSD), responsáveis pela biossíntese da P₄. Durante este período observa-se também uma redução na expressão das enzimas responsáveis pela síntese de estrogênio, a 17 α -Hidroxilase (P-450_{17 α}) e a aromatase (P-450_{arom}). Estudos em ovinos não detectaram diferenças entre as concentrações de RNAm para 3 β HSD dos dias 3, 6, 9, e 12 do ciclo estral, entretanto esta concentração diminuiu no dia 15, momento coincidente com o processo de luteólise (HAWKINGS *et al.*, 1993).

2.3.3 Luteólise

A luteólise, pela própria origem da palavra, consiste na degeneração do corpo lúteo. Aparentemente, o desenvolvimento da luteólise consistiu em um mecanismo evolutivo para elevar a eficiência reprodutiva, permitindo que um novo ciclo recomece caso a fêmea não fique gestante (McCracken *et al.*, 1999). O processo de luteólise é caracterizado inicialmente por uma diminuição na biossíntese e secreção da P₄ (luteólise funcional), seguida por uma alteração na estrutura histológica do CL (luteólise morfológica e estrutural), resultando na formação do *corpus albicans*, uma pequena cicatriz composta por tecido conjuntivo denso (McGuire *et al.*, 1994; McCracken *et al.*, 1999).

Na grande maioria das espécies domésticas a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) é o fator responsável pelo início do processo de luteólise (McKRACKEN *et al.*, 1999; NISWENDER *et al.*, 2000). A $PGF_{2\alpha}$ é o hormônio luteolítico sintetizado e liberado de forma cíclica pelo endométrio de vacas, éguas, ovelhas e cabras (SWENSON e REECE, 1996). Com base em estudos realizados em ovinos, McCracken *et al.* (1999) descrevem como os esteróides ovarianos controlam o processo de luteólise. No final do ciclo estral, com a diminuição da ação da P_4 sobre o hipotálamo, ocorre a elevação na concentração plasmática de E_2 . Este por sua vez, estimula a formação de receptores para ocitocina no endométrio e, simultaneamente, estimula a liberação de pequenas quantidades de ocitocina, mas em elevada frequência.

Pequenas quantidades de $PGF_{2\alpha}$ (sub-luteolíticas) são liberadas pelo endométrio, sendo suficientes para iniciar a liberação suplementar de ocitocina pelo tecido luteal. Esta liberação suplementar determina uma amplificação na liberação endometrial de $PGF_{2\alpha}$. A síntese e liberação de $PGF_{2\alpha}$ pelo útero passam a ser altas o suficiente para ativar os receptores de $PGF_{2\alpha}$ de baixa sensibilidade, inibindo a secreção de P_4 e promovendo a liberação suplementar de ocitocina pelo CL, formando um sistema cíclico de retroalimentação positiva (McKRACKEN *et al.*, 1999).

A primeira alteração observada durante o processo de luteólise é a redução na concentração plasmática de P_4 . Em bovinos, uma redução significativa na concentração plasmática de P_4 foi observada 30 minutos após a aplicação da $PGF_{2\alpha}$, com o volume luteal e a velocidade do fluxo sanguíneo permanecendo inalterado por um período de 8 horas (ACOSTA *et al.* 2002). Em caprinos, a concentração plasmática de P_4 caiu para valores menores que 1ng/mL cerca de 24 horas após a aplicação da $PGF_{2\alpha}$ (BRETZLAFF *et al.*, 1983).

Em uma extensa revisão de literatura, Niswender *et al.* (2000), descreveram as diversas formas pela qual a $PGF_{2\alpha}$ poderia determinar a redução da síntese e liberação da P_4 . Aparentemente, a $PGF_{2\alpha}$ não apresenta um efeito sobre os receptores de LH ou sobre a capacidade de captação das lipoproteínas e armazenamento do colesterol por parte das células luteais. O

primeiro ponto onde ocorre um efeito negativo da $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre a esteroidogênese parece ser sobre o transporte do colesterol pela membrana da mitocôndria. Ainda não foi observado um efeito sobre as enzimas $\text{P-450}_{\text{SCC}}$ e $3\beta\text{HSD}$.

Com relação às alterações vasculares que ocorrem durante a luteólise por ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, inicialmente observa-se um aumento agudo no fluxo sanguíneo para o CL (ACOSTA e MIYAMOTO, 2004). Esta elevação aguda no aporte sanguíneo somente ocorre no meio do ciclo, e acontece entre 0,5-2 horas após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$, sendo crucial para as células endoteliais do CL sintetizarem e liberarem substâncias vasoativas (endotelina-1 e angiotensina II), que vão causar uma posterior vasoconstrição, reduzindo o fluxo sanguíneo para o CL (OHTANI *et al.*, 1998; LEVY *et al.*, 2000).

As alterações morfológicas que ocorre no CL durante o processo de regressão podem ser atribuídas a diversos fatores incluindo: apoptose, fluxo sanguíneo, células do sistema imune, metaloproteinases, fator de necrose tumoral- α e inibidor 1 do ativador do plasminogênio (McCRACKEN *et al.*, 1999).

2.4 ULTRA-SONOGRAFIA

2.4.1 Fundamentos da ultra-sonografia

Segundo a revisão de literatura realizada por King (2006), o casal Curie descobriu, no final do século XIX (1880), que determinados cristais apresentavam uma propriedade piezoelétrica, ou seja, possuíam a capacidade de converter energia elétrica em mecânica e vice-versa. Em seus estudos, observaram que a aplicação de eletricidade sobre estes cristais resultava em sua deformação e posterior produção de ondas sonoras de alta frequência (acima de 20KHz), então denominadas ultra-sônicas. E que ao retornarem aos cristais, as ondas ultra-sônicas promoviam sua reorganização e a conversão da energia mecânica em elétrica.

Griffin e Ginther (1992) compilaram dados da literatura e, de forma detalhada, descreveram os princípios básicos da ultra-sonografia. Resumidamente, as ondas sonoras são emitidas pelos cristais localizados na probe ou transdutor e transmitidas até o tecido que se deseja avaliar. A proporção das ondas refletidas (eco) ao transdutor é convertida em corrente elétrica e demonstrada no monitor como uma imagem em escala de cinza. Portanto, pode-se dizer que o fundamento da ultra-sonografia consiste na capacidade dos diferentes tecidos analisados de refletir ondas sonoras de alta frequência.

Quando um feixe de onda sonora atinge um obstáculo, a magnitude da reflexão depende da impedância acústica do material, uma propriedade física que está diretamente relacionado com a resistência ou dificuldade da passagem do som (RAMALHO *et al.*, 1999). Líquidos não são capazes de refletir as ondas ultra-sônicas (anecóicas), e na imagem formada correspondem as regiões negras. Já tecidos mais densos (p.ex., ossos) são capazes de refletir grande parte das ondas, sendo representados na imagem como regiões brancas, denominadas hiperecóicas (GRIFFIN e GINTHER, 1992).

Atualmente, o aparelho de ultra-som B-mode (*Brighness modality* - modo brilho) é o mais utilizado (KING, 2006). Este tipo de equipamento é capaz de gerar e receber ondas de alta frequência criando uma imagem em um plano seccional. A imagem ultra-sonográfica é uma matriz bi-dimensional composta por milhares de “pictures elements” ou pixels, que representam o menor elemento de uma imagem (TOM *et al.*, 1998).

Os pixels são apresentados na imagem dentro de uma escala de cinza, que varia de zero (preto) a 255 (branco). O valor dos pixels é proporcional à amplitude da onda refletida que retorna ao transdutor, i.e., quanto maior o eco produzido, maior serão os valores dos pixels, dando origem a uma imagem mais clara (GRIFFIN e GINTHER, 1992; TOM *et al.*, 1998).

2.4.2 Ultra-sonografia em pequenos ruminantes

A ultra-sonografia é uma técnica amplamente utilizada em pesquisas envolvendo a espécie humana e os animais domésticos. Entretanto, o foco das pesquisas conduzidas nestas espécies é bastante divergente. Nos seres humanos observa-se claramente uma preocupação em utilizar a ultra-sonografia como ferramenta para o diagnóstico de determinadas patologias, enquanto que nos animais domésticos o objetivo é a compreensão dos diversos eventos fisiológicos (SINGH *et al.*, 2003).

O primeiro relato do início da utilização da ultra-sonografia em animais data de 1956, sendo usado para avaliar a qualidade de carcaça a partir da mensuração da camada de gordura do lombo. Contudo, o primeiro relato do uso como método de diagnóstico ocorreu somente 10 anos mais tarde, sendo utilizado para o diagnóstico de gestação em ovelhas. Desde então, a ultra-sonografia vem sendo amplamente utilizada, seja como simples ferramenta ou como o próprio objeto de estudo, nas mais diversas áreas da Medicina Veterinária (KING, 2006).

A ultra-sonografia é um método diagnóstico não-invasivo, considerado seguro para o operador, auxiliares e principalmente para os animais, já que não há necessidade de sedação e nem relatos de alterações fisiológicas em função da técnica. Uma outra grande vantagem observada está na possibilidade de avaliações seriadas e em tempo real, o que não era possível através das metodologias cirúrgicas previamente utilizadas (SINGH *et al.*, 2003).

O diagnóstico ultra-sonográfico foi o mais significativo avanço tecnológico no campo de pesquisa em grandes animais e reprodução clínica desde a introdução da palpação transretal e do radioimunoensaio (GINTHER, 1986). Em pequenos ruminantes, esse avanço tecnológico foi muito mais significativo visto que nessas espécies a palpação transretal não é possível.

A adaptação da ultra-sonografia por via trans-retal para pequenos ruminantes foi um marco na década de 90, permitindo a realização de importantes estudos envolvendo a fisiologia ovariana (SCHIRICK *et al.*, 1993; GINTHER e KNOT, 1994; GINTHER *et al.*, 1995; De CASTRO *et al.*, 1999;

DICKIE *et al.*, 1999). Desde então, diversos outros estudos foram conduzidos nas áreas de dinâmica folicular (MEDAN *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2006), dinâmica luteal (ORITA *et al.*, 2000; ARASHIRO *et al.*, 2007) e endocrinologia ovariana (MENCHACA e RUBIANES, 2002; MEDAN *et al.*, 2005).

Em pequenos ruminantes, a ultra-sonografia também tem sido utilizada como uma importante ferramenta para estudos envolvendo diagnóstico inicial da gestação (MEDAN *et al.*, 2004) e sexagem fetal (SANTOS *et al.*, 2007). Outras ferramentas, como o eco Doppler colorido, também têm sido utilizadas para estudos sobre a vascularização luteal em caprinos (MIYAMOTO *et al.*, 2006).

2.4.3 Análise computacional de imagens ultra-sonográficas

A aparência ultra-sonográfica ou padrão de imagem de um tecido é denominado ecotextura, sendo determinado pela estrutura histológica do mesmo (SINGH *et al.*, 2003). Estudos anteriores com ovinos (GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2002) e bovinos (VERONESI *et al.*, 2002) correlacionaram a concentração plasmática de P_4 com a aparência ultra-sonográfica (ecotextura) do CL, sendo esta última considerada um indicador do *status* funcional do CL. Contudo, nestes experimentos, a ecotextura não foi quantificada, sendo realizada uma avaliação visual e subjetiva.

Uma imagem ultra-sonográfica é composta por um conjunto de fileiras de pixels, ou *picture elements*, e representam a intensidade do reflexo da onda sonora em um ponto específico do tecido (TOM *et al.*, 1998).

A densidade e as características macroscópicas do tecido podem ser observadas por ultra-som, mas não quantificadas pelo olho humano. O olho humano é capaz de distinguir somente 18 a 20 diferentes tons de cinzas, o que leva a diferentes percepções individuais da escala de cinza e, conseqüentemente, a variações extremas na interpretação da imagem (PIERSON e ADAMS, 1995). O uso da análise computacional, a partir de algoritmos computacionais especificamente desenvolvidos, reduz as inconsistências da avaliação visual, pois permite a quantificação de cada pixel

da imagem obtendo o valor médio dos pixels e o desvio padrão (heterogeneidade) (SINGH *et al.*, 2003).

Análises de imagens com auxílio de ferramentas computacionais e modelos matemáticos têm permitido importantes progressos na pesquisa da dinâmica ovariana (SINGH *et al.*, 2003). Singh *et al.* (1998) e Tom *et al.* (1998) observaram variação na ecotextura da parede e do antro folicular em função da fase de crescimento ou regressão dos folículos, assim como entre folículos dominantes e subordinados, concluindo que a densidade das imagens ultra-sonográficas reflete o *status* funcional e endócrino do folículo.

Análises computacionais de imagens ultra-sonográficas de folículos ovarianos também podem auxiliar na compreensão sobre a etiologia da regressão luteal precoce (STUBBINGS *et al.*, 1986; SAHARREA *et al.*, 1998). Em um estudo recente, observou-se que folículos ovulatórios que deram origem a um CL classificado como “de baixa competência” (persistência inferior a 7 dias) apresentavam aparências ultra-sonográficas distintas dos folículos que deram origem a um CL considerado normal (LIU *et al.*, 2007). Observou-se que a região central do antro dos folículos que deram origem a CL “de baixa competência” apresentou os valores médios dos pixels e a heterogeneidade mais elevadas do que em folículos que deram origem a um CL normal. O que sugere um maior grau de descamação das células da granulosa nos folículos que deram origem a CL “de baixa competência”. Nesse mesmo estudo foi observado ainda que os folículos que deram origem a CLs normais apresentavam a parede folicular mais espessa e vascularizada.

A análise computacional de imagens ultra-sonográficas também pode ser útil na avaliação da função luteal. Singh *et al.* (1997) trabalhando com bovinos, Davies *et al.* (2006) com ovinos e Simões *et al.* (2007) em caprinos, observaram que os valores dos pixels das imagens variaram entre o metaestro, diestro e proestro, correspondendo às fases de formação, função e regressão luteal. Também observaram que os valores de pixels das imagens tiveram uma correlação significativa com a concentração de P_4 no plasma e no próprio corpo lúteo, e ainda com a densidade volumétrica das células luteais e do tecido conjuntivo. Entretanto, Tom *et al.* (1998) avaliando ovários de novilhas por

ultra-sonografia transretal não observaram correlação entre os valores de pixel e o diâmetro luteal, principal parâmetro de avaliação utilizado na caracterização da função luteal. Esta observação pode estar associada à dificuldade normalmente encontrada em correlacionar-se tamanho luteal, produção de P_4 e taxas de gestação. A elevação na concentração plasmática de P_4 é essencial para o estabelecimento da gestação após a inseminação e também após a transferência de embriões e a avaliação correta da função luteal é, portanto, de grande importância na seleção de receptoras (CHAGAS e SILVA *et al.*, 2002).

Siqueira (2007) também não observou uma correlação significativa entre a concentração plasmática de P_4 e o valor médio dos pixels em CL de bovinos, entretanto relatou uma correlação positiva com a heterogeneidade da imagem, considerando-a um potencial indicador da função luteal.

O uso de algoritmos computacionais para a análise de imagens ultrasonográficas representa um importante avanço tecnológico no sentido de elucidar os mecanismos envolvidos na fisiologia reprodutiva. Entretanto, segundo Siqueira (2007), há a necessidade de um melhor ajustamento e determinação das características que devem ser consideradas desejáveis nas diferentes estruturas ovarianas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABISOGUN, A.O.; DAPHNA-IKEN, D.; REICH, R.; KRANZFELDER, D.; TSAFRIRI, A. Modulatory role of eicosanoids in vascular changes during the preovulatory period in the rat. *Biology of reproduction*, v.38, p.756-762, 1988.

ACOSTA, T.J.; BERISHA, B.; OZAWA, T.; SATO, K.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroids hormones and prostaglandin secretion. *Biology of Reproduction*, v.61, p.1419-1425, 1999.

ACOSTA, T.J.; YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F_{2α} injection in the cow. *Biology of Reproduction*, v. 66, p.651-658, 2002.

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

ALILA, H.W.; HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biology of Reproduction*, v.31, 1015-1025, 1984.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE CAPRINOS E OVINOS. Editora Agropecuária Tropical Ltda, Uberaba – MG, 194p., 2008.

ARASHIRO, E.K.N.; SIQUEIRA, L.G.B.; VIANA, J.H.M.; FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H.; CAMARGO, L.S.; FERNANDES, C.A.C.; BRANDÃO, F.Z. Estudo ultra-sonográfico de características luteais no período de luteogênese em cabras da raça Toggenburg. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35 (suplemento 3), p.1291, 2007.

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.255-266, 2004.

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; COOK, S.J.; CHANDOLIA, R.K.; HONARAMOOZ, A.; RAWLINGS, N.C. Ovarian antral follicular dynamics and

their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.115, p.111-124, 1999b.

BLASZCZYK, B.; UDALA, J.; GACZARZEWICZ, D. Changes in estradiol, progesterone, melatonin, prolactin and thyroxine concentrations in blood plasma of goats following induced estrus in and outside the natural breeding season. *Small Ruminant Research*, v.51, p.209-219, 2004.

BRETZLAFF, K.N.; HILL, A.; OTT, R.S. Induction of luteolysis in goat with prostaglandin F2 alpha. *American Journal of Veterinary Research*, v.44, p.1162-1164, 1983. (abstract)

CAMP, J.C.; WILDT, D.E.; HOWARD, P.K.; STUART, L.D.; CHAKRABORTY, P.K. Ovarian activity during normal and abnormal length estrous cycles in the goat. *Biology of Reproduction*, v.28, p.673-681, 1983.

CHAGAS E SILVA, J., LOPES DA COSTA, L., ROBALO SILVA, J. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*, v. 58, p. 51-59, 2002.

CHOE, C.Y.; KIM, J.G.; CHO, S.R.; SON, D.S.; KIM, Y.K.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHOE, S.Y.; RHO, G.J. Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, p.55-60, 2006.

CRUZ, J.F.; RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F. Ovarian follicular dynamics during anoestrous in Anglo-Nubian and Saanen goats raised in Tropical climate. *Tropical Animal Health and Production*, v.37, p.395-402, 2005.

DAVIES, K.L.; BARTLEWSKI, P.M.; PIERSON, R.A.; RAWLINGS, N.C. Computer assisted image analyses of corpora lutea in relation to peripheral concentrations of progesterone: a comparison between breeds of sheep with different ovulation rates. *Animal Reproduction Science*, v.96, p.165-175, 2006.

De CASTRO, T.; RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; RIVERO, A. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentration during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology*, v.52, p.399-411, 1999.

DICKIE, A.M.; PATERSON, C.; ANDERSON, J.L.M.; BOYD, J.S. Determination of corpora lutea number in Booroola-Texel ewes using transrectal ultrasound. *Theriogenology*, v.51, p.1209-1224, 1999.

DRIANCURT, M.A.; WEBB, R.; FRY, R.C. Does follicular dominance occur in ewes? *Journal of Reproduction and Fertility*, v.93, p.63-70, 1991.

ESPINOZA-MARQUEZ, M.C.; VALENCIA, J.; ZARCO, L., ESCOBAR-MEDINA, F.J.; COLINA-FLORES, F.; ARECHIGA-FLORES, C.F. Effect of fluorogestone

acetate on embryo recovery and quality in eCG-superovulated goats with premature luteal regression. *Theriogenology*, v.62, p.624-630, 2004.

FARIN, C.E.; MOELLER, H.R.; SAWYER, F.; GAMBONI, F.; NISWENDER, G.D. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v.35, p.1299-1308, 1986.

FONSECA, J.F. Controle e perfil hormonal do ciclo estral e performance reprodutiva de cabras Alpinas e Saanen. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 107p., 2002.

FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H. Reprodução assistida em pequenos ruminantes. *Revista de Ciências Agrárias*, nº43, jun-jul, suplemento, 2005.

FONSECA, J.F.; SOUZA, J.M.G.; BRUSCHI, J.H. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. *Anais do II Simpósio de Caprinos e Ovinos da EV-UFMG*, p.167-195, 2007.

FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.; SANTOS, A.D.F; MAFFILI, V.V.; AMORIM, L.S.; MORAES, E.A. Progesterone and behavioral features when estrous is induced in Alpine goats. *Animal Reproduction Science*, v. 103, p.366-373, 2008.

GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. *Equiservices Publishing*, Cross Plains, WI, 1986.

GINTHER, O.J.; KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*, v.42, p.987-1001, 1994.

GINTHER, O.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*, v.43, p.689-703, 1995.

GINTHER, O.J.; WILTBANK M.C.; FRICHE F.M.; GIBBONS J.R.; KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of reproduction*, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas a reprodução animal*. São Paulo, Varela Editora e Livraria Ltda, 324p., 2001.

GONZALEZ, F.H.D. *Introdução à Endocrinologia Reprodutiva Veterinária* UFRGS, 87p., 2002.

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 in Domestic Animals*, v.35, p.65-68, 2000.

GOOTWINE, E.; BARASH, I.; BOR, A.; DEKEL, I.; FRIEDLER, A.; HELLER, M.; ZAHARONI, U.; ZENU, A.; SHANI, M. Factors affecting success of embryo collection and transfer in a transgenic goat program. *Theriogenology*, v.48, p.485-499, 1997.

GORDON, I. *Controlled reproduction in sheep and goats*. Cambridge, UK: University Press, 450p., 1997.

GRIFFIN, P.G.; GINTHER, O.J. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. *Journal of Animal Science*, v.70, p.953-972, 1992.

HAWKINS, D.E.; BELFIORE, C.J.; KILE, J.P.; NISWENDER, G.D. Regulation of messenger ribonucleic acid encoding 3β hydroxy-steroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase in the ovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, v.48, p.1185-1190, 1993.

IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.34, p.39-54, 1987.

KALENDER, H., ARIKAN, S. Size distribution of dispersed luteal cells during oestrous cycle in Angora goats. *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, p.457-460, 2007.

KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; KARATZAS, G. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology*, v. 53, p.1285-1293, 1999.

KARSCH, F.J. Endocrine and environmental control of oestrus cyclicity in sheep. *Reproduction in Sheep*, v.1, p. 10-15, 1984.

KING, A.M. Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. *The Veterinary Journal*, v.171, p.408-420, 2006.

LA FALCI, V.S.N.; TORTORELLA, H.; RODRIGUES, J.L.; BRANDELLI, A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology*, v.57, p.1035-1048, 2002.

LEGAN, S.J.; IANSON, H.; FITZGERALD, B.P.; AKAYDIN, M.S. Importance of short luteal phases in the endocrine mechanism controlling initiation of estrous cycle in anestrus ewe. *Endocrinology*, v.117, p. 1530-1536, 1985.

LEVY, N.; KOBAYASHI, S.; ROTH, S.; WOLFENSON, D.; MIYAMOTO, A.; MEIDAN, R. Administration of prostaglandin $F_{2\alpha}$ during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and its type A receptor: A possible cause of corpus luteum refractoriness. *Biology of Reproduction*, v.63, p.377-382, 2000.

LIU, X.; HART, E.J.; DAI, Q.; RAWLINGS, N.C.; PIERSON, R.A.; BARTLEWSKI, P.M. Ultrasonographic image attributes of non-ovulatory follicles and follicles with

different luteal outcomes in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) – treated anestrus ewes. *Theriogenology*, v.67, p.957-969, 2007.

LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science*, v.70, p. 3615-3626, 1992.

MAFFILI, V.V.; TORRES, C.A.; FONSECA, J.F.; MORAES, E.A.; PONTES, R.A.M. Sincronização de estro em cabras da raça Saanen com esponja intravaginal e CIDR-G®. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57(5), p.591-598, 2005.

MAFFILI, V.V.; TORRES, C.A.; BRUSCHI, J.H.; FONSECA, J.F.; VIANA, J.H.M. Indução do estro em cabras da raça Toggenburg com dois diferentes dispositivos intravaginais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58(3), p.367-372, 2006.

McCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews*, v.79(2), p.263-304, 1999.

McGUIRE, W.J.; JUENGEL, J.L.; NISWENDER, G.D. Protein kinase C second messenger system mediates the antiestrogenic effects of prostaglandins F_{2α} in the ovine corpus luteum in vivo. *Biology of Reproduction*, v.51, p.800-806, 1994.

MEDAN, M.S.; WATANABE, G.; SASAKI, K.; SHARAWY, S.; GROOME, N.P.; TAYA, K. Ovarian dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins, ovarian steroids, and inhibin during the estrous cycle in goats. *Biology of Reproduction*, v.69, p.57-63, 2003.

MEDAN, M.S.; WATANABE, G.; ABSY, G.; SASAKI, K.; SHARAWY, S.; TAYA, K. Early pregnancy diagnosis by means of ultrasonography as a method of improving reproductive efficiency in goats. *Journal of Reproduction and Development*, v.50, p.391-397, 2004.

MEDAN, M.S.; WATANABE, G.; SASAKI, K.; GROOME, N.P.; SHARAWY, S.; TAYA, K. Follicular and hormonal dynamics during the estrous cycle in goats. *Journal of Reproduction and Development*, v.51(4), p.455-463, 2005.

MENCHACA, A; RUBIANES, E. Effect of high progesterone concentrations during the early luteal phase on the length of ovulatory cycles of goats. *Animal Reproduction Science*, v.68, p. 69-76, 2001.

MENCHACA, A; RUBIANES, E. Relation between progesterone concentrations during early luteal phase and follicular dynamics in goats. *Theriogenology*, v.57, p. 1411-1419, 2002.

MENCHACA, A.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on day 0 or day 3 postovulation in goats. *Theriogenology*, v.58, p.1713-1721, 2002.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Day 0 protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology*, v.68, p.1111-1117, 2007.

MURDOCH, W.; PETERSON, T.; VAN KIRK, E.; VINCENT, D.; INSKEEP, E. Interactive roles of progesterone, prostaglandin, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biology of Reproduction*, v.35, p.1187-1194, 1986.

MYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; HAYASHI, K.G.; KAMADA, D.; KAWASHIMA, C.; KANEKO, E.; ACOSTA, T.J.; MATSUI, M. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: new observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only with black and white. *Journal of Reproduction and Development*, v.52, p.153-160, 2006.

NISWENDER, G.D., JUENGEL, L.J., SILVA, P.J., ROLLYSON, M.K., MCINTUSH, E.W. Mechanism controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, v.80, 1-29, 2000.

OHTANI, M.; KABAYASHI, S.; MIYAMOTO, A.; HAYASHI, K.; FUKUI, Y. Real-time relationship between intraluteal and plasma concentrations of endothelin, oxytocin, and progesterone during prostaglandin F₂-(induced luteolysis in the cow. *Biology of Reproduction*, v.58, p.103-108, 1998.

ORITA, J.; TANAKA, T.; KAMOMAE, H.; KANEDA, Y. Ultrasonographic observation of follicular and luteal dynamics during the estrous cycle in Shiba goats. *Journal of Reproduction and Development*, v.46, p.31-37, 2000.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*, v.21, p.495-504, 1984.

PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. *Theriogenology*, v.43, p.105-112, 1995.

PIERSON, J.T.; BALDASSARE, H.; KEEFER, C.L.; DOWNEY, B.R. Seasonal variation in preovulatory events associated with synchronization of estrus in dwarf goats. *Theriogenology*, v.56, p.759-769, 2001.

PIETERSE, M.C.; TAVERNE, M.A.M.; KRUIP, A.M.; WILLEMSE, A.H. Detection of corpora lutea and follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. *The Veterinary Record*, v. 126, p. 552-554, 1990.

PUGH, D. G. *Clínica de Ovinos e Caprinos*. São Paulo: Roca, 2005, 511p

RAMALHO, F.; FERRARO, G.N.; TOLEDO, P.A. *Os fundamentos da física*, Vol 2. São Paulo, Editora Moderna, 530p., 1999.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.271-287, 2003.

RUMINANDO... Boletim interno da Embrapa Caprinos, nº 14, 15 a 21 de agosto, 2005.

SAHARREA, A.; VALENCIA, J.; BALCÁZAR, A.; MEJÍA, O.; CERBÓN, J.L.; CABAALLERO, V.; ZARCO, L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology*, v.50, p.1039-1052, 1998.

SANGHA, G.K., SHARMA, R.K., GURAYA, S.S. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Ruminant Research*, v.43, 53-64, 2002.

SANTOS, M.H.B.; RABELO, M.C.; FILHO, C.R.A.; DEZZOTI, C.H.; REICHENBACH, H-D.; NEVES, J.P.; LIMA, P.F.; OLIVEIRA, M.A.L. Accuracy of early fetal sex determination by ultrasonic assessment in goats. *Research in Veterinary Science*, v.83, p.251-255, 2007.

SCARAMUZZI, R.J.; ADAMS, N.R.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; DOWNING, J.A.; FINDLAY, J.K.; HENDERSON, K.M.; MARTIN, G.B.; McNATTY, K.P.; McNEILLY, A.S.; TSONIS, C.G. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproductio Fertility and Development*, v.5, p.459-478, 1993.

SCHRICK, F.N.; SURFACE, R.A.; PRITCHARD, J.Y.; DAILEY, R.A.; TOWNSEND, E.C.; INSKEEP, E.K. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biology of Reproduction*, v.49, p.1133-1140, 1993.

SHARMA, R.K.; SHARMA, M. Corpus luteum spurium of goat. *Indian Journal of Animal Science*, v.68, p.150-152, 1998.

SIMÕES, J.; ALMEIDA, J.C.; VALENTIM, R.; BARIL, G.; AZEVEDO, J.; FONTES, P.; MASCARENHAS, R. Follicular dynamics in Serrana goats. *Animal Reproduction Science*, v.96, p.16-26, 2006.

SIMÕES, J.; ALMEIDA, J.C.; VALENTIM, R.; BARIL, G.; AZEVEDO, J.; FONTES, P.; MASCARENHAS, R. Assessment of luteal function by ultrasonographic appearance and measurement of corpora lutea in goats. *Animal Reproduction Science*, v.97, p.36-46, 2007.

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*, v.109, p.35-44, 1997.

SINGH, J.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Ultrasound image attributes of bovine ovarian follicles and endocrine and functional correlates. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.112, p.19-29, 1998.

SINGH, J.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. Promise of new image technologies for assessing ovarian function. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.371-399, 2003.

SMITH, M.F.; McINTUSHI, E.W.; SMITH, G.W. Mechanism associated with corpus luteum development. *Journal of Animal Science*, v.72, p.1857-1872, 1994.

SIQUEIRA, L.G.B. Uso da análise computacional de imagens ultra-sonográficas na avaliação da função luteal em bovinos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 119p., 2007.

SQUIRES, E.J. *Applied Animal Endocrinology*. Oxon, UK: CABI Publishing, 252p, 2003.

STUBBINGS, R.B.; BOSU, W.T.K.; BARKER, C.A.V.; KING, G.J. Serum progesterone concentrations associated with superovulation and premature corpus luteum failure in dairy goats. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.50, p. 369-373, 1986.

SWENSON, M.J., REECE, W.O. *Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos*. 856p., 1996.

TOM, J.W.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. *Theriogenology*, v.49, p.1345-1352, 1998.

VERONESI, M.C.; GABAI, G.; BATTOCCHIO, M.; MOLLO, A.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Ultrasonographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows. *Theriogenology*, v.58, p.61-68, 2002.

VIANA, J.H.M. *Avaliação ultra-sonográfica de estruturas ovarianas em doadoras e receptoras de embrião*. 1996. 120f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

VIÑALES, C. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Doctoral thesis – Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 56p., 2003.

VIÑALES, C.; MEIKLE, A.; FORSBERG, M. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. *Animal Reproduction Science*, v.80, p.69-79, 2004.

WEBB, R.; WOAD, K.J.; ARMSTRONG, D.G. Corpus luteum: local control mechanisms. *Domestic Animal Endocrinology*, v.23, p.277-285, 2002.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *Journal Animal Science*. v.82, E63-E74, 2004.

CAPÍTULO 1
DINÂMICA LUTEAL EM CAPRINOS DA RAÇA TOGGENBURG:
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E ENDÓCRINAS

RESUMO

O crescimento da caprinocultura no Brasil tem resultado no aumento na utilização de biotecnologias da reprodução nesta espécie. O desenvolvimento destas biotécnicas, contudo, requer uma base de conhecimentos sobre fisiologia ovariana, ainda limitada em pequenos ruminantes, particularmente considerando-se o existente na espécie bovina. Objetivou-se no presente estudo estabelecer características morfológicas e endócrinas da dinâmica luteal em cabras Toggenburg. Foram utilizadas fêmeas nulíparas ($n=21$) com idade média de 8 meses, peso médio de $33,52\pm 1,22$ Kg e escore de condição corporal médio de $3,5\pm 0,07$, e que manifestaram estro natural durante um período de 48 horas, no início da estação de acasalamento natural. Após a manifestação do estro (dia 0) e cobertura destas fêmeas, foram realizadas avaliações ultra-sonográficas dos ovários a cada 24 horas durante 21 dias. Para isso, foi utilizado um aparelho portátil (Aloka SSD 500, Aloka Co, Japão) acoplado a um transdutor linear de 5 MHz, adaptado para uso transretal. O diâmetro do CL foi mensurado diariamente após a sua primeira visualização utilizando recursos do próprio aparelho. Antes de cada avaliação ultra-sonográfica foi coletada uma amostra de sangue para posterior dosagem de P_4 plasmática por RIA. Os corpos lúteos foram detectados pela primeira vez no dia $5,00\pm 0,19$ após o estro, com área média de $0,63\pm 0,07$ cm^2 e aumentaram progressivamente de tamanho ($P<0,001$) até o 9º dia do ciclo, quando atingiram uma área máxima de $1,26\pm 0,08$ cm^2 , não havendo variação nos dias subseqüentes ($P>0,05$). Nas fêmeas com apenas uma ovulação a primeira visualização do CL foi mais precoce do que nas fêmeas com ovulação múltipla ($4,54\pm 0,18$ vs $5,74\pm 0,25$ dias, $P<0,05$). No momento da primeira visualização a área luteal foi menor nos animais com uma ovulação ($0,56\pm 0,06$ vs $0,83\pm 0,11$ cm^2 , $P<0,05$). Assim como a área de tecido luteal, a concentração plasmática de P_4 aumentou progressivamente até o 9º dia do ciclo, não apresentando aumento significativo até o momento da luteólise. O processo de luteólise foi caracterizado por uma acentuada queda da concentração plasmática de P_4 , que atingiu valores inferiores a 1 ng/mL cerca de 24hs após o início da luteólise. Diferentemente, a área de tecido luteal diminuiu de forma bem mais lenta e gradual. Foi observada uma correlação significativa ($P<0,05$) entre a área de tecido luteal e a concentração plasmática de P_4 durante o processo de luteogênese e de luteólise ($r=0,63$ e $r=0,50$, respectivamente). No dia em que o CL atinge sua área máxima (D9) as fêmeas com mais de um CL, portanto com uma maior área de tecido luteal ($1,10\pm 0,04$ vs $1,63\pm 0,14$ cm^2 , $P>0,05$), não apresentaram uma concentração plasmática de P_4 maior do que aquelas com apenas uma ovulação ($5,92\pm 0,59$ vs $7,04\pm 0,79$ ng/mL; $P>0,05$). Esses resultados demonstram que (1) apesar das limitações inerentes ao exame ultra-sonográfico em pequenos ruminantes, a detecção do tecido luteal pode ser feita no terço inicial do ciclo; (2) o crescimento de tecido luteal refletiu positivamente sobre a concentração plasmática de P_4 , (3) contudo a concentração plasmática máxima de P_4 não está diretamente relacionada ao número de CL no ovário. Estas características demonstram que a dinâmica luteal em caprinos da raça Toggenburg segue padrões semelhantes aos observados em outras raças e em outras espécies.

Palavras chaves: Dinâmica luteal, caprinos, progesterona, ultra-sonografia

ABSTRACT

With the increase of the goat industry in Brazil, and therefore an increase of the assisted reproduction programs, there is a greater need for research on goat reproduction, that present a delay in relation to others domestic ruminants. The aim of this study was to establish the morphological and endocrine characteristics of luteal dynamics in Toggenburg goats. Nulliparous females (n=21) with an average age of 8 months, weight 33.52 ± 1.22 Kg and 3.5 ± 0.07 body condition score, with natural estrus in a 48 hours interval in the beginning of breeding season were used. After estrus identification (day 0) and mating, sonographic evaluations of the ovaries were performed with 24hrs intervals after estrus during 21 days. A portable ultrasound device (Aloka SSD 500, Aloka Co, Japan.) equipped with an adapted linear rectal 5MHz probe to rectal evaluation was used. During this period, CL diameter was daily measured after its first visualization using the equipment calipers. Just before each sonographic evaluation a blood sample was collected for progesterone determination by radioimmunoassay. For the establishment of luteal dynamics until day 15 were used data of all animals (n=21), and between day 16 and 21 were used only the data of nonpregnant animals. Corpora lutea were first visualized on day 5.00 ± 0.19 with a average area of 0.63 ± 0.07 cm², and progressively increased in size (P<0.001) until the day 9, when reached a maximum area of 1.26 ± 0.08 cm², there was no significant increase on subsequent days (P>0.05). The CL of animals with single ovulation was first visualized earlier than in animals with multiple ovulation (4.54 ± 0.18 vs 5.74 ± 0.25 days, P<0.05). In the day of the first visualization luteal tissue area was smaller in animals with single ovulation (0.56 ± 0.06 vs 0.83 ± 0.11 cm², P<0.05). Plasma progesterone also increased until day 9 and no significant increase was observed until luteolysis. The luteolysis process was characterized by an abrupt decrease in progesterone level, that reached values below 1 ng/mL about 24 hours after the beginning of the process. In contrast, the luteal area decreased in size slowly and gradually. A significant correlation between progesterone levels and luteal area was observed during the processes of luteogenesis and luteolysis (r=0.63 and r=0.50, respectively). When CL reach its maximum size (day 9) females with more than one ovulation, therefore with a greater luteal area (1.10 ± 0.04 vs 1.63 ± 0.14 cm², P>0.05), didn't have a greater progesterone level when compared to animals with single ovulation (5.92 ± 0.59 vs 7.04 ± 0.79 ng/mL, P>0.05). These results showed that (1) despite of the limitations of the ultrasonographic exam in small ruminants, the detection of the luteal tissue could be early performed; (2) luteal growth was positively correlated with plasma progesterone level, (3) however, the maximum progesterone level is not related to the number of CL in the ovary. These characteristics showed that the luteal dynamics in Toggenburg goats has a similar pattern observed in others goats breeds and even other species.

Key words: Luteal dynamics, goats, progesterone, ultrasonography

1 INTRODUÇÃO

O CL é uma glândula endócrina transitória responsável pela síntese e liberação da P₄, um hormônio esteróide essencial para o desenvolvimento embrionário inicial e para a manutenção da gestação, em especial nos caprinos que dependem exclusivamente da P₄ de origem luteal para levar a gestação a termo (SMITH *et al.*, 1994; McCracken *et al.*, 1999).

A existência de uma correlação positiva entre a área de tecido luteal e a concentração plasmática de P₄ foi descrita anteriormente na espécie bovina (SIQUEIRA, 2007), ovina (DAVIES *et al.*, 2006) e caprina (ORITA *et al.*, 2000). Entretanto, o aumento no número de CLs de bovinos não está necessariamente associado a uma elevação nas concentrações plasmáticas de P₄ (MANN *et al.*, 2007). Diferenças na concentração máxima de progesterona de cabras e ovelhas foram observadas em função da raça (BARTLEWSKI *et al.*, 1999; FONSECA e TORRES, 2005).

Anteriormente, o estudo da função ovariana em pequenos ruminantes era realizado por meio de técnicas cirúrgicas, como a laparotomia e a laparoscopia (CAMP *et al.*, 1983). Estes procedimentos cirúrgicos, também realizados para a coleta e transferência de embriões, tornam-se inadequados a médio e longo prazo, pois quase sempre levam à formação de aderências pós-operatórias (GONÇALVES, 2001).

A adaptação ultra-sonografia por via transretal para pequenos ruminantes marcou a década de 90. A partir deste momento, importantes estudos foram realizados na área de fisiologia ovariana (SCHIRICK *et al.*, 1993; GINTHER e KNOT, 1994; GINTHER *et al.*, 1995; De CASTRO *et al.*, 1999;

DICKIE *et al.*, 1999). Estudos demonstram que a ultra-sonografia por via transretal permite identificar as estruturas ovarianas com uma sensibilidade e especificidade semelhante às observadas nas técnicas cirúrgicas (VIÑALES *et al.*, 2004; SIMÕES *et al.*, 2005). Estes resultados demonstram que a ultra-sonografia tornou-se uma ferramenta fundamental para os estudos envolvendo a função reprodutiva.

O objetivo deste estudo foi caracterizar a dinâmica luteal em cabras da raça Toggenburg utilizando a ultra-sonografia transretal de forma seriada ao longo do ciclo estral, correlacionado as alterações morfológicas observadas no CL com a concentração plasmática de P_4 .

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL, PERÍODO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

O experimento foi conduzido em uma granja de caprinos leiteiros localizada no município de Coronel Pacheco, na Zona da Mata mineira (21° 35' S, 43° 15' W, 435 metros de altitude), durante o início da estação reprodutiva (entre março e abril de 2007; outono). Segundo a classificação de Köppen o clima da região onde foi conduzido o experimento é do tipo Cwa, caracterizado por invernos secos e verões chuvosos, sendo a temperatura média anual entre 18,0°C a 23,0°C e precipitação pluviométrica anual de 2000 a 2600mm³. Dentro do galpão onde os animais eram mantidos, foi colocado um termômetro para a mensuração da temperatura ambiente máxima e mínima, e um termohigrômetro para a mensuração da umidade relativa do ar. Na Tabela 1 é possível observar os dados climatológicos de controle obtidos.

Tabela 1 Dados de controle climatológicos obtidos durante o período experimental (média ± desvio padrão).

Dados climatológicos	Valor
Temperatura ambiente média máxima	27,4 ± 2,2 °C
Temperatura ambiente média mínima	23,7 ± 2,5 °C
Umidade relativa do ar (média)	79,3 ± 12,7 %

2.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas 23 cabras nulíparas (*Capra hircus*) da raça Toggenburg com idade média de oito meses, com média de peso vivo de $33,52 \pm 1,22$ Kg e escore de condição corporal de $3,52 \pm 0,07$ (escala de 1 – muito magra; a 5 – muito gorda; SUITER, 1994). Duas fêmeas foram descartadas por apresentarem cistos foliculares. Os animais selecionados manifestaram estro natural, detectado com auxílio de um rufião, dentro de um intervalo de 48 horas, e não apresentavam patologias reprodutivas detectáveis à ultrasonografia e vaginoscopia. Após a detecção do estro, todas as fêmeas foram cobertas por um bode sexualmente maduro duas vezes ao dia até não aceitarem mais a aproximação do macho. Para as coberturas foram utilizados três machos diferentes, os acasalamentos foram determinados pelos proprietários da granja. Dos animais, 14 ficaram gestantes e sete permaneceram vazias, duas fêmeas foram descartadas após a detecção da presença de cistos foliculares.

Os animais foram mantidos em sistema de confinamento total em baias coletivas, alimentados no cocho com capim Napier (*Pennisetum purpureum v. Taiwan*) picado e concentrado formulado e misturado na própria granja (ANEXO 2). Água e sal mineral (Salminas Caprinos®, ANEXO 3) foram fornecidos *ad libitum*.

2.3 AVALIAÇÕES ULTRA-SONOGRÁFICAS OVARIANAS

Para a realização das avaliações ultra-sonográficas dos ovários foi utilizado um aparelho portátil (Aloka SSD 500®, Aloka Co. Japão) acoplado a um transdutor linear de 5 MHz adaptado para uso transretal em pequenos ruminantes. Esta adaptação consistia na fixação de duas hastes rígidas ao cabo do transdutor, o que permitiu a movimentação do mesmo no interior do reto. Estas avaliações foram realizadas sempre pelo mesmo operador e no mesmo período do dia. O ganho proximal, distal e total (22, 2.2 e 82, respectivamente); assim como a área de foco do aparelho foram padronizados

(F1 e F2), não sendo alterados durante todo o período experimental. Antes da avaliação as cabras eram contidas em um tronco próprio. Em seguida, as fezes eram retiradas manualmente da ampola retal e, com o auxílio de uma seringa de 60mL, eram depositados entre 5 a 10mL de gel (Carbogel[®]) para facilitar a transmissão das ondas ultra-sônicas.

As avaliações dos ovários tiveram início no momento da detecção do estro (D0) e foram realizadas durante 21 dias consecutivos (D21) com intervalos de 24 horas. No D0 foi localizado e mensurado o(s) folículo(s) dominante(s) (FD). O FD foi avaliado e mensurado diariamente até o momento da ovulação. O dia da ovulação foi considerado como sendo o momento em que o FD anteriormente identificado não estava mais presente. A última medida do diâmetro do FD foi considerada como sendo o diâmetro ovulatório. Após a ovulação, as avaliações subseqüentes (D0 até D21) visaram acompanhar o período de luteogênese e posterior luteólise no caso das fêmeas não gestantes. Durante estes períodos, imagens correspondentes à secção transversal do CL, em seu maior diâmetro, foram geradas diariamente para a mensuração de sua área e posterior análise de ecotextura.

A área de tecido luteal (cm²) foi mensurada utilizando-se dispositivos do próprio equipamento, considerada como sendo a diferença entre a área luteal total, menos a área da cavidade, quando presente. Naqueles animais que apresentaram dupla (n=7) ou tripla ovulação (n=1), a área luteal considerada para cada dia do ciclo foi a soma das áreas dos dois ou três corpos lúteos, respectivamente.

A área luteal, o diâmetro folicular, assim como a localização das estruturas ovarianas foram anotadas em fichas próprias (ANEXO 4).

2.4 COLETA DE SANGUE E DOSAGEM PLASMÁTICA DE P₄

Antes de cada avaliação ultra-sonográfica, uma amostra de sangue foi coletada para posterior determinação da concentração plasmática de progesterona. A coleta foi realizada através da punção da veia jugular utilizando tubos de 5mL com vácuo contendo anticoagulante (EDTA). O local

da punção era higienizado com algodão embebido em álcool 70% antes de cada coleta, havendo também uma alternância entre as veias jugulares direita e esquerda. Após a coleta as amostras foram acondicionadas em recipiente isotérmico (5°C) e imediatamente levadas ao laboratório para o processamento. As amostras foram centrifugadas sob refrigeração (5°C) a 894 x g por 20 minutos para a separação do plasma, sendo este acondicionado a – 20°C até o momento da determinação da concentração plasmática de progesterona.

As análises da concentração plasmática de progesterona foram realizadas em aparelho de radioimunoensaio de fase sólida utilizando-se kits comerciais de análise por I^{125} (Coat-a-Count[®], Medlab), no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp (matrícula CNEN 14542).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis peso corporal, área do corpo lúteo, área de tecido luteal (corrigida para a presença de cavidades no CL), progesterona plasmática, valores médios de pixel e heterogeneidade dos pixels foram testadas para normalidade (Teste Lilliefors) e homogeneidade das variâncias (Teste Cochran e Bartlett). Os valores diários mensurados da área luteal e da concentração plasmática de progesterona foram avaliados em função do dia do ciclo, por análise de variância (ANOVA), e diferenças entre médias foram determinadas pelo teste de Tukey. Os períodos de luteogênese e luteólise foram determinados em função da presença de variações significativas na área luteal e concentração de progesterona. As correlações entre as variáveis mensuradas foram estabelecidas através da correlação de Pearson. As análises foram realizadas utilizando-se o SAEG – Sistema de Análises Estatísticas (SAEG, 2007).

Para a determinação do efeito do dia do ciclo sobre a concentração plasmática de P_4 e a área luteal durante o período de luteogênese e luteólise, assim como as correlações feitas durante estes períodos, foram considerados

os dados de todos os animais (n=21) até o 15º dia do ciclo estral. Para as mesmas análises realizadas durante o período de luteólise foram consideradas somente os dados das fêmeas que não ficaram gestantes (n=7) a partir do 16º dia do ciclo.

Para as avaliações durante o período de luteólise os dados foram centralizados em função do início do processo de luteólise, momento considerado como sendo o dia do ciclo em que o valor de progesterona atingiu valores inferiores a 1ng/mL.

3 RESULTADOS

3.1 CICLO ESTRAL

Dos 21 animais utilizados no experimento, 66,7% (14/21) ficaram gestantes. Nos sete animais restantes, a duração do ciclo estral apresentou uma duração média de $20,5 \pm 0,45$ dias. Foram observadas cabras com uma única ovulação (n=13), dupla ovulação (n=7) e três ovulações (n=1).

3.2 FOLÍCULOS OVULATÓRIOS

No dia do estro (dia 0) 93% (28/30) dos folículos ovulatórios foram observados com auxílio da ultra-sonografia por via trans-retal, sendo a ovulação confirmada pelo desaparecimento dos folículos maiores que 5mm em um intervalo de 48 horas após a detecção do estro e posterior identificação do CL. A presença dos dois folículos ovulatórios que não foram observados no dia 0 foi confirmada através da observação do CL nas avaliações subsequentes.

O diâmetro médio dos folículos ovulatórios foi de $7,4 \pm 0,1$ mm, não sendo observada uma correlação entre o diâmetro do folículo ovulatório e a área de tecido luteal no 9º dia do ciclo, momento em que o CL e a P_4 atingiram seus valores máximos ($r=0,26$; $P>0,05$).

3.3 DINÂMICA LUTEAL

A primeira identificação do CL ocorreu, em média, no 5º dia do ciclo estral. A identificação do CL foi mais precoce nas fêmeas com apenas uma ovulação, embora apresentassem uma área luteal menor quando comparadas as fêmeas com múltiplas ovulações (Tabela 2). Entretanto, considerando individualmente cada CL (i.e., sem somar as áreas dos CLs nos animais com mais de uma ovulação), não foi observada diferença na área do CL no momento da primeira identificação dos animais com uma ou múltiplas ovulações ($0,56 \pm 0,06$ e $0,53 \pm 0,05$ cm², respectivamente; $P > 0,05$). A partir do sexto dia do ciclo, todos os CL já haviam sido identificados.

Tabela 2 Dia e área (cm²) de tecido luteal no momento da primeira identificação do CL em cabras com uma ou múltiplas ovulações (média ± erro padrão)

Nº de ovulações	Dia da 1ª identificação (dias)	Área luteal no dia da 1ª identificação (cm ²)*
1 (n=13)	4,54 ± 0,18 ^b	0,56 ± 0,06 ^b
≥2 (n=08)	5,74 ± 0,25 ^a	0,83 ± 0,11 ^a
MÉDIA (n=21)	5,00 ± 0,19	0,63 ± 0,07

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($P < 0,05$; ANOVA).

* Para os animais com mais de uma ovulação a área luteal corresponde a soma das áreas de todos os CL presentes nos ovários.

A partir da primeira identificação do CL, foi observado um efeito do dia do ciclo sobre a área do CL, que mensurada no corte transversal em seu maior diâmetro aumentou progressivamente até o 9º dia do ciclo estral, não apresentado aumento significativo nos dias subseqüentes (Tabela 3).

Tabela 3 Área luteal durante o período de desenvolvimento do CL (média±erro padrão)

Dia do Ciclo Estral	Área do CL (cm ²)	Comparações a 5%
4 (n=06)	0,45±0,04	D
5 (n=15)	0,62±0,05	D
6 (n=20)	0,85±0,07	CD
7 (n=19)	0,99±0,06	BCD
8 (n=19)	1,05±0,09	BCD
9 (n=18)	1,26±0,08	ABC
10 (n=18)	1,40±0,08	AB
11 (n=20)	1,52±0,08	A
12 (n=20)	1,58±0,09	A
13 (n=21)	1,62±0,09	A
14 (n=21)	1,64±0,09	A
15 (n=21)	1,65±0,02	A

^{A,B,C,D} Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05, Tukey)

A partir do 18º dia do ciclo foi observada uma redução não significativa na área de tecido luteal (Tabela 4).

Tabela 4 Área de tecido luteal durante a fase final do ciclo estral das fêmeas não gestantes após a normalização para o momento da luteólise natural (Hora 0) (média±desvio padrão)

Horas em relação a luteólise (0=início da luteólise)	Área do CL (cm ²)	Comparações a 5%
-48 (n=6)	1,56±0,12	A
-24 (n=6)	1,57±0,11	A
0 (n=7)	1,52±0,11	A
24 (n=7)	1,36±0,12	A
48 (n=7)	1,15±0,11	A
72 (n=3)	1,01±0,21	A

^A Médias seguidas de letras semelhantes, na mesma coluna, não diferem (P>0,05; Tukey)

Dos 30 corpos lúteos formados, 25 (83%) apresentaram uma cavidade central anecóica. No dia da primeira detecção, apresentaram uma área média de 0,29±0,20 cm², correspondendo a 45,31% da área total do CL. Estas cavidades regrediram (P<0,01) progressivamente de tamanho até o dia 11 do

ciclo, quando atingiram uma área inferior a 0,1 cm²; correspondendo a menos que 7% da área total do CL

3.4 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE P₄

Assim como ocorreu com a área de tecido luteal, foi observado um efeito do dia do ciclo sobre a concentração plasmática de P₄. Na Tabela 5 é possível visualizar que a concentração plasmática de P₄ aumentou progressivamente até o 9º dia do ciclo estral, não havendo aumento significativo nos dias subsequentes.

Tabela 5 Concentração plasmática de P₄ (média±erro padrão) durante o período de luteogênese

Dia do Ciclo Estral	Concentração Plasmática de P ₄ (ng/mL)	Comparações a 5%
2 (n=21)	0,33±0,05	I
3 (n=21)	1,57±0,29	HI
4 (n=19)	3,44±0,49	GH
5 (n=21)	3,52±0,19	GH
6 (n=21)	4,40±0,22	FG
7 (n=21)	4,71±0,29	EFG
8 (n=19)	5,23±0,22	DEFG
9 (n=20)	6,31±0,46	ABCDEF
10 (n=19)	5,85±0,42	ABCDEFG
11 (n=20)	6,43±0,49	ABCDEF
12 (n=21)	6,93±0,37	ABCDE
13 (n=21)	7,98±0,42	AB
14 (n=21)	8,32±0,40	A
15 (n=21)	7,89±0,46	ABC

A,B, C, D, E, F, G, H, I Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05; Tukey)

Considerando apenas os dados dos animais que não ficaram gestantes, foi possível observar uma queda acentuada na concentração plasmática de P₄ (valores inferiores a 1ng/mL) no final do ciclo, caracterizando o início do processo de luteólise natural (Tabela 6).

Tabela 6 Concentração plasmática de P₄ (média±erro padrão) das fêmeas não gestantes após a normalização para o momento da luteólise natural (Hora 0)

Horas em relação a luteólise (0=início da luteólise)	Concentração Plasmática de P ₄ (ng/mL)	Comparações a 5%
-48 (n=6)	6,91±0,91	A
-24 (n=6)	7,75±0,70	A
0 (n=7)	5,49±0,84	A
24 (n=7)	0,42±0,16	B
48 (n=7)	0,11±0,02	B
72 (n=3)	0,06±0,01	B

^{A,B} Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05; Tukey)

Durante o período de luteogênese foi possível verificar que o aumento progressivo da área de tecido luteal foi acompanhado por uma crescente elevação na concentração plasmática de P₄ (Figura 1), sendo observada uma correlação positiva entre estas duas variáveis (r=0,63; P<0,05).

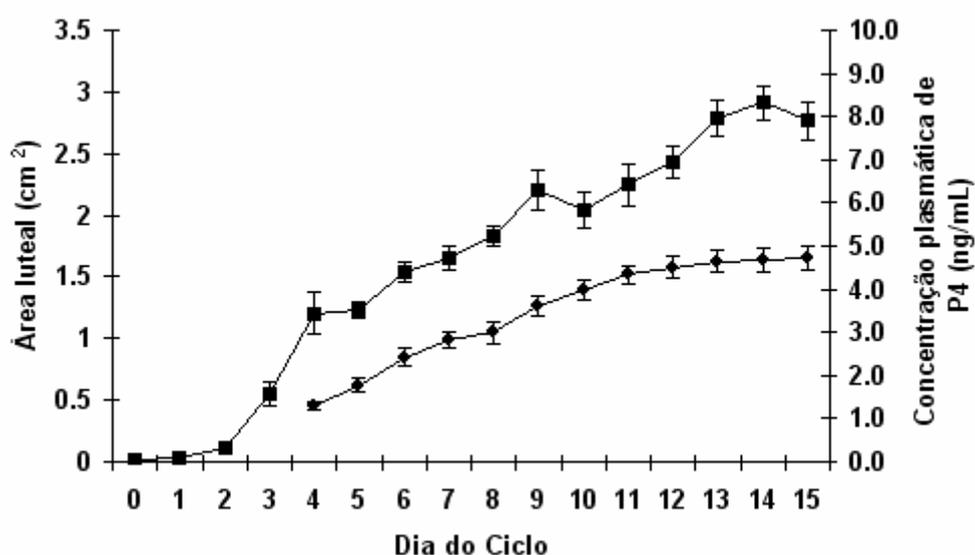


Figura 1 Valores médios da área luteal (●) e da concentração plasmática de P₄ (■) durante o período de luteogênese.

Durante o período de luteólise também foi possível estabelecer uma correlação positiva entre a área de tecido luteal e a concentração plasmática de P₄ (r=0,50; P<0,05). No entanto, percebe-se que a partir do início do processo

de luteólise a queda na concentração de P₄ foi mais acentuada e abrupta do que a observada na área do CL (Figura 2).

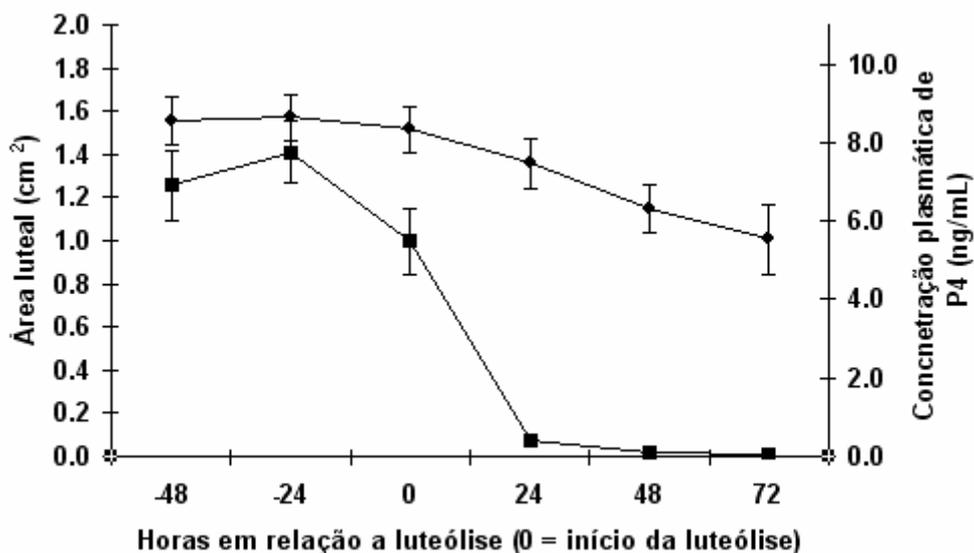


Figura 2 Valores médios da área luteal (●) e da concentração plasmática de P₄ (■) durante o período de luteólise

No momento em que o CL atingiu sua área máxima, os animais com múltiplas ovulações apresentaram uma área de tecido luteal maior do que as fêmeas com uma única ovulação. Contudo, essa maior área não resultou em uma maior concentração plasmática de progesterona (Tabela 7).

Tabela 7 Área de tecido luteal e concentração plasmática de P₄ (média±erro padrão) no momento do ciclo em que atingiu sua área máxima (D9)

Número de ovulação	Área do CL no D9 (cm ²)*	Concentração plasmática de P ₄ no D9 (ng/mL)
1 (n=13)	1,10±0,04 ^b	5,92±0,59 ^a
≥2 (n=06)	1,63±0,14 ^a	7,04±0,79 ^a

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05, ANOVA).

* Para os animais com mais de uma ovulação a área luteal corresponde a soma das áreas de todos os CL presentes nos ovários.

No dia em que a concentração plasmática de P₄ e a área luteal atingem seus valores máximos (D9), não foi observada diferença (P>0,05) nestas variáveis entre animais gestantes e não-gestantes (Figura 3). Nas fêmeas gestantes, a concentração plasmática de P₄ se manteve elevada até o final do período experimental. Nos animais que não ficaram gestantes a concentração

plasmática do esteróide caiu de forma abrupta, atingindo valores inferiores a 1ng/mL 24 horas após o início da luteólise (Figura 4).

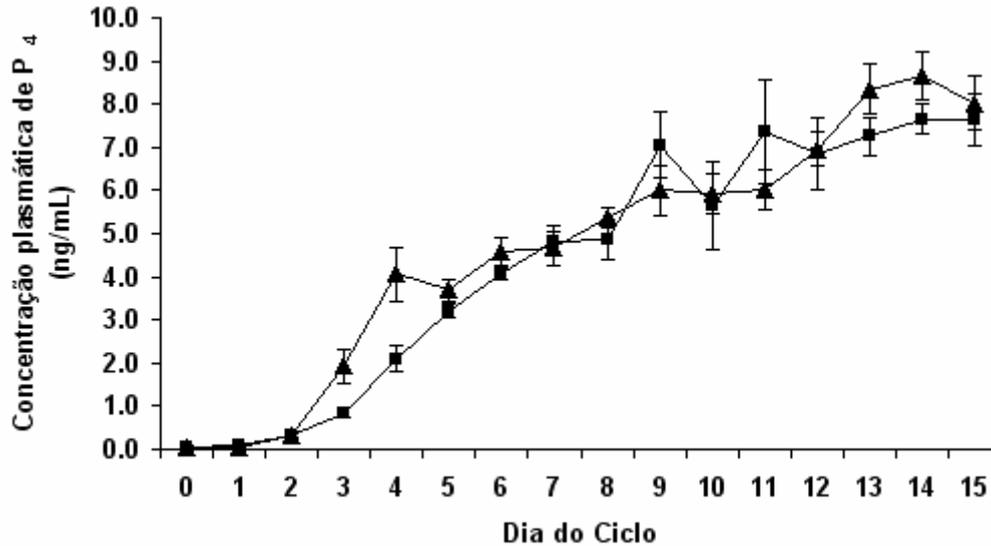


Figura 3 Média da concentração plasmática de P₄ de animais gestantes (▲) e não-gestantes (■) durante o período de luteogênese.

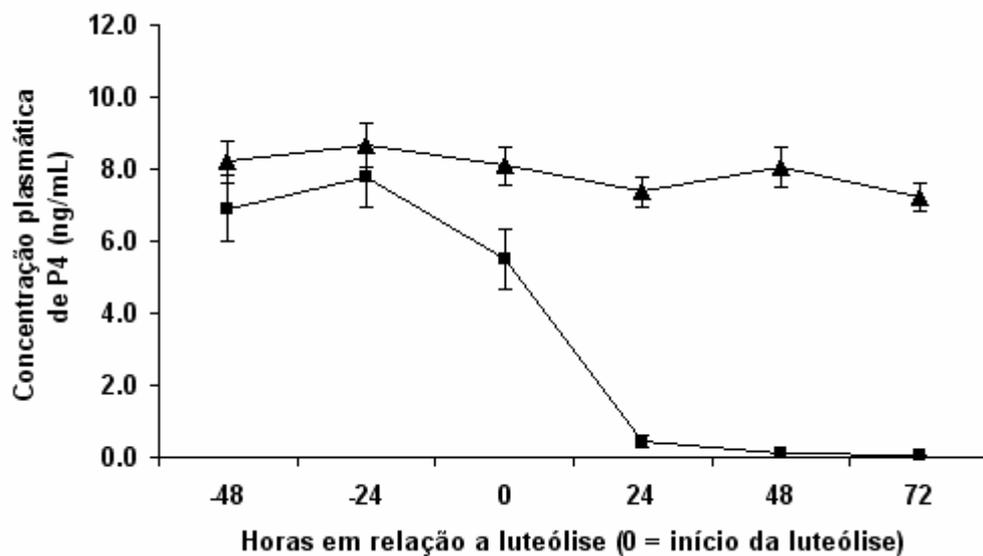


Figura 4 Média da concentração plasmática de P₄ de animais gestantes (▲) e não-gestantes (■) durante o período de luteólise.

4 DISCUSSÃO

Em virtude de sua sazonalidade, é comum a cabra apresentar ciclos curtos durante o período de transição, fase compreendida entre a estação de anestro e reprodutiva (CAMP *et al.*, 1983). Embora o experimento tenha sido conduzido logo no início da estação reprodutiva, a duração média do ciclo estral observada no presente estudo ($20,5 \pm 0,45$ dias) esteve dentro do intervalo de 19 a 24 dias, valores considerados fisiológicos para a espécie em estudo (de CASTRO *et al.*, 1999; MENCHACA & RUBIANES, 2002).

O diâmetro do folículo ovulatório observado no presente estudo ($7,4 \pm 0,7$ mm) foi semelhante aos valores descritos na literatura. Maffili *et al.* (2006) também trabalhando com cabras da raça Toggenburg, observaram que os folículos ovulatórios apresentaram um diâmetro médio de $7,7 \pm 1,3$ mm. Resultados semelhantes foram observados em outras raças estudadas por Simões *et al.* (2006) (Serrana: $7,1 \pm 0,1$ mm), Medan *et al.* (2005) (Shiba: $7,8 \pm 0,2$ mm) e Maffili *et al.* (2005) (Saanen: $6,9 \pm 1,8$ mm).

A ultra-sonografia é considerada uma ferramenta eficiente para a identificação dos folículos ovarianos. Em ovinos, Viñoles *et al.* (2004) reportaram que a ultra-sonografia transretal com transdutor de 7,5 MHz apresentou uma sensibilidade de 90-95% para a identificação de folículos ovarianos com diferentes diâmetros, e que este valor foi menor para folículos com 3 e 2 mm de diâmetro (71% e 62%, respectivamente). Em outro estudo com ovinos, 96% (23/24) das ovulações foram identificadas através da ultra-sonografia transretal (7,5MHz), sendo confirmadas posteriormente através de métodos cirúrgicos (DUGGAVATHI *et al.*, 2003). Desta forma, os dados obtidos

neste experimento demonstram que em caprinos resultados semelhantes (93% - 28/30) podem ser obtidos utilizando um transdutor de 5MHz.

Como o CL é formado a partir do folículo ovulatório, é de se esperar que a área do CL esteja diretamente associada ao diâmetro do folículo ovulatório. Estudos anteriores em bovinos (VASCONCELOS *et al.*, 2001; SIQUEIRA, 2007) e em ovinos (BARTLEWSKI *et al.*, 1999) demonstraram uma correlação positiva entre o diâmetro do folículo ovulatório e a área ou volume do CL formado após a ovulação. No presente estudo, quando o CL atingiu sua área máxima, não foi observada uma correlação significativa entre o diâmetro do folículo ovulatório e a área de tecido luteal ($r=0,26$, $P>0,05$). A homogeneidade do grupo experimental, constituído apenas de cabras nulíparas de peso, idade e condição corporais semelhantes, resultou em um baixo coeficiente de variação (CV) para o parâmetro diâmetro do folículo ovulatório (10%). A pequena amplitude da variável pode ter comprometido a identificação da correlação com o tamanho do CL, que talvez possa ser melhor demonstrada utilizando-se animais de categorias ou estádios fisiológicos diferentes.

A presença de cavidade luteal foi um achado bastante freqüente neste experimento, 83% (25/30) dos CL apresentaram uma cavidade central anecóica. A luteinização do folículo ovulatório é um processo que ocorre de fora para dentro. Quando esse processo não é completo forma-se a cavidade luteal, uma estrutura localizada no centro do CL preenchida por um transudato seroso límpido (SINGH *et al.*, 1997).

Estudos anteriores relataram uma elevada freqüência de CL com cavidades em caprinos (SIMÕES *et al.*, 2005 – 65%; SIMÕES *et al.*, 2007 – 78%), ovinos (DICKIE *et al.*, 1999 – 12 a 68%; GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2000 – 33,3%) e bovinos (KASTELIC *et al.*, 1990 – 79%; SINGH *et al.*, 1997 – 72%; SIQUEIRA, 2007 – 66%). Apesar de ser bastante freqüente, não há correlação entre a existência destas cavidades com o comprimento do ciclo estral ou com a concentração plasmática de P_4 ao longo do ciclo, portanto sem uma aparente importância do ponto de vista funcional (KASTELIC *et al.*, 1990, GOLZALEZ-BULNES *et al.*, 2000). Contudo, do ponto de vista prático, Viñoles *et al.* (2004) reportam que durante a fase inicial do ciclo um CL com uma

grande cavidade central pode ser confundido com um folículo ovariano, o que pode dificultar ou atrasar a correta identificação do CL. Entretanto, como em caprinos não é possível ter acesso aos órgãos reprodutivos pela palpação transretal, a existência de uma cavidade anecóica no CL facilita a correta localização e visualização dos ovários quando se utiliza a ultra-sonografia.

Diversos estudos demonstraram que a primeira detecção do CL em caprinos pode ser realizada entre o segundo e o terceiro dia do ciclo (ORITA *et al.*, 2000; RIESEMBERG *et al.*, 2001; MEDAN *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2007). No presente estudo a primeira visualização foi mais tardia (5º dia do ciclo), entretanto o transdutor utilizado nos outros estudos apresentava uma frequência maior (7,5MHz), o que poderia justificar esta diferença.

Dickie *et al.* (1999) e Viñoles *et al.* (2004) relataram uma maior dificuldade na identificação do CL em ovários de ovelhas com múltiplas ovulações, observando uma menor sensibilidade da avaliação ultra-sonográfica nestes casos. No presente estudo, a primeira visualização do CL foi mais precoce naqueles animais com apenas uma ovulação, embora apresentassem uma área luteal menor. Entretanto, considerando individualmente cada CL, não foi observada diferença na área de cada CL dos animais com uma ou múltiplas ovulações no momento da primeira visualização ($0,56 \pm 0,06$ e $0,53 \pm 0,05$ cm², respectivamente; $P > 0,05$). Das cabras que tiveram mais de uma ovulação (n=8), somente em uma as ovulações ocorreram em ovários distintos. Portanto, acredita-se que a presença de mais de um CL em um mesmo ovário dificultou a distinção entre os mesmos, o que provavelmente resultou em uma identificação mais tardia.

Em ovinos, Viñoles *et al.* (2004) demonstraram que a identificação do CL utilizando a ultra-sonografia por via transretal possui uma sensibilidade de 96% (26/27), obtendo apenas um resultado falso-negativo confirmado posteriormente no exame *post-mortem*. Simões *et al.* (2005) compararam a eficiência de três técnicas diferentes (ultra-sonografia transretal, laparotomia e laparoscopia) para a identificação do CL em caprinos, e não observaram diferença estatística (91,7%; 87,5%; 83,3%; respectivamente). Assim, os resultados obtidos demonstram que a ultra-sonografia por via trans-retal

consiste em uma excelente ferramenta para a identificação do CL, podendo inclusive substituir as técnicas invasivas utilizadas em pequenos ruminantes (laparotomia e laparoscopia) em situações em que a identificação da presença e posição do CL são fundamentais como, por exemplo, na triagem de receptoras de embrião.

Assim como em bovinos, os procedimentos para a coleta e transferência de embriões em caprinos ocorrem por volta do sétimo dia do ciclo estral (GONÇALVES, 2001). Com isso, pode-se dizer que a ultra-sonografia consiste em uma técnica auxiliar adequada e eficiente para a avaliação das doadoras e receptoras de embriões no momento programado para a coleta ou transferência, respectivamente. Em pequenos ruminantes, como a coleta e transferência dos embriões são, em sua grande maioria, realizados por via cirúrgica, o uso da ultra-sonografia tornaria o procedimento mais prático e rápido, uma vez que não haveria a necessidade da localização dos ovários e posterior identificação de um possível CL. Além disso, evitaria procedimentos cirúrgicos desnecessários caso não haja resposta superovulatória por parte da doadora, ou a receptora não esteja apta a receber um embrião, ou seja, não apresente um CL característico.

Gonzalez-Bulnes *et al.* (2002) utilizando um protocolo de superovulação associado um tratamento prévio com progestágeno durante 14 dias (esponja impregnada com FGA) em ovinos, observaram que a presença de um CL durante todo o período do tratamento diminuiu a taxa de embriões degenerados, elevando conseqüentemente o número de embriões viáveis. Estes resultados demonstram que uma correta e precisa identificação do CL é importante para se obter bons resultados nos programas de TE.

No presente estudo, o CL cresceu progressivamente até o 9º dia do ciclo ($1,26 \pm 0,08 \text{ cm}^2$ – Tabela 3), demonstrando a intensa proliferação celular observada durante o período de luteogênese (SMITH *et al.*, 1994). Camp *et al.* (1983), através da laparoscopia, observaram que em cabras Anglo Nubiana o CL atingiu seu diâmetro máximo ($9,4 \pm 0,6 \text{ mm}$) no dia 11 do ciclo, resultado semelhante obtido em cabras Serrana onde o CL atingiu o diâmetro máximo ($12,5 \pm 1,6 \text{ mm}$) no dia $10,7 \pm 3,2$ (SIMÕES *et al.*, 2007). Entretanto, em cabras

Shiba o diâmetro máximo ($12,1 \pm 0,3$ mm) foi atingido mais cedo, sendo observado no 8º dia do ciclo (MEDAN *et al.*, 2003). Portanto, percebe-se que o momento em que o CL atinge sua dimensão máxima no presente experimento ficou dentro de uma variação observada na espécie caprina.

Em relação a P_4 , foi observado um aumento gradual na concentração plasmática desse esteróide até o 9º dia do ciclo, não apresentado aumento significativo até o início da luteólise natural, quando começou a diminuir até atingir valores inferiores a 1ng/mL 24 horas depois (Tabelas 5 e 6). O presente resultado demonstra as transformações bioquímicas ocorridas no CL que permitem a síntese e a liberação da progesterona (SMITH *et al.*, 1994; SANGHA *et al.*, 2002). Assim como as alterações observadas no processo de luteólise, quando o CL perde a capacidade esteroidogênica (luteólise funcional) e inicia o processo de regressão (luteólise estrutural) (McCRACKEN *et al.*, 1999).

Foi observado que a queda na concentração plasmática de P_4 ocorreu de forma mais rápida e abrupta quando comparado com a redução na área de tecido luteal (Figura 2), demonstrando a diferença temporal entre a luteólise funcional e estrutural evidenciada em estudos anteriores em caprinos (SIMÕES *et al.*, 2007) e também em bovinos (VIANA *et al.*, 1999). Segundo Orita *et al.* (2000) a queda na concentração plasmática de P_4 tem início 48 horas antes do CL entrar em processo de regressão estrutural. Esta observação é devida ao fato de que, no mecanismo da luteólise, o primeiro evento observado é a interrupção na esteroidogênese luteal, pelo efeito direto da PGF na via esteroidogênica, e indiretamente, pela redução do fluxo sanguíneo luteal (NISWENDER, 2000), o que resulta na redução da progesterona a valores abaixo de 1,0 ng/mL em apenas 24h (Tabela 6). Já a regressão morfológica envolve o desencadeamento da cascata apoptótica, com a morte, vesiculação e fagocitose das células luteais e substituição parcial do tecido por fibroblastos, com redução gradual e, conseqüentemente, não significativa do volume luteal no mesmo período (Tabela 4).

Em caprinos, estudos anteriores observaram uma correlação positiva entre a área de tecido luteal e a concentração plasmática de P_4 ($r=0,80$; ORITA

et al., 2000), o mesmo ocorrendo na espécie bovina ($r=0,69$; SIQUEIRA, 2007) e ovina ($r=0,59$; DAVIES *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo durante o processo de luteogênese ($r=0,63$; $P<0,05$) e de luteólise ($r=0,50$; $P<0,05$), demonstrando que em cabras da raça Toggenburg o aumento ou a diminuição na área de tecido luteal refletiu diretamente sobre a síntese e liberação do hormônio pelo CL.

Os resultados deste estudo demonstram que a dinâmica luteal de caprinos da raça Toggenburg está associada a um período de crescimento do CL (luteogênese) associado a um aumento da área e da P_4 plasmática, seguido por uma fase de estabilização e, posteriormente, uma regressão onde foi observada uma diminuição na área de tecido luteal e na concentração plasmática de P_4 (luteólise). Esta dinâmica luteal observada está de acordo com as relatadas em estudos anteriores (ORITA *et al.*, 2000; MEDAN *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2007), sendo semelhante também a dinâmica observada em outros ruminantes domésticos como bovinos (SIQUEIRA, 2007) e ovinos (DAVIES *et al.*, 2006).

Embora exista uma importante correlação positiva entre a área de tecido luteal e a concentração plasmática de P_4 durante o período de formação e regressão do CL, os resultados da Tabela 7 mostram que a capacidade fisiológica de síntese e liberação de P_4 não foi superior nos animais com mais de um CL. No momento em que a P_4 atinge seu valor máximo não houve uma correlação significativa entre a área luteal e concentração plasmática de P_4 ($r=0,05$; $P>0,05$). Em bovinos (MANN *et al.*, 2007) e ovinos (BARTLEWSKI *et al.*, 1999) também não foi observado uma elevação na concentração plasmática de P_4 em função do número ovulações. Contrariamente, Jarrell e Dziuk (1991) observaram uma maior concentração plasmática de P_4 em cabras gestantes com mais de um CL entre o 3º e 25º dia do ciclo, somente do 30º dia em diante não foi observada diferença da concentração plasmática de P_4 em função do número de CL ou de fetos.

Em ovinos, foi observado que a formação de tecido luteal e a capacidade esteroidogênica do CL parece ser controlado por mecanismos específicos em raças com diferentes taxas de ovulação (BARTLEWSKI *et al.*,

1999). Em caprinos, Fonseca e Torres (2005) também observaram diferença na concentração plasmática máxima de P_4 em função da raça estudada. Os resultados do presente estudo também sugerem que a concentração plasmática máxima de P_4 esteja mais associada à raça do que ao número de CL.

A taxa de gestação alcançada neste estudo (66,7%) é semelhante as observadas em outros estudos que utilizaram a monta natural (59,2% - FONSECA e TORRES, 2005) ou a inseminação artificial (63,7% - MENCHACA e RUBIANES, 2007). Esta observação demonstra que a ultra-sonografia consiste em uma técnica segura, e que mesmo utilizada de forma seriada não afetou negativamente a performance reprodutiva do grupo experimental.

Comparando animais gestantes e não-gestantes, Fonseca e Torres (2005) só observaram diferença na concentração plasmática de P_4 durante o período esperado da luteólise, indicando que a P_4 não foi um fator limitante para o estabelecimento da gestação. O mesmo foi observado no presente estudo, nas fêmeas que ficaram gestantes a presença de um embrião viável não permitiu que ocorresse o processo de luteólise, mantendo as concentrações plasmáticas de P_4 até o final do período experimental (Figura 4).

Os resultados demonstrados neste estudo indicaram que o a área luteal, o número de CLs ou a concentração plasmática de P_4 não foram os únicos fatores que contribuíram para que os animais fiquem gestantes ($P > 0,05$), ou seja, outros fatores que não foram avaliados no presente estudo (ambiente uterino, qualidade espermática e oocitária) podem ter sido determinantes para o estabelecimento ou não das gestações.

5 CONCLUSÕES

A ultra-sonografia por via transretal (transdutor de 5MHz) possibilita a identificação e mensuração do corpo lúteo e acompanhamento da dinâmica luteal em caprinos, constituindo uma importante ferramenta auxiliar para a avaliação de doadoras e receptoras de embrião na espécie caprina.

A dinâmica luteal em cabras da raça Toggenburg segue padrões semelhantes aos observados em outras raças e também outras espécies de ruminantes domésticos como bovinos e ovinos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTLEWSKI, P.M.; BEARD, A.P.; RAWLINGS, N.C. An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology*, v.52, p.115-130, 1999.

CAMP, J.C.; WILDT, D.E.; HOWARD, P.K.; STUART, L.D.; CHAKRABORTY, P.K. Ovarian activity during normal and abnormal length estrous cycles in the goat. *Biology of Reproduction*, v.28, p.673-681, 1983.

DAVIES, K.L.; BARTLEWSKI, P.M.; PIERSON, R.A.; RAWLINGS, N.C. Computer assisted image analyses of corpora lutea in relation to peripheral concentrations of progesterone: a comparison between breeds of sheep with different ovulation rates. *Animal Reproduction Science*, v.96, p.165-175, 2006.

De CASTRO, T.; RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; RIVERO, A. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentration during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology*, v.52, p.399-411, 1999.

DICKIE, A.M.; PATERSON, C.; ANDERSON, J.L.M.; BOYD, J.S. Determination of corpora lutea number in Booroola-Texel ewes using transrectal ultrasound. *Theriogenology*, v.51, p.1209-1224, 1999.

DUGGAVATHI, R.; BARTLEWSKI, P.M.; PIERSON, R.A.; RAWLINGS, N.C. Luteogenesis in cyclic ewes: echotextural, histological, and functional correlates. *Biology of Reproduction*, v.69, p.634-639, 2003.

EUCLIDES, R.F. *Sistema de análise estatística e genética (SAEG)*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 68p., 1982.

FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A. Administration of hCG 5 days after breeding and reproductive performance in nulliparous dairy goats. *Reproduction in Domestic Animals*, v.40, p.495-499, 2005.

GINTHER, O.J.; KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*, v.42, p.987-1001, 1994.

GINTHER, O.J.; KNOT, K.; WILTBANK, M.C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*, v.43, p.689-703, 1995.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas a reprodução animal*. São Paulo, Varela Editora e Livraria Ltda, 324p., 2001.

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 in Domestic Animals*, v.35, p.65-68, 2000.

GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M.J. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*, v.58, p.1607-1614, 2002.

JARRELL V.L.; DZIUK, P.J. Effect of number of corpora lutea and fetuses on concentrations of progesterone in blood of goats. *Journal of Animal Science*, v.69, p.770-773, 1991.

KASTELIC, J.P.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology*, v.34, p.487-498, 1990.

MAFFILI, V.V.; TORRES, C.A.; FONSECA, J.F.; MORAES, E.A.; PONTES, R.A.M. Sincronização de estro em cabras da raça Saanen com esponja intravaginal e CIDR-G®. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57(5), p.591-598, 2005.

MAFFILI, V.V.; TORRES, C.A.; BRUSCHI, J.H.; FONSECA, J.F.; VIANA, J.H.M. Indução do estro em cabras da raça Toggenburg com dois diferentes dispositivos intravaginais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58(3), p.367-372, 2006.

MANN, G.E.; ROBINSON, R.S.; HUNTER, M.G. Corpus luteum size and function following single and double ovulations in non-lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.67, p.1256-1261, 2007.

McCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews*, v.79(2), p.263-304, 1999.

MEDAN, M.S.; WATANABE, G.; SASAKI, K.; SHARAWY, S.; GROOME, N.P.; TAYA, K. Ovarian dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins, ovarian steroids, and inhibin during the estrous cycle in goats. *Biology of Reproduction*, v.69, p.57-63, 2003.

MEDAN, M.S.; WATANABE, G.; SASAKI, K.; GROOME, N.P.; SHARAWY, S.; TAYA, K. Follicular and hormonal dynamics during the estrous cycle in goats. *Journal of Reproduction and Development*, v.51(4), p.455-463, 2005.

MENCHACA, A; RUBIANES, E. Relation between progesterone concentrations during early luteal phase and follicular dynamics in goats. *Theriogenology*, v.57, p. 1411-1419, 2002.

MENCHACA, A; RUBIANES, E. Pregnancy rate obtained with short-term protocol for timed artificial insemination in goats. *Reproduction of Domestic Animals*, v.42, p. 590-593, 2007.

ORITA, J.; TANAKA, T.; KAMOMAE, H.; KANEDA, Y. Ultrasonographic observation of follicular and luteal dynamics during the estrous cycle in Shiba goats. *Journal of Reproduction and Development*, v.46, p.31-37, 2000.

RIESENBERG, S.; MEINECKE-TILLMANN, S.; MEINECKE, B. Ultrasonic survey of follicular development following superovulation with a single application of FSH, eCG or hMG in goats. *Small Ruminant Research*, v.40, p.83-93, 2001.

SAEG, Sistema para Análise Estatística, versão 9,1: Fundação Arthur Bernardes – UFV – Viçosa, 2007.

SANGHA, G.K., SHARMA, R.K., GURAYA, S.S. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Ruminant Research*, v.43, 53-64, 2002.

SCHRICK, F.N.; SURFACE, R.A.; PRITCHARD, J.Y.; DAILEY, R.A.; TOWNSEND, E.C.; INSKEEP, E.K. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biology of Reproduction*, v.49, p.1133-1140, 1993.

SIMÕES, J.; POTES, J.; AZEVEDO, J.; ALMEIDA, J.C.; FONTES, P.; BARIL, G.; MASCARENHAS, R. Morphometry of ovarian structures by transrectal ultrasonography in Serrana goats. *Animal Reproduction Science*, v.85, p.263-273, 2005.

SIMÕES, J.; ALMEIDA, J.C.; VALENTIM, R.; BARIL, G.; AZEVEDO, J.; FONTES, P.; MASCARENHAS, R. Follicular dynamics in Serrana goats. *Animal Reproduction Science*, v.96, p.16-26, 2006.

SIMÕES, J.; ALMEIDA, J.C.; VALENTIM, R.; BARIL, G.; AZEVEDO, J.; FONTES, P.; MASCARENHAS, R. Assessment of luteal function by ultrasonographic appearance and measurement of corpora lutea in goats. *Animal Reproduction Science*, v.97, p.36-46, 2007.

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*, v.109, p.35-44, 1997.

SIQUEIRA, L.G.B. Uso da análise computacional de imagens ultra-sonográficas na avaliação da função luteal em bovinos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 119p., 2007.

SMITH, M.F.; McINTUSHI, E.W.; SMITH, G.W. Mechanism associated with corpus luteum development. *Journal of Animal Science*, v.72, p.1857-1872, 1994.

SUITER, J. Body condition scoring in sheep and goats. *Farmonte* 69/94. Disponível em: <http://www.agric.wa.gov.au/content/aap/sl/m/fn069_1994.htm>. Acessado em março de 2007.

VASCONCELOS, J.L.M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H.N.; GUENTHER, J.G.; WILTBANK, M.C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, v.56, p.307-314, 2001.

VIANA, J. H. M., FERREIRA, A. M., SÁ, W. F., CAMARGO, L. S. A. Função luteal em vacas da raça Gir. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 3, p. 257-262, 1999.

VIÑALES, C.; MEIKLE, A.; FORSBURG, M. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. *Animal Reproduction Science*, v.80, p.69-79, 2004.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO LUTEAL EM CABRAS NULÍPARAS DA RAÇA TOGGENBURG PELA ANÁLISE DE ATRIBUTOS DA IMAGEM ULTRA- SONOGRÁFICA

RESUMO

A ecotextura do corpo lúteo (CL) consiste em um importante parâmetro de avaliação, pois está diretamente relacionada às variações de vascularização e histológicas do CL e, conseqüentemente à esteroidogênese. O objetivo deste estudo foi avaliar a função luteal de fêmeas nulíparas da raça Toggenburg utilizando a análise de atributos de imagens ultra-sonográficas. Foram utilizadas fêmeas nulíparas (n=21) com idade média de 8 meses, peso médio de $33,52 \pm 1,22$ Kg e escore de condição corporal médio de $3,5 \pm 0,07$, e que manifestaram estro natural durante um período de 48 horas, no início da estação de acasalamento natural. Após a manifestação do estro (dia 0) e cobertura destas fêmeas, foram realizadas avaliações ultra-sonográficas dos ovários a cada 24 horas durante 21 dias. Para isso, foi utilizado um aparelho portátil (Aloka SSD 500, Aloka Co, Japão) acoplado a um transdutor linear de 5 MHz, adaptado para uso transretal. As imagens foram gravadas em fitas VHS e posteriormente digitalizadas em formato .TIFF, resolução de 1500x1125 pixels, utilizando uma placa de captura de vídeo (Pinnacle DC10, Pinnacle System). Estas imagens foram analisadas em um software próprio (Quantporo[®]). Cada ponto da imagem (pixel) foi quantificado dentro de uma escala de cinza variando de 0 (preto) a 255 (branco). Para as análises das imagens foi definida uma área mínima representativa de 5625 pixels ($0,31\text{cm}^2$). Para determinar as características da ecotextura luteal até o 15º dia do ciclo foram utilizados os dados dos animais (n=21), e do 16º até o 21º dia somente os dados de fêmeas não-gestantes (n=7). O valor médio dos pixels durante o período de luteogênese aumentou progressivamente, atingindo no 13º dia um valor significativamente maior do que observado na fase inicial do ciclo estral. Durante o processo de luteólise, o valor médio dos pixels apresentou uma redução significativa cerca de 48 horas após o início da luteólise natural. Foi observado uma correlação positiva entre o valor médio dos pixels e a área luteal durante a luteogênese e a luteólise ($r=0,34$ e $r=0,26$, respectivamente; $P<0,05$), e também em relação à concentração plasmática de progesterona ($r=0,24$ e $r=0,37$, respectivamente; $P<0,05$). Não foi observado um efeito do dia do ciclo sobre a heterogeneidade do CL, assim como uma correlação positiva entre a heterogeneidade e a área luteal ou a progesterona plasmática em nenhuma fase do ciclo estral. Os presentes resultados demonstram que a quantificação do valor médio dos pixels apresenta um potencial para a avaliação da função luteal em caprinos. Contudo, a utilização da técnica de forma preditiva ainda requer um maior aperfeiçoamento dos equipamentos e procedimentos, para uma melhor definição de parâmetros e características desejáveis.

Palavras chave: corpo lúteo, ultra-sonografia, ecotextura, caprino

ABSTRACT

The sonographic echotexture is an important parameter for corpora lutea (CL) evaluation, once it is related to variations on vascularization and histological features of CL and, consequently, to steroidogenesis. The aim of this study was to evaluate the luteal dynamics and echotexture during the estrous cycle in Toggenburg goats. Nulliparous goats (n=21), with an average age of 8 months, weight of 33.52 ± 1.22 Kg and body condition score of 3.5 ± 0.07 were used. Sonographic evaluations of the ovaries were performed daily after natural estrus, using a portable ultrasound device (Aloka SSD 500, Aloka Co, Japan.) equipped with an adapted linear rectal 5MHz probe. Images were recorded in VHS tapes and then digitalized in .TIFF format, at a resolution of 1500x1125, using a video capture board (Pinnacle DC10, Pinnacle Systems). These images were analyzed using a custom software (Quantporo[®]). Each image dot (pixel) received a numeric value ranging from 0 (black) to 255 (white). A representative elementary area (REA) of 5625 pixels (0.31 cm^2) was defined in the luteal tissue. For the establishment of luteal echotexture until day 15 were used data of all animals (n=21), and between day 16 and 21 were used only the data of nonpregnats animals. The mean pixel value progressively increase during luteogenesis, on day 13 reached a higher value than observed in the beginning of estrous cycle. During the luteolysis process, the mean pixel value decrease about 48 hours after the on set of natural luteolysis. A positive correlation was observed between the mean pixel value and luteal tissue area during luteogenesis and luteolysis ($r=0.34$ e $r=0.26$, respectively; $P<0.05$), and also between mean pixel value and plasma progesterone level ($r=0.24$ e $r=0.37$, respectively; $P<0.05$). A correlation between the CL heterogeneity and luteal tissue area or plasma progesterone level was not observe in any phase of the estrous cycle. These results show that quantification of pixel value has a potencial use for luteal function evaluation in goats. However, its use as a predictive tool depends on the improvement of procedures and equipments, allowing a better definition of the desirables parameters and characteristics.

Key words: Corpus luteum, ultrasonography, echotexture, goat

1 INTRODUÇÃO

A correta identificação e avaliação do corpo lúteo (CL) é determinante para se alcançar bons resultados em um programa de reprodução assistida. Estudos em outras espécies demonstraram que a presença de um CL funcional influenciou diretamente os resultados dos protocolos hormonais de superovulação (GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2002) e de sincronização do estro (BRITO *et al.*, 2003).

O advento da ultra-sonografia permitiu importantes avanços na elucidação dos diversos eventos reprodutivos dos animais domésticos, sendo considerado a inovação tecnológica mais significativa no campo de pesquisa em clínica reprodutiva (GINTHER, 1986). Em pequenos ruminantes, a identificação do CL pela técnica ultra-sonográfica por via transretal mostra-se tão eficiente quanto a laparotomia e a laparoscopia (VIÑOLES *et al.*, 2004; SIMÕES *et al.*, 2005). As características morfométricas (diâmetro, área ou volume) do CL mensuradas com auxílio da ultra-sonografia, associadas à concentração plasmáticas de P_4 têm sido utilizadas para a avaliação do *status* funcional do CL em bovinos (KASTELIC *et al.*, 1990) e ovinos (GONZALEZ-BULNES *et al.*, 2000).

A imagem ultra-sonográfica é composta por milhares de pixels (*picture elements*), que representam a intensidade do reflexo da onda ultra-sônica e são apresentados dentro de uma escala de cinza que varia de 0, um ponto totalmente preto, a 255, um ponto completamente branco (TOM *et al.*, 1998). A densidade e as características macroscópicas do tecido avaliado podem ser observadas por ultra-sonografia, contudo não podem ser quantificados pelo

olho humano, pois somos capazes de distinguir somente 18 a 20 diferentes tons de cinza (PIERSON e ADAMS, 1995).

A utilização de algoritmos computacionais (análise computacional) permite quantificar numericamente cada pixel da imagem dentro da escala de cinza, possibilitando uma avaliação bastante objetiva da ecotextura do órgão ou tecido (SINGH *et al.*, 2003).

Na avaliação da função luteal, Davies *et al.* (2006) observaram uma correlação positiva entre o valor médio dos pixels e a concentração plasmática de P_4 em ovinos. Esta correlação não foi observada em bovinos, estretanto a concentração plasmática de P_4 esteve negativamente correlacionada com a heterogeneidade da imagem (desvio padrão do valor médio dos pixels) (SIQUEIRA, 2007). Esta técnica, contudo, tem sido pouco utilizada na avaliação da função luteal de outras espécies, como no caso de caprinos.

O presente estudo teve por objetivo estabelecer uma metodologia para análise computacional de imagens ultra-sonográficas do CL em caprinos, e avaliar sua eficiência no estabelecimento da função luteal em diferentes fases do ciclo estral.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAL, PERÍODO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

O experimento foi conduzido em uma granja de caprinos leiteiros localizada no município de Coronel Pacheco, na Zona da Mata mineira (21° 35' S, 43° 15' W, 435 metros de altitude), durante o início da estação reprodutiva (entre março e abril de 2007; outono). Segundo a classificação de Köppen o clima da região onde foi conduzido o experimento é do tipo Cwa, caracterizado por invernos secos e verões chuvosos, sendo a temperatura média anual entre 18,0°C a 23,0°C e precipitação pluviométrica anual de 2000 a 2600mm³. Dentro do galpão onde os animais eram mantidos, foi colocado um termômetro para a mensuração da temperatura ambiente máxima e mínima, e um termohigrômetro para a mensuração da umidade relativa do ar. Na tabela 1 é possível observar os dados climatológicos de controle obtidos.

Tabela 1 Dados de controle climatológicos obtidos durante o período experimental (média \pm desvio padrão).

Dados climatológicos	Valor
Temperatura ambiente máxima	27,4 \pm 2,2 °C
Temperatura ambiente mínima	23,7 \pm 2,5 °C
<i>Umidade relativa do ar</i>	79,3 \pm 12,7 %

2.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas 23 cabras nulíparas (*Capra hircus*) da raça Toggenburg com idade média de oito meses, com média de peso vivo de $33,52 \pm 1,22$ Kg e escore de condição corporal de $3,52 \pm 0,07$ (escala de 1 – muito magra; a 5 – muito gorda; SUITER, 1994). Duas fêmeas foram descartadas por apresentarem cistos foliculares. Os animais selecionados manifestaram estro natural, detectado com auxílio de um rufião, dentro de um intervalo de 48 horas, e não apresentavam patologias reprodutivas detectáveis à ultrasonografia e vaginoscopia. Após a detecção do estro, todas as fêmeas foram cobertas por um bode sexualmente maduro duas vezes ao dia até não aceitarem mais a aproximação do macho. Para as coberturas foram utilizados três machos diferentes, os acasalamentos foram determinados pelos proprietários da granja. Dos animais, 14 ficaram gestantes e sete permaneceram vazias, duas fêmeas foram descartadas após a detecção da presença de cistos foliculares.

Os animais foram mantidos em sistema de confinamento total em baias coletivas, alimentados no cocho com capim Napier (*Pennisetum purpureum v. Taiwan*) picado e concentrado formulado e misturado na própria granja (ANEXO 2). Água e sal mineral (Salminas Caprinos®, ANEXO 3) foram fornecidos *ad libitum*.

2.3 AVALIAÇÕES ULTRA-SONOGRÁFICAS OVARIANAS

Para a realização das avaliações ultra-sonográficas dos ovários foi utilizado um aparelho portátil (Aloka SSD 500, Aloka Co. Japão) acoplado a um transdutor linear de 5 MHz adaptado para uso transretal em pequenos ruminantes. Esta adaptação consistia na fixação de duas hastes rígidas ao cabo do transdutor, o que permitiu a movimentação do mesmo no interior do reto. Estas avaliações foram realizadas sempre pelo mesmo operador e no mesmo período do dia. O ganho proximal, distal e total (22, 2.2 e 82,

respectivamente); assim como a área de foco do aparelho foram padronizados (F1 e F2), não sendo alterados durante todo o período experimental. Antes da avaliação as cabras eram contidas em um tronco próprio. Em seguida, as fezes eram retiradas manualmente da ampola retal e, com o auxílio de uma seringa de 60mL, eram depositados entre 5 a 10mL de gel (Carbogel[®]) para facilitar a transmissão ultra-sônica.

As avaliações dos ovários tiveram início no momento da detecção do estro (D0) e foram realizadas durante 21 dias consecutivos (D21) com intervalos de 24 horas. No D0 foi localizado e mensurado o(s) folículo(s) dominante(s) (FD). O FD foi avaliado e mensurado diariamente até o momento da ovulação. O dia da ovulação foi considerado como sendo o momento em que o FD anteriormente identificado não estava mais presente. A última medida do diâmetro do FD foi considerada como sendo o diâmetro ovulatório. Após a ovulação, as avaliações subseqüentes (D0 até D21) visaram acompanhar o período de luteogênese e posterior luteólise no caso das fêmeas não gestantes. Durante estes períodos, imagens correspondentes à secção transversal do CL, em seu maior diâmetro, foram geradas diariamente para a mensuração de sua área e posterior análise de ecotextura.

A área de tecido luteal (cm²) foi mensurada utilizando-se dispositivos do próprio equipamento, considerada como sendo a diferença entre a área luteal total, menos a área da cavidade, quando presente. Naqueles animais que apresentaram dupla (n=7) ou tripla ovulação (n=1), a área luteal considerada para cada dia do ciclo foi a soma das áreas dos dois ou três corpos lúteos, respectivamente.

A área luteal, o diâmetro folicular, assim como a localização das estruturas ovarianas foram anotadas em fichas próprias (ANEXO 4).

Durante as avaliações ultra-sonográficas para o acompanhamento da dinâmica luteal (descrita anteriormente), algumas imagens eram congeladas e gravadas para posterior análise computacional. O processo de captura destas imagens está descrito no item subseqüente.

2.4 CAPTURA E ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS IMAGENS

Os procedimentos de captura e análise das imagens utilizados neste experimento foram semelhantes aos descritos anteriormente para a espécie bovina (Siqueira, 2007). Para a captura das imagens, o equipamento de ultrasonografia foi devidamente conectado a um aparelho de vídeo-cassete através de cabos de vídeo próprios. Após a identificação do CL, uma imagem representativa do tecido luteal e de boa qualidade, ou seja, com o mínimo de artefatos, era congelada e iniciava-se o processo de gravação em fitas VHS, em velocidade sp por cerca de 10 segundos. As imagens gravadas eram posteriormente digitalizadas em formato .TIFF (não compactado) com resolução de 1500x1125 pixels, utilizando uma placa de captura de vídeo (Pinnacle DC10[®], Pinnacle Systems).

A análise de pixel (quantificação da ecotextura) foi realizada com um *software* específico para análise de imagens desenvolvido pelo laboratório de Geoprocessamento do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (Quantporo[®]). Este *software* calcula a tonalidade de cinza de cada pixel que compõe a região da imagem selecionada, representando-o de forma numérica dentro de uma escala de 256 tons de cinza, onde zero (0) representa um pixel totalmente preto e 255 um pixel totalmente branco. A região da imagem a ser analisada apresentava somente tecido luteal, evitando-se as áreas com artefatos de imagem, cavidades luteais e/ou estroma ovariano. A quantificação da ecotextura do corpo lúteo foi determinada com base nos valores médios das tonalidades de cinza dos pixels da região selecionada. Nos animais com dupla ou tripla ovulação a quantificação da ecotextura para cada dia do ciclo foi determinada como sendo a média entre os valores médios dos pixels de cada corpo lúteo presente.

Além do valor médio dos pixels, a ecogenicidade do CL também foi caracterizada a partir do desvio padrão destes valores (heterogeneidade), sendo analisada como uma variável independente. Quanto maior este desvio, mais heterogênea é considerada a imagem.

Antes do início das análises das imagens foi determinada a área mínima representativa (AMR) de tecido luteal a ser quantificada, representando assim a ecotextura do corpo lúteo. Para a determinação da AMR foram selecionadas áreas com dimensões decrescentes (100x100 pixels, 75x75, 50x50, 25x25 e 12,5x12,5) de imagens de CL no dia 12 do ciclo estral, momento onde o CL já apresentava seu diâmetro máximo. Para a determinação da AMR foram utilizadas as imagens de 20 dos 21 animais, totalizando 27 corpos lúteos. A análise destas imagens foi realizada conforme o procedimento descrito anteriormente. Contudo, em uma mesma imagem foram selecionadas as áreas com dimensões decrescentes, iniciando com uma região de 100x100 pixels. A porcentagem de variação foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\Delta V (\%) = [(V_{\text{atual}} / V_{100 \times 100}) - 1] * 100, \text{ onde:}$$

$\Delta V (\%)$ = percentual de variação

V_{atual} = valor médio dos pixels da área (75x75, 50x50, 25x25 ou 12,5x12,5) que se deseja saber o percentual de variação em relação a maior área (100x100)

$V_{100 \times 100}$ = valor médio dos pixels da maior área

Segundo Van den Bygaart e Protz (1999) a área mínima representativa seria aquela onde os valores médios de pixel não sofressem uma variação superior a 10% em relação à área imediatamente superior. Para este experimento, o mesmo critério foi utilizado; no entanto, a variação não poderia ser superior a 5% em relação aos valores médios da maior área de amostragem (100x100 pixels).

2.5 COLETA DE SANGUE E DOSAGEM PLASMÁTICA DE P4

Antes de cada avaliação ultra-sonográfica, uma amostra de sangue foi coletada para posterior determinação da concentração plasmática de progesterona. A coleta foi realizada através da punção da veia jugular utilizando tubos de 5mL com vácuo contendo anticoagulante (EDTA). O local

da punção era higienizado com algodão embebido em álcool 70% antes de cada coleta, havendo também uma alternância entre as veias jugulares direita e esquerda. Após a coleta as amostras foram acondicionadas em recipiente isotérmico (5°C) e imediatamente levadas ao laboratório para o processamento. As amostras foram centrifugadas sob refrigeração (5°C) a 894 x g por 20 minutos para a separação do plasma, sendo este acondicionado a – 20°C até o momento da determinação da concentração plasmática de progesterona.

As análises da concentração plasmática de progesterona foram realizadas em aparelho de radioimunoensaio de fase sólida utilizando-se kits comerciais de análise por I^{125} (Coat-a-Count[®], Medlab), no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp (matrícula CNEN 14542).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores diários mensurados da ecotextura luteal (valor médio dos pixels), heterogeneidade foram avaliados em função do dia do ciclo, por análise de variância (ANOVA), e diferenças entre médias foram determinadas pelo teste de Tukey. Os períodos de luteogênese e luteólise foram determinados em função da presença de variações significativas na área luteal e concentração de progesterona, e as mesmas medidas foram correlacionadas com os valores de pixels, utilizando-se o método das correlações de Pearson. As análises foram realizadas utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas (SAEG, 2007).

Para a determinação do efeito do dia do ciclo sobre a concentração plasmática de P4, área e ecotextura luteal durante o período de luteogênese e luteólise, assim como as correlações feitas durante estes períodos, foram considerados os dados de todos os animais (n=21) até o 15º dia do ciclo estral. Para as mesmas análises realizadas durante o período de luteólise (a partir do 16º dia do ciclo) foram considerados somente os dados das fêmeas que não ficaram gestantes (n=7).

3 RESULTADOS

3.1 ÁREA MÍNIMA REPRESENTATIVA (AMR)

Após as análises das imagens de acordo com a metodologia descrita anteriormente, as áreas de 75x75, 50x50, 25x25 e 12,5x12,5 pixels apresentaram um percentual de variação em relação a maior área (100x100 pixels) de 4,32%, 7,20%, 12,08% e 12,77%; respectivamente (FIGURA 1). O critério adotado nesse estudo foi de que o percentual de variação da AMR não fosse superior a 5% em relação a maior área (100x100 pixels). Portanto, a área de tecido luteal selecionada para a análise computacional foi de 75x75 pixels, correspondendo um total de 5625 pixels.

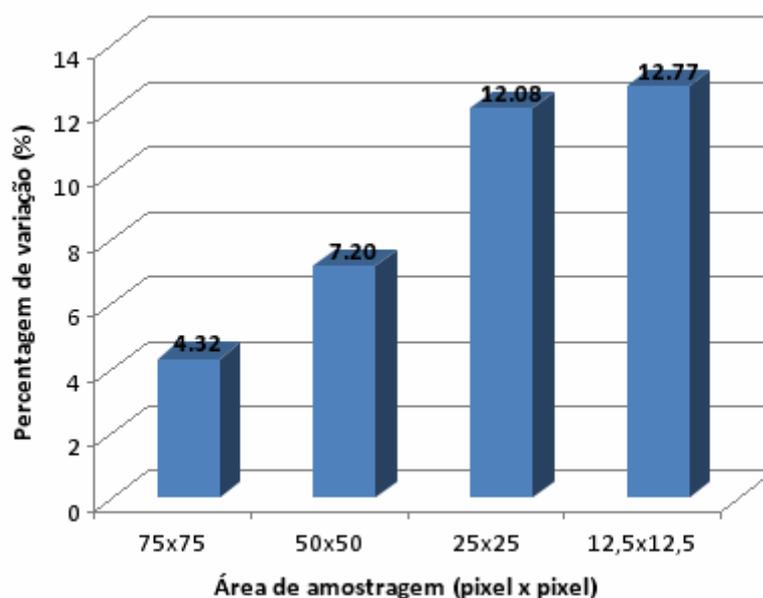


Figura 1 Percentual de variação das áreas de amostragem em relação a maior área (100x100 pixels) para a determinação da área mínima representativa.

3.2 ECOTEXTURA (VALOR MÉDIO DOS PIXELS E HETEROGENEIDADE)

No presente estudo foi observado um aumento progressivo do valor médio dos pixels durante o ciclo estral, atingindo no 13º dia do ciclo um valor significativamente maior do que o observado na fase inicial (Tabela 1).

Tabela 2 Ecotextura (valor médio de pixels) do CL durante o período de luteogênese

Dia do ciclo estral	Ecotextura (valor médio dos pixels) (escala 0-255)	Comparações
6 (n=11)	39,75±2,20	D
7 (n=11)	40,48±1,72	CD
8 (n=16)	46,73±2,06	BCD
9 (n=13)	51,01±2,16	ABCD
10 (n=18)	50,22±2,25	ABCD
11 (n=12)	51,41±2,53	ABCD
12 (n=17)	51,68±2,34	ABCD
13 (n=18)	54,33±1,83	AB
14 (n=18)	55,61±1,90	AB
15 (n=20)	54,18±1,96	AB

^{A,B} Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem (P<0,05; Tukey)

Foi possível observar ainda, uma correlação positiva entre a área de tecido luteal e o valor médio dos pixels da área luteal analisada (r=0,34; P<0,05). Na Figura 2 é possível observar que as alterações teciduais ocorridas no CL durante o período de luteogênese refletiram positivamente sobre o valor médio dos pixels.

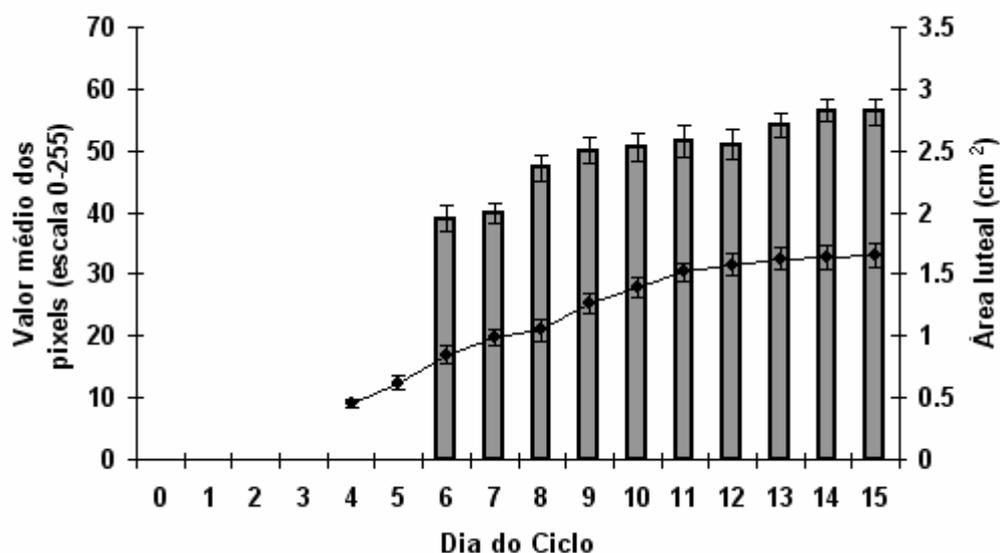


Figura 2 Valor médio dos pixels (colunas) e área luteal (●) durante o período de luteogênese.

Nas fêmeas que não ficaram gestantes foi observado que o valor médio dos pixels somente apresentou uma redução ($P < 0,05$) 48 horas após o início do processo de luteólise (Tabela 2).

Tabela 3 Ecotextura do CL durante o período de luteólise (hora 0 = início da luteólise)

Horas em relação à luteólise	Ecotextura (valor médio de pixels) (0-255)	Comparações
-48 (n=7)	54,99±2,49	AB
-24 (n=6)	54,96±3,99	AB
0 (n=6)	57,21±4,86	A
24 (n=6)	45,37±3,22	AB
48 (n=5)	42,63±5,62	B
72 (n=3)	38,97±4,54	B

^{A,B} Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($P < 0,05$; Tukey).

Assim como observado durante o período de luteogênese, as alterações teciduais ocorridas no CL durante o processo de luteólise também puderam ser evidenciadas pelo valor médio dos pixels, sendo observado uma correlação positiva ($r=0,26$; $P < 0,05$) entre estas duas variáveis durante a regressão do CL (Figura 2).

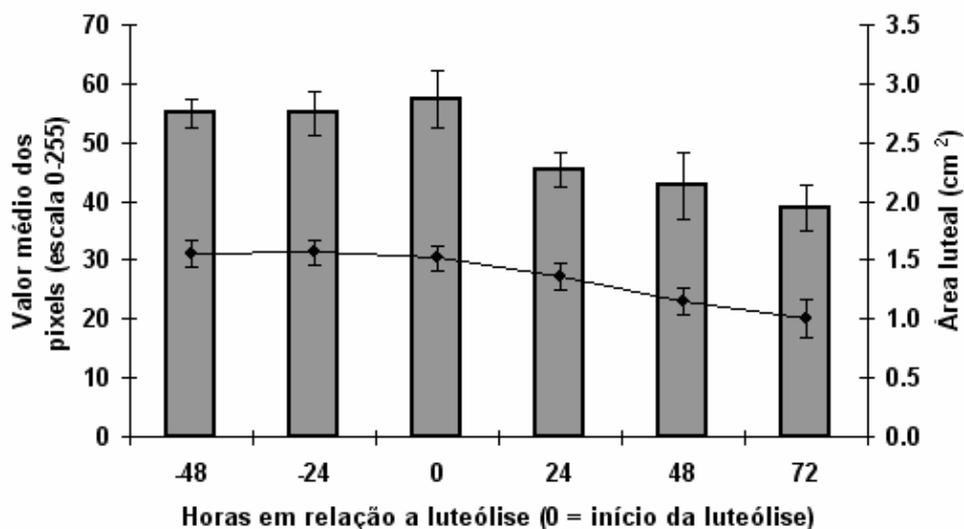


Figura 3 Valor médio dos pixels (colunas) e área luteal (●) durante o período de luteólise.

Em relação a P4, também foi observada uma correlação positiva entre o valor médio dos pixels e a concentração plasmática de P4 durante o período de luteogênese e luteólise ($r=0,24$; $P<0,05$ e $r=0,37$; $P<0,05$; respectivamente). A Figura 4 demonstra que a elevação observada no valor médio dos pixels foi acompanhada por uma elevação na concentração plasmática de P4. A mesma associação, entretanto inversa, foi observada durante o processo de luteólise (Figura 5).

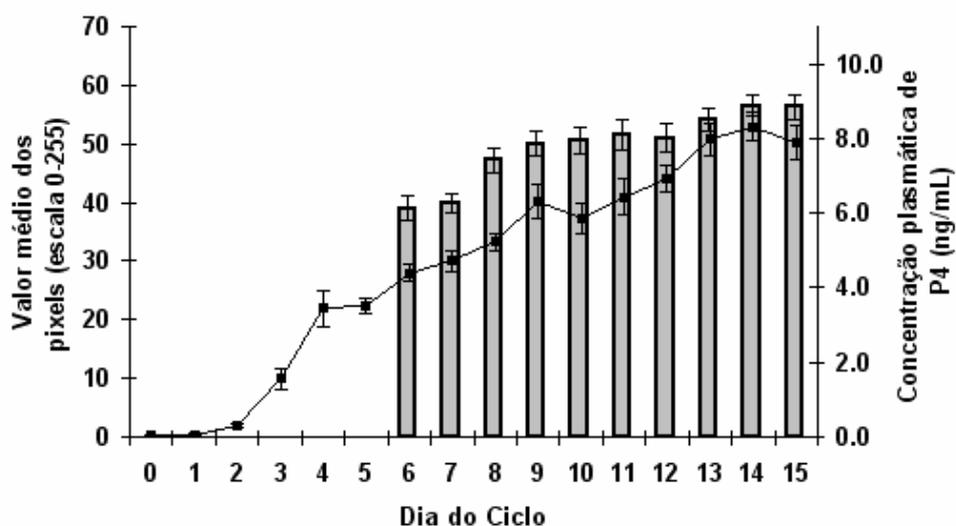


Figura 4 Valor médio dos pixels (colunas) e concentração plasmática de P4 (■) durante o período de luteogênese.

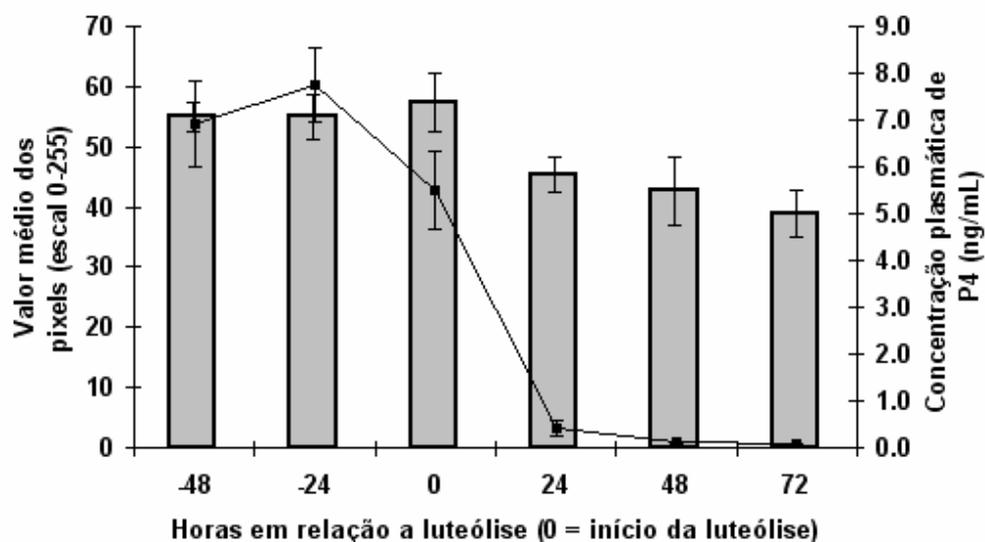


Figura 5 Valor médio dos pixels (colunas) e concentração plasmática de P4 (■) durante o período de luteólise.

No presente estudo não foi observado um efeito do dia do ciclo sobre a heterogeneidade do CL ($P > 0,05$), assim como uma correlação significativa ($P > 0,05$) entre a heterogeneidade e a área de tecido luteal (dias 0 a 15, $r = -0,04$; dias 16 a 21, $r = -0,21$) ou a concentração plasmática de P4 (dias 0 a 15, $r = -0,001$; dias 16 a 21, $r = 0,06$) em nenhum momento do ciclo estral (Figuras 6 a 9).

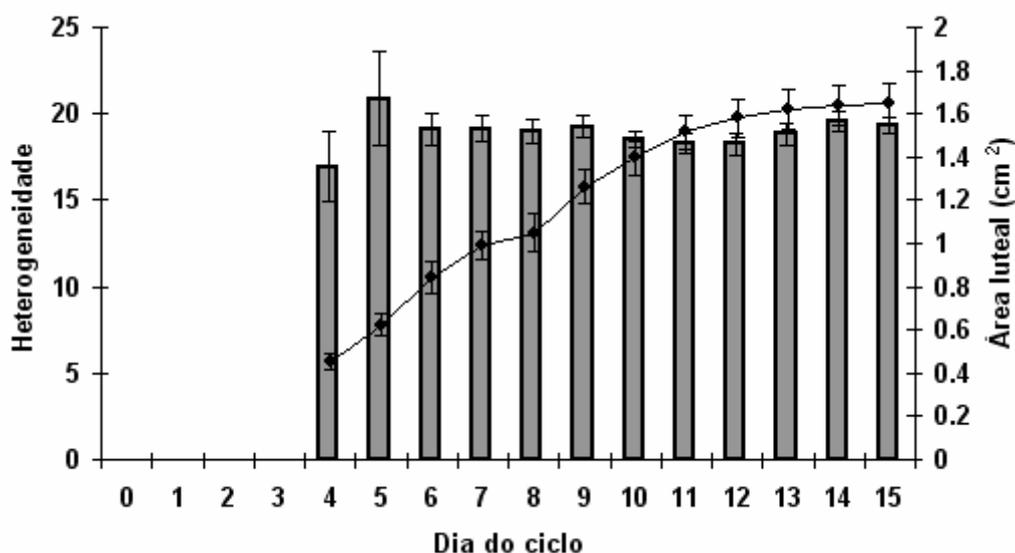


Figura 6 Heterogeneidade do CL (colunas) e área luteal (●) durante o período de luteogênese.

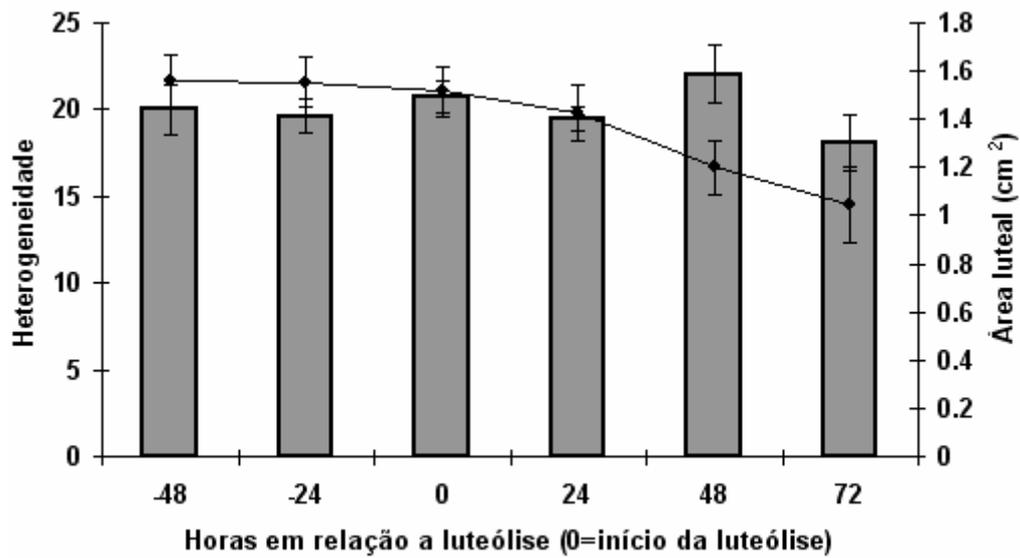


Figura 7 Heterogeneidade do CL (colunas) e área luteal (●) durante o período de luteólise.

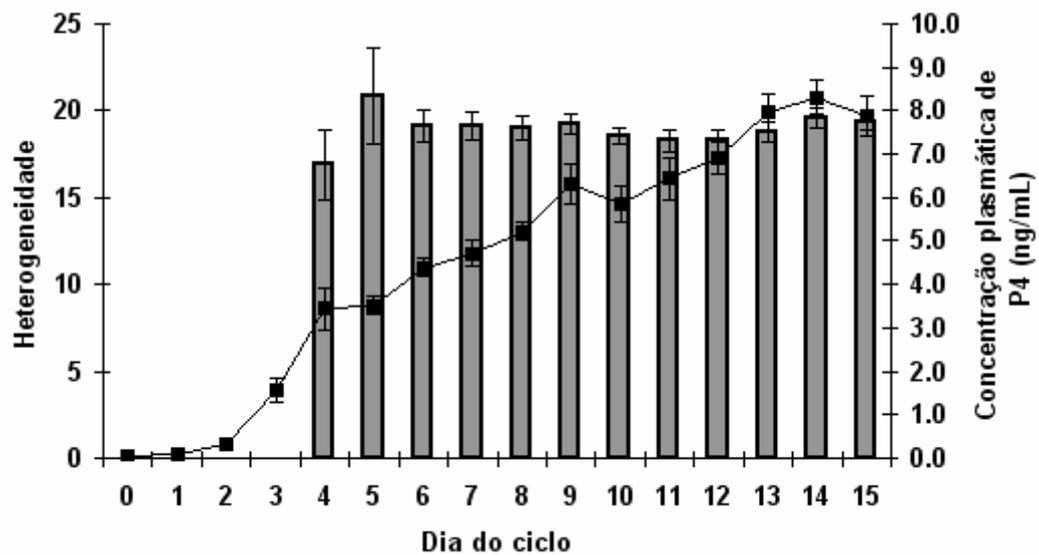


Figura 8 Valor médio dos pixels (colunas) e concentração plasmática de P4 (■) durante o período de luteogênese.

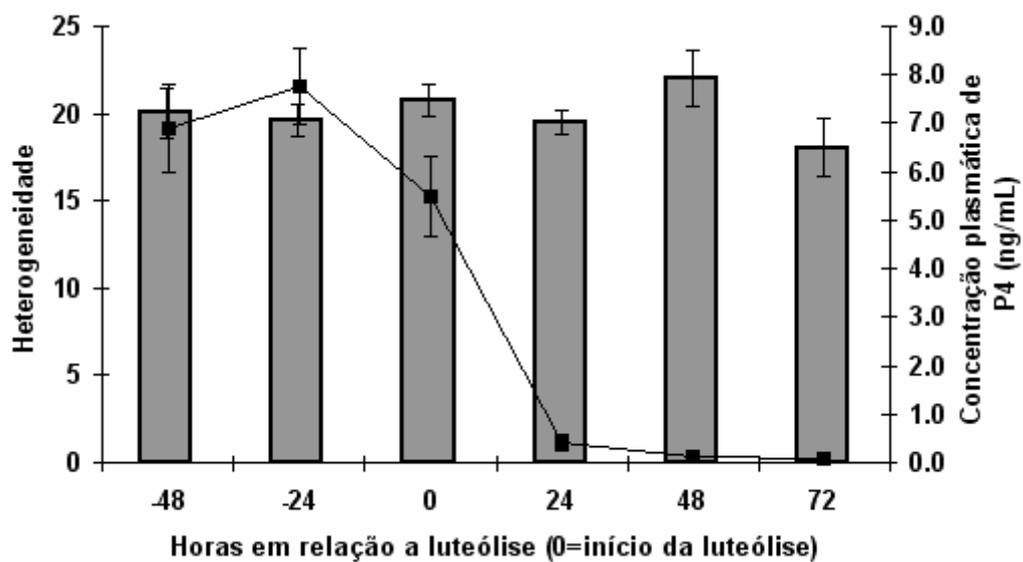


Figura 9 Heterogeneidade do CL (colunas) e concentração plasmática de P4 (■) durante o período de luteólise.

4 DISCUSSÃO

Após as análises das imagens do 12º dia do ciclo para a determinação da AMR, observou-se que o percentual de variação das áreas de amostragens selecionadas (75x75, 50x50, 25x25 e 12,5x12,5 pixels) em relação a maior área (100x100 pixels) foi de 4,32%, 7,20%, 12,08% e 12,77%; respectivamente. Seguindo o critério previamente estabelecido, decidiu-se por utilizar uma AMR de 75x75 pixels, única área de amostragem que não apresentou um percentual de variação superior a 5%. Portanto, em cada imagem analisada, o valor médio dos pixels correspondeu à quantificação da intensidade de um total de 5625 pixels. Assim como observado no presente estudo, porém com bovinos, Siqueira (2007) reportou um aumento na variação percentual em função da redução da área de amostragem, coerente com o fato de que a distribuição dos valores de pixels é irregular no CL. Os presentes resultados demonstram que a AMR determinada no presente estudo apresentou uma coerência em relação a variação e a distribuição de pixels em função da estrutura histológica do tecido.

Segundo Vandenbygaart e Protz (1999), quando se utiliza a análise computacional para quantificar as características gráficas de uma imagem, há a necessidade de estabelecer uma AMR que representa as características gráficas de uma imagem inteira. Estudos anteriores utilizando a análise computacional para a avaliação da ecotextura de CL em bovinos (TOM *et al.*, 1998), ovinos (DAVIES *et al.*, 2006) e caprinos (SIMÕES *et al.*, 2007) não definiram uma área mínima representativa, em alguns casos sendo utilizado para a análise uma grande parte da área do CL (até 80%) ou ainda toda a área

de tecido luteal. No software utilizado no presente estudo, a seleção de toda a área do CL ou acima de 100x100 pixels gerou uma matriz de dados excessivamente grande, superior a capacidade de processamento da planilha eletrônica e inviabilizando sua utilização.

A formação do CL (luteogênese) é um processo rápido caracterizado por uma intensa proliferação, multiplicação e aumento do volume celular, concomitante a intensos processos de angiogênese e remodelamento tecidual (SMITH *et al.*, 1994; McCracken *et al.*, 1999; NISWENDER *et al.*, 2000; ACOSTA e MIYAMOTO, 2004; KALENDER e ARIKAN, 2007). A luteogênese pode ser facilmente evidenciada por meio de avaliações ultra-sonográficas seriadas, onde se observa um aumento progressivo na área do corpo lúteo. Este crescimento luteal progressivo foi evidenciado em bovinos (KASTELIC *et al.*, 1990; SIQUEIRA, 2007), ovinos (GONZÁLEZ-BULNES *et al.*, 2000) e em caprinos (ORITA *et al.*, 2000; MEDAN *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2007). Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, sendo discutidos no capítulo anterior.

Os resultados obtidos nesse experimento mostram que o crescimento da área de tecido luteal foi acompanhado por uma elevação no valor médio dos pixels (Tabela 1), sendo possível detectar uma correlação positiva entre a área do CL e a ecotextura (Figura 2; $r=0,34$). Durante o processo de luteólise também foi possível observar uma correlação positiva (Figura 3; $r=0,26$) entre a área do CL e o valor médio dos pixels, no entanto foi observada uma redução nos valores destas duas variáveis (Tabela 2). Segundo Davies *et al.* (2006) o aumento nos valores médios dos pixels em CL de ovinos, pode representar a multiplicação e reorganização das células luteais, formando uma estrutura mais densa e, portanto com uma maior ecogenicidade. No mesmo estudo, durante a regressão luteal, a diminuição nos valores médios dos pixels foi atribuída a reorganização luteal em função do aumento da vascularização do CL, resultando em uma menor densidade e conseqüentemente, uma menor ecogenicidade. Com base nestes resultados, observa-se que nos animais utilizados nesse experimento, as alterações teciduais descritas durante o

processo de luteogênese e de luteólise influenciaram diretamente a ecogenicidade do CL, sendo evidenciadas pelo valor médio dos pixels.

O presente resultado demonstra que o valor médio dos pixels também refletiu positivamente a funcionalidade do CL. As alterações nos valores da concentração plasmática de P₄ estiveram associadas a mudanças no valor médio dos pixels, aumentando durante o processo de luteogênese (Figura 4; $r=0,24$) e diminuindo durante o processo de luteólise (Figura 5, $r=0,37$). Resultados semelhantes, associando a aparência ultra-sonográfica do tecido luteal com a funcionalidade do CL já foram descritos em estudos anteriores em ovinos (DAVIES *et al.*, 2006 – $r=0,48$ para raça Western White Face e $r=0,26$ para raça Finn). Apesar de existir esta correlação positiva significativa entre o valor médio dos pixels e a concentração plasmática de P₄ ela ainda não é considerada alta o suficiente para ser utilizada como valor preditivo (DAVIES *et al.*, 2006).

Não foi observado efeito do dia do ciclo sobre a heterogeneidade do CL, e nem uma correlação significativa desta variável com a concentração plasmática de P₄, ao contrário do que foi observado em bovinos (SIQUEIRA, 2007), porém semelhante ao relatado em ovinos (DAVIES *et al.*, 2006). Foi sugerido que a heterogeneidade dos pixels seria o resultado da presença dos diversos tipos de células luteias e não-luteais, criando áreas hipo- e hiperecóticas no tecido luteal (DUGGAVATHI *et al.*, 2003). Portanto, a heterogeneidade pode ser considerada uma variável mais associada a estrutura do CL do que a sua funcionalidade (DAVIES *et al.*, 2006), o que poderia justificar a ausência de correlação entre a heterogeneidade e a concentração plasmática circulante de P₄ observada no presente estudo.

A correlação entre a ecotextura luteal e o *status* funcional e estrutural do CL já foi descrito em caprinos (SIMÕES *et al.*, 2007). Contudo, nesse estudo não foi descrito o parâmetro utilizado para quantificar a ecotextura, os corpos lúteos foram simplesmente classificados como: contorno irregular e ecotextura heterogênea (CL_{ICHE}) e contorno regular e ecotextura granular (CL_{RCGE}). Nos resultados foi observada uma correlação negativa entre a concentração plasmática de P₄ e a proporção de CL_{ICHE} ($r=-0,95$).

A regressão luteal precoce é uma disfunção luteal observada com bastante frequência em cabras submetidas a protocolos de superovulação com eCG (STUBBINGS *et al.*, 1986; SAHARREA *et al.*, 1998). Alterações na formação do CL também já foram reportadas em ovinos (MURDOCH e VAN KIRK, 1998). Existe a necessidade de uma melhor compreensão desses fenômenos para se desenvolver protocolos preventivos (STUBBINGS *et al.*, 1986). Liu *et al.*, (2007), utilizando a análise computacional de imagens, observaram características ultra-sonográficas entre os folículos que deram origem a CL normais e os classificados como “de baixa competência”. Nesse estudo os folículos que geraram um CL “de baixa competência” apresentavam características indicativas de atresia (elevada intensidade dos pixels da região do antro folicular). Os folículos que geraram CL normais apresentaram uma baixa heterogeneidade dos pixels da região da parede folicular.

A análise computacional de imagens é um avanço natural no diagnóstico ultra-sonográfico, permitindo determinar o status funcional das estruturas ovarianas sem a necessidade de avaliações seriadas. Esta nova abordagem pode ainda ser utilizada para o estudo da fisiopatologia de distúrbios reprodutivos como por exemplos, as disfunções luteais.

5 CONCLUSÃO

A análise da ecotextura do CL através da quantificação do valor médio dos pixels apresenta um potencial para a avaliação da função luteal em caprinos. A utilização desta ferramenta tornaria a avaliação luteal mais eficiente, eliminando as inconsistências subjetivas observadas na avaliação visual das imagens. Dentro de um programa de TE, esta nova abordagem permitiria uma melhor avaliação e conseqüentemente uma seleção mais eficiente de receptoras de embrião. Além disso, poderia ser utilizada como ferramenta auxiliar para estudos envolvendo distúrbios luteais como a regressão luteal precoce.

Contudo, a utilização da técnica de forma preditiva ainda requer um maior aperfeiçoamento dos equipamentos e procedimentos, para uma melhor definição de parâmetros e características desejáveis.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BRITO, L.F.C.; SATRAPA, R.; MARSON, E.P.; KASTELIC, J.P. Efficacy of PGF_{2α} to synchronize estrus in water buffalo cows (*Bubalus bubalis*) is dependent upon plasma progesterone concentration, corpus luteum size and ovarian follicular status before treatment. *Animal Reproduction Science*, v.73, p.23-35, 2002.

DAVIES, K.L.; BARTLEWSKI, P.M.; PIERSON, R.A.; RAWLINGS, N.C. Computer assisted image analyses of corpora lutea in relation to peripheral concentrations of progesterone: a comparison between breeds of sheep with different ovulation rates. *Animal Reproduction Science*, v.96, p.165-175, 2006.

DUGGAVATHI, R.; BARTLEWSKI, P.M.; PIERSON, R.A.; RAWLINGS, N.C. Luteogenesis in cyclic ewes: echotextural, histological, and functional correlates. *Biology of Reproduction*, v.69, p.634-639, 2003.

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 in Domestic Animals*, v.35, p.65-68, 2000.

GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; SANTIAGO-MORENO, J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M.J. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*, v.58, p.1607-1614, 2002.

KALENDER, H., ARIKAN, S. Size distribution of dispersed luteal cells during oestrous cycle in Angora goats. *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, p.457-460, 2007.

KASTELIC, J.P.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology*, v.34, p.487-498, 1990.

LIU, X.; HART, E.J.; DAI, Q.; RAWLINGS, N.C.; PIERSON, R.A.; BARTLEWSKI, P.M. Ultrasonographic image attributes of non-ovulatory follicles and follicles with different luteal outcomes in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) – treated anestrous ewes. *Theriogenology*, v.67, p.957-969, 2007.

McCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews*, v.79(2), p.263-304, 1999.

MEDAN, M.S.; WATANABE, G.; SASAKI, K.; SHARAWY, S.; GROOME, N.P.; TAYA, K. Ovarian dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins, ovarian steroids, and inhibin during the estrous cycle in goats. *Biology of Reproduction*, v.69, p.57-63, 2003.

MURDOCH, W.; VAN KIRK, E. Luteal dysfunction in ewes induced to ovulated early in the follicular phase. *Endocrinology*, v.139, p.3480-3484, 1998.

NISWENDER, G.D., JUENGEL, L.J., SILVA, P.J., ROLLYSON, M.K., MCINTUSH, E.W. Mechanism controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, v.80, 1-29, 2000.

ORITA, J.; TANAKA, T.; KAMOMAE, H.; KANEDA, Y. Ultrasonographic observation of follicular and luteal dynamics during the estrous cycle in Shiba goats. *Journal of Reproduction and Development*, v.46, p.31-37, 2000.

PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. *Theriogenology*, v.43, p.105-112, 1995.

SAEG, Sistema para Análise Estatística, versão 9,1: Fundação Arthur Bernardes – UFV – Viçosa, 2007.

SAHARREA, A.; VALENCIA, J.; BALCÁZAR, A.; MEJÍA, O.; CERBÓN, J.L.; CABAALLERO, V.; ZARCO, L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology*, v.50, p.1039-1052, 1998.

SIMÕES, J.; POTES, J.; AZEVEDO, J.; ALMEIDA, J.C.; FONTES, P.; BARIL, G.; MASCARENHAS, R. Morphometry of ovarian structures by transrectal ultrasonography in Serrana goats. *Animal Reproduction Science*, v.85, p.263-273, 2005.

SIMÕES, J.; ALMEIDA, J.C.; VALENTIM, R.; BARIL, G.; AZEVEDO, J.; FONTES, P.; MASCARENHAS, R. Assessment of luteal function by ultrasonographic appearance and measurement of corpora lutea in goats. *Animal Reproduction Science*, v.97, p.36-46, 2007.

SINGH, J.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. Promise of new image technologies for assessing ovarian function. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.371-399, 2003.

SIQUEIRA, L.G.B. Uso da análise computacional de imagens ultra-sonográficas na avaliação da função luteal em bovinos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 119p., 2007.

SMITH, M.F.; McINTUSHI, E.W.; SMITH, G.W. Mechanism associated with corpus luteum development. *Journal of Animal Science*, v.72, p.1857-1872, 1994.

STUBBINGS, R.B.; BOSU, W.T.K.; BARKER, C.A.V.; KING, G.J. Serum progesterone concentrations associated with superovulation and premature corpus luteum failure in dairy goats. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.50, p. 369-373, 1986.

TOM, J.W.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. *Theriogenology*, v.49, p.1345-1352, 1998.

VANDENBYGAART, A.J.; PROTZ, R. The representative elementary area (REA) in studies of quantitative soil micromorphology. *Geoderma*, v.89, p.333-346, 1999.

VIÑALES, C.; MEIKLE, A.; FORSBERG, M. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. *Animal Reproduction Science*, v.80, p.69-79, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1: PARÂMETROS AVALIADOS PARA DETERMINAÇÃO DO ESCORE DA CONDIÇÃO CORPORAL.

Escore	Processo	13^a Costela	Garupa
	espinhoso		
1	Proeminente e pontuda.	O final é pontiagudo e fácil sentir os espaços entre, sobre e envolta das costelas.	Fina, a superfície tende a ser côncava.
2	Proeminente mas macia.	Final macio e arredondado; pode-se sentir os espaços entre, sobre e envolta das costelas amaciados.	Razoavelmente profunda com a superfície tendendo a ser plana.
3	Pode ser sentida, mas macia e arredondada.	Final arredondado e com boa cobertura, uma pressão firme é necessária para sentir os espaços entre e abaixo das costelas.	Repleta e arredondada.
4	Detectável com pressão.	Com pressão firme as costelas podem ser sentidas individualmente.	Repleta e com uma camada de cobertura de gordura.
5	Pode ser sentida com pressão firme.	Não podem ser sentidas, nem mesmo com firme pressão.	O músculo não pode ser sentido devido a uma espessa camada de gordura.

Fonte: Suiter, 2004.

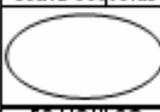
ANEXO 2: FÓRMULA DO CONCENTRADO OFERTADO AOS ANIMAIS

Componente	Percentual
Farelo de soja	10
Torta de algodão	20
Sal proteinado	2
Fubá	68

ANEXO 3: FÓRMULA DO SAL MINERAL COMERCIAL OFERTADO AOS ANIMAIS

Composição / Kg	
MACRONUTRIENTES	
Cálcio (g/Kg)	200
Fósforo (g/Kg)	80
Sódio (g/Kg)	89,073
Magnésio (g/Kg)	20,002
Enxofre (g/Kg)	20
Potássio (g/Kg)	Não informado
MICRONUTRIENTES	
Cobalto (mg/Kg)	22
Cobre (mg/Kg)	450
Iodo (mg/Kg)	149,8
Manganês (mg/Kg)	1500
Selênio (mg/Kg)	12,15
Zinco (mg/Kg)	3000,2
Ferro (mg/Kg)	Não informado
VITAMINAS	
Vitamina A (UI/Kg)	150000
Vitamina D (UI/Kg)	30000
Vitamina E (mg/Kg)	100

ANEXO 4: FOLHA DE AVALIAÇÃO ULTRA-SONOGRÁFICA

AVALIAÇÃO DO CL EM CABRAS									
Planilha Reprodutiva - Dinâmica Ovariana									
Número		Raça				EXAME		RESP.	
DATA	HORA				EXAME		RESP.		
ovário esquerdo	DIMENSÕES			CL	ovário direito	DIMENSÕES			CL
	1º fol		Área			1º fol		Área	
	< 3		Volume			< 3		Volume	
	3 a 5		Cavidade			3 a 5		Cavidade	
FOLICULOS		1º maior		2º maior		FOLICULOS		1º maior	
FOTO					FOTO				
Observações:									
DATA	HORA				EXAME		RESP.		
ovário esquerdo	DIMENSÕES			CL	ovário direito	DIMENSÕES			CL
	1º fol		Área			1º fol		Área	
	< 3		Volume			< 3		Volume	
	3 a 5		Cavidade			3 a 5		Cavidade	
FOLICULOS		1º maior		2º maior		FOLICULOS		1º maior	
FOTO					FOTO				
Observações:									
DATA	HORA				EXAME		RESP.		
ovário esquerdo	DIMENSÕES			CL	ovário direito	DIMENSÕES			CL
	1º fol		Área			1º fol		Área	
	< 3		Volume			< 3		Volume	
	3 a 5		Cavidade			3 a 5		Cavidade	
FOLICULOS		1º maior		2º maior		FOLICULOS		1º maior	
FOTO					FOTO				
Observações:									
DATA	HORA				EXAME		RESP.		
ovário esquerdo	DIMENSÕES			CL	ovário direito	DIMENSÕES			CL
	1º fol		Área			1º fol		Área	
	< 3		Volume			< 3		Volume	
	3 a 5		Cavidade			3 a 5		Cavidade	
FOLICULOS		1º maior		2º maior		FOLICULOS		1º maior	
FOTO					FOTO				
Observações:									
DATA	HORA				EXAME		RESP.		
ovário esquerdo	DIMENSÕES			CL	ovário direito	DIMENSÕES			CL
	1º fol		Área			1º fol		Área	
	< 3		Volume			< 3		Volume	
	3 a 5		Cavidade			3 a 5		Cavidade	
FOLICULOS		1º maior		2º maior		FOLICULOS		1º maior	
FOTO					FOTO				
Observações:									

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Tabela 1 Correlação entre o diâmetro do folículo ovulatório e a área do respectivo CL no D9

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
Folículo	Área do CL	24	0,2590	1,2578	0,1108

Tabela 2 Efeito do número de ovulações (N° de CL) sobre o dia da primeira identificação do CL

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Número de CL	1	7,269231	7,269231	15,819	0,00081
Resíduo	19	8,730769	0,4595142		

Coeficiente de Variação: 13,56%

Tabela 3 Efeito do número de ovulações (N° de CL) sobre a área de tecido luteal no momento da primeira identificação do CL

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Número de CL	1	0.3732154	0.3732154	5.485	0.03023
Resíduo	19	1.292880	0.6804631E-01		

Coeficiente de Variação: 39,29%

Tabela 4 Efeito do número de ovulações (N° de CL) sobre a área de tecido luteal no momento da primeira identificação do CL, considerando cada CL individualmente

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Número de CL	1	0.7733678E-02	0.7733678E-02	0.194	*****
Resíduo	29	1.154453	0.3980874E-01		

Coeficiente de Variação: 36,90%

Tabela 5 Efeito do dia do ciclo sobre a área de tecido luteal durante o período de luteogênese (D0 ao D15)

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Dia do Ciclo	17	35.34109	2.078887	13.094	0.00000
Resíduo	320	50.80499	0.1587656		
Coeficiente de Variação: 28,81%					

Tabela 6 Efeito do dia do ciclo sobre a concentração plasmática de progesterona durante o período de luteogênese (D0 ao D15)

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Dia do Ciclo	17	708.7452	41.69089	7.167	0.00000
Resíduo	320	1861.560	1861.560		
Coeficiente de Variação: 38,50%					

Tabela 7 Efeito do dia do ciclo sobre a área de tecido luteal de progesterona durante o período de luteólise (D16 ao D21)

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Dia do Ciclo	9	1.847701	0.2053001	2.296	0.02962
Resíduo	52	4.649938	0.8942189E-01		
Coeficiente de Variação: 19,96%					

Tabela 8 Efeito do dia do ciclo sobre a concentração plasmática de progesterona durante o período de luteólise (D16 ao D21)

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Dia do Ciclo	9	584.4415	64.93795	27.869	0.00000
Resíduo	52	121.1669	2.330133		
Coeficiente de Variação: 29,82%					

Tabela 9 Correlação entre a área de tecido luteal e a concentração plasmática de P4 durante o período de luteogênese (D0 ao D15)

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
P ₄	Área luteal	218	0.6348	12,738	0,0001

Tabela 10 Correlação entre a área de tecido luteal e a concentração plasmática de P₄ durante o período de luteólise (D16 ao D21)

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
P ₄	Área luteal	43	0,4978	3,6756	0,003

Tabela 11 Efeito do número de CL sobre a área do corpo lúteo no dia em que atingiu sua área máxima

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Número de CL	1	1.166036	1.166036	22.333	0.00020
Resíduo	17	0.8876064	0.5221214E-01		
Coeficiente de Variação: 18,08%					

Tabela 12 Efeito do número de CL sobre a concentração plasmática de P₄ no dia em que atinge a concentração máxima (D9)

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Número de CL	1	5.707408	5.707408	1.354	0.25981
Resíduo	18	75.88658	4.215921		
Coeficiente de Variação: 32,53%					

Tabela 13 Efeito do dia do ciclo sobre o valor médio dos pixels (ecotextura) durante o período de luteogênese (D0 a D15)

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Dia do ciclo	15	5702.849	380.1899	3.604	0.00001
Resíduo	250	26374.76	105.4990		
Coeficiente de Variação: 19,93%					

Tabela 14 Correlação entre a área de tecido luteal e o valor médio dos pixels (ecotextura) durante o período de luteogênese (D0 a D15)

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
Ecotextura	Área luteal	154	0,3387	4,4380	0,0001

Tabela 15 Efeito do dia do ciclo sobre o valor médio dos pixels (ecotextura) durante o período de luteólise (D16 a D21)

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Dia do ciclo	9	2674.561	297.1735	3.373	0.00290
Resíduo	47	4140.991	88.10619		

Coeficiente de Variação: 18,03%

Tabela 16 Correlação entre a área de tecido luteal e o valor médio dos pixels (ecotextura) durante o período de luteólise (D16 a D21)

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
Ecotextura	Área luteal	44	0,2585	1,7344	0,0451

Tabela 17 Correlação entre a concentração plasmática de P₄ e o valor médio dos pixels (ecotextura) durante o período de luteogênese (D0 a D15)

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
Ecotextura	P ₄	150	0,2399	3,0067	0,0013

Tabela 18 Correlação entre a concentração plasmática de P₄ e o valor médio dos pixels (ecotextura) durante o período de luteólise (D16 a D21)

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
Ecotextura	P ₄	41	0,3719	2,5018	0,0083

Tabela 19 Efeito do dia do ciclo sobre a heterogeneidade durante o período de luteogênese (D0 a D15)

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Dia do ciclo	15	134.6018	8.973455	1.434	0.13151
Resíduo	250	1564.023	6.256094		

Coeficiente de Variação: 12,96%

Tabela 20 Efeito do dia do ciclo sobre a heterogeneidade durante o período de luteólise (D16 a D21)

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Dia do ciclo	9	43.99788	4.888654	0.687	*****
Resíduo	47	334.6441	7.120088		

Coeficiente de Variação: 13,54%

Tabela 21 Correlação entre a concentração plasmática de P_4 e a heterogeneidade da imagem durante o período de lutegênese (D0 a D15)

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
Heterogen	P_4	178	-0,0012	-0,0159	0,4937

Tabela 22 Correlação entre a concentração plasmática de P_4 e a heterogeneidade da imagem durante o período de luteólise (D16 a D21)

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
Heterogen	P_4	42	0,0605	0,3833	0,3518

Tabela 23 Correlação entre a área de tecido luteal e a heterogeneidade da imagem durante o período de luteogênese (D0 a D15)

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
Heterogen	Área luteal	183	-0,0401	-0,5403	0,2945

Tabela 24 Correlação entre a área de tecido luteal e a heterogeneidade da imagem durante o período de luteólise (D16 a D21)

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
Heterogen	Área luteal	46	-0,2097	-1,4224	0,0810