

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS LUTEAIS DE FÊMEAS
TAURINAS (*Bos taurus taurus*) E ZEBUÍNAS
(*Bos taurus indicus*)**

Cleber Barbosa de Oliveira

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS LUTEAIS DE FÊMEAS
TAURINAS (*Bos taurus taurus*) E ZEBUÍNAS
(*Bos taurus indicus*)**

Cleber Barbosa de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Cesar Roberto Esper

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária – Área de concentração em Reprodução Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2007

- O48a Oliveira, Cleber Barbosa de
Avaliação das células luteais de fêmeas taurinas (*Bos taurus taurus*) e zebuínas (*Bos taurus indicus*) / Cleber Barbosa de Oliveira. –
– Jaboticabal, 2007
xiii, 36 f. ; 29 cm
- Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.
Orientador: Cesar Roberto Esper
Banca examinadora: José Domingos Guimarães, José Octávio Jacomini, Paulo Henrique Franceschini, Francisco Guilherme Leite
Bibliografia
1. Células luteais. 2. Corpo lúteo. 3. *Bos taurus*. 4. *Bos indicus*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
- CDU 619:612.6:636.2

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CLEBER BARBOSA DE OLIVEIRA – nascido em Goiatuba – GO, aos 08 dias do mês de maio de 1975; concluiu o ensino médio no “Colégio Carlos Drummond de Andrade – Nacional”, na cidade de Uberlândia – MG, em Dezembro de 1992. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária – FAMEV, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, em Janeiro de 1994. Concluiu, em Dezembro de 1998, o curso superior em Medicina Veterinária. Ingressou, em março de 1999, sob a orientação do Prof. Dr. José Domingos Guimarães, no Programa de Pós-graduação, Mestrado em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Universidade Federal de Viçosa – UFV, concluindo em Dezembro de 2000. Trabalhou como docente no curso de Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba – UNIUBE de Agosto de 2000 a Julho de 2001. Trabalhou como docente do curso de Medicina Veterinária das Faculdades Integradas do Planalto Central – FIPLAC de Agosto de 2001 a Setembro de 2002. Ingressou, em março de 2003, sob a orientação do Prof. Dr. César Roberto Esper, no Programa de Pós-graduação, Doutorado em Medicina Veterinária, Área de concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Trabalha desde Março de 2005 na Merial Saúde Animal.

O Julgamento

Não julgueis, pois,
o que disserem de vosso irmão pode ser falso...
Não apliqueis vosso padrão de verdade,
sobre aqueles que vos cercam.
O que é a verdade?
Observai vosso irmão!
Vede:
Misteriosos são os vislumbres de seu ego!
Julgais, às vezes,
pela vossa verdade!
Sabei que ela é um critério somente vosso.
Deixai o julgamento à natureza.
A vida nos julga; é a Lei!
Não façais pesar mais o fardo de culpa
de ninguém.
Sejam sábias as vossas palavras
e retas as vossas ações.

Geraldo Magela

Dedico a minha grande amiga,
confidente, companheira e esposa Michele, por
toda dedicação, compreensão e sobretudo
amor e carinho nas horas mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Cesar Roberto Esper pela acolhida e pela oportunidade dada e confiança depositada nesta empreitada e realização de um sonho.

À minha família pelo incentivo.

À amiga Eliana pela ajuda nos momentos difíceis em todas as fases do doutorado, sem esquecer de sua família, que teve importante contribuição, pela estadia e por ceder parte dos animais do experimento.

Aos amigos Juliana e Márcio (Capixaba) pela amizade, conversa amiga e ajuda nos momentos difíceis.

Ao amigo e Professor Beletti, que além de ajudar no experimento, contribuiu para confecção dos resultados e ajuda na parte estatística.

Ao amigo João Vítor, que com sua dedicação e contribuição, foi possível processar todo o material e acabar o experimento.

Aos amigos do Laboratório de Histologia da UFU, Hégio e Elenir, pela amizade e pela contribuição na confecção e processamento do material.

Aos colegas de pós-graduação pelo convívio e pela troca de informações durante o curso.

Aos funcionários do Laboratório de Reprodução, pelo convívio e ajuda.

À Universidade Estadual Paulista – FCAV – UNESP, pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos por meio de sua equipe docente, técnicos e alunos.

À Merial Saúde Animal, por ter cedido tempo para que acabasse meus créditos, experimento e terminasse o doutorado.

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 – DIFERENÇAS ENTRE ZEBUÍNOS E TAURINOS	2
1.2 – CICLO ESTRAL.....	3
1.3 – OVÁRIOS	4
1.4 – OVULAÇÃO E CORPO LÚTEO (CL).....	4
1.5 – CÉLULAS LUTEAIS.....	6
2 – OBJETIVOS	9
2.1 – GERAIS.....	9
2.2 – ESPECÍFICOS	9
2.3 – HIPÓTESE.....	9
3 – MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 – LOCAIS DO EXPERIMENTO.....	10
3.2 – ANIMAIS.....	10
3.3 – MANEJO E NUTRIÇÃO.....	10
3.4 – SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO.....	11
3.5 – OBTENÇÃO DOS CORPOS LÚTEOS.....	11
3.6 – PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA DE LUZ	12
3.7 – CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS LUTEAIS.....	13
3.8 – PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA	14
3.9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	14
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5 – CONCLUSÕES	28
6 – REFERÊNCIAS	29

LISTA DE TABELAS

Páginas

TABELA 1 – VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS LUTEAIS/ $10^4\mu\text{m}^2$ EM CORPOS LÚTEOS DE FÊMEAS ZEBUÍNAS E TAURINAS NO INÍCIO (3 – 5 DIAS) E NO FINAL DO CICLO ESTRAL (16 – 18 DIAS).....	16
TABELA 2 – VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DE CÉLULAS LUTEAIS/ $10^4\mu\text{m}^2$ EM CORPO LÚTEOS DE FÊMEAS ZEBUÍNAS E TAURINAS NO INÍCIO (3 – 5 DIAS) E NO FINAL DO CICLO ESTRAL (16 – 18 DIAS).	17
TABELA 3 – PROPORÇÃO MÉDIA ENTRE CÉLULAS LUTEAIS PEQUENAS, CÉLULAS LUTEAIS GRANDES E CÉLULAS LUTEAIS INTERMEDIÁRIAS/ $10^4\mu\text{m}^2$ EM CORPO LÚTEOS DE FÊMEAS ZEBUÍNAS E TAURINAS NO INÍCIO (3 – 5 DIAS) E NO FINAL DO CICLO ESTRAL (16 – 18 DIAS).	22
TABELA 4 – VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DA ÁREA/ μm^2 DAS CÉLULAS LUTEAIS BOVINAS (GRANDE, PEQUENA E INTERMEDIÁRIA) DE FÊMEAS TAURINAS E ZEBUÍNAS.	24
TABELA 5 – VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DO PERÍMETRO (EM μm) DAS CÉLULAS LUTEAIS BOVINAS (GRANDE, PEQUENA E INTERMEDIÁRIA) DE FÊMEAS TAURINAS E ZEBUÍNAS.	24
TABELA 6 – VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DO DIÂMETRO (EM μm) DAS CÉLULAS LUTEAIS BOVINAS (GRANDE, PEQUENA E INTERMEDIÁRIA) DE FÊMEAS TAURINAS E ZEBUÍNAS.	25

LISTA DE FIGURAS

Páginas

- FIGURA 1** – FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES HISTOLÓGICOS DE CORPO LÚTEO (COLORAÇÃO HE; AUMENTO 400X). 1A – FÊMEA ZEBUÍNA NO INÍCIO DO CICLO ESTRAL (3 – 5 DIAS) - OBSERVANDO NA CABEÇA DE SETA PRETA AS CÉLULAS LUTEAIS GRANDES; CABEÇA DE SETA AZUL - CÉLULAS LUTEAIS PEQUENAS; 1B – FÊMEA TAURINA NO INÍCIO DO CICLO ESTRAL (3 – 5 DIAS) - OBSERVANDO NA CABEÇA DE SETA PRETA AS CÉLULAS LUTEAIS GRANDES; CABEÇA DE SETA AZUL - CÉLULAS LUTEAIS PEQUENAS..... **20**
- FIGURA 2** – FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES HISTOLÓGICOS DE CORPO LÚTEO (COLORAÇÃO HE; AUMENTO 400X). 1C – FÊMEA ZEBUÍNA NO FINAL DO CICLO ESTRAL (16 – 18 DIAS) - OBSERVANDO NA CABEÇA DE SETA PRETA AS CÉLULAS LUTEAIS GRANDES; CABEÇA DE SETA AZUL - CÉLULAS LUTEAIS PEQUENAS; 1D – FÊMEA TAURINA NO FINAL DO CICLO ESTRAL (16 – 18 DIAS) - OBSERVANDO NA CABEÇA DE SETA PRETA AS CÉLULAS LUTEAIS GRANDES; CABEÇA DE SETA AZUL - CÉLULAS LUTEAIS PEQUENAS..... **21**
- FIGURA 3** – ELETRONMICROGRAFIAS DE CORPO LÚTEO. CÉLULA LUTEAL GRANDE (CG); CÉLULA LUTEAL PEQUENA (CP); NÚCLEO (N); RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO GRANULAR (REG); CABEÇA DE SETA PRETA - GRÂNULOS ELETRON-DENSOS ESPALHADOS PELO CITOPLASMA; CABEÇA DE SETA BRANCA – GOTAS LIPÍDICAS ESPALHADAS PELO CITOPLASMA. SETA PRETA - MITOCÔNDRIAS ESFÉRICAS ESPALHADAS PELO CITOPLASMA. 3A - FÊMEA TAURINA NO INÍCIO DO CICLO ESTRAL (AUMENTO: 3.000X). 3B - FÊMEA ZEBUÍNA NO INÍCIO DO CICLO ESTRAL (AUMENTO: 12.000X). 3C - FÊMEA ZEBUÍNA NO INÍCIO DO CICLO ESTRAL. NÚCLEO (N) EM FORMATO DE TAÇA (AUMENTO: 4.400X). 3D - TAURINA NO INÍCIO DO CICLO ESTRAL(AUMENTO: 7.000X)..... **27**

ABREVIATURAS

CG – Célula Luteal Grande
CL – Corpo Lúteo
CLs – Corpos Lúteos
CP – Célula Luteal Pequena
ET-1 – Endotelina 1
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas.
HE – Hematoxilina-Eosina
LH – Hormônio Luteinizante
N – Núcleo
P4 – Progesterona
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PGI₂ – Prostaglandina I₂
PGF2 α – Prostaglandina F2 α
REG – Retículo Endoplasmático Granular
V – Vaso Sanguíneo

AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS LUTEAIS DE FÊMEAS TAURINAS (*Bos taurus taurus*) E ZEBUÍNAS (*Bos taurus indicus*)

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi determinar o número de células luteais bovinas, comparando fêmeas taurinas com zebuínas no início e final do ciclo estral. Foram coletados corpos lúteos de 16 fêmeas sendo 8 taurinas e 8 zebuínas, distribuídas em 4 grupos sendo coletados os ovários nos dias 3 a 5 (2 grupos: taurino e zebuino) e 16 a 18 (2 grupos: taurino e zebuino) do ciclo estral. Os corpos lúteos foram processados para microscopia óptica e avaliou-se as células luteais pequenas, grandes e intermediárias, quanto ao número celular, diâmetro, área e perímetro. Os animais taurinos apresentaram maior quantidade de células luteais pequenas que os zebuínos no início do ciclo estral ($p<0,05$) e final do ciclo estral ($p<0,05$). Registrou-se diferença nos valores médios do diâmetro, perímetro e área das células luteais grandes, pequenas e intermediárias entre animais taurinos e zebuínos, tanto no início quanto no final do ciclo estral.

Palavras-chave: células luteais, corpo lúteo, *Bos taurus*, *Bos indicus*.

LUTEAL CELLS EVALUATION OF *Bos taurus* FEMALES (*Bos taurus taurus*) AND *Bos indicus* FEMALES (*Bos taurus indicus*)

ABSTRACT: The aim of this work was to determine the number of bovine luteal cells comparing *Bos taurus* females with *Bos indicus* females at the beginning and at the end of estrous cycle. Sixteen corpus luteum were collected in eight *Bos taurus* cattle and in eight *Bos indicus* cattle, distributed into four groups. The ovaries were collected from the third and the fifth days (two groups: *Bos taurus* females and *Bos indicus* females) and from the sixteenth and the eighteenth days (two groups: *Bos taurus* cattle and *Bos indicus* cattle) of the estrous cycle. The corpus luteum was processed to optical microscopy and the small, big and intermediate-sized luteal cells were evaluated considering the number of cells, diameter, area and perimeter. The *Bos taurus* females presented a bigger amount of small luteal cells than the *Bos indicus* females at the beginning of the estrous cycle ($p<0,05$) and at the end of the estrous cycle ($p<0,05$). The difference in the average values of the diameter, perimeter and the area of big, small and intermediate-sized luteal cells have been registered among *Bos taurus* cattle and *Bos indicus* cattle, at the beginning and also at the end of the estrous cycle.

Key words: luteal cells, corpus luteum, *Bos taurus*, *Bos indicus*

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O corpo lúteo (CL) participa da maioria dos processos reprodutivos nos bovinos. Ele é formado após a ruptura do folículo ovulatório, tendo como função primária a produção da progesterona (P4), que prepara o endométrio para implantação do embrião e manutenção da gestação. Não ocorrendo a prenhez, o CL regride permitindo o início de um novo ciclo estral (WILTBANK, 1994; SAKAMOTO et al., 1995; MILVAE et al., 1996; MILVAE, 2000; BORGES & GREGORY, 2003).

O corpo lúteo inicia a sua formação logo após a ovulação, com a proliferação e luteinização de células provenientes das camadas da granulosa e da teca do folículo pré-ovulatório bovino. Têm grande importância para o sucesso desejado das técnicas da reprodução (BAIRD, 1987; LIMA et al., 2003), pois através da detecção desta estrutura e em qual fase do ciclo estral a fêmea bovina se encontra, é que se escolhe o protocolo mais eficiente para se utilizar na sincronização e/ou transferência de embriões nos bovinos.

A progesterona, principal secreção do CL, exerce efeitos biológicos importantes no hipotálamo, hipófise, órgãos reprodutores femininos e glândula mamária, controlando a duração do ciclo estral e propiciando condições uterinas satisfatórias para o desenvolvimento do conceito (SMITH et al., 1994; WILTBANK, 1998). Desta forma, a secreção hormonal do corpo lúteo participa da modulação da duração e regularidade dos ciclos estrais, pelo controle da ocorrência de ovulações e pela manutenção da gestação. Ocorre sinergismo com outros hormônios produzidos em outros locais tais como hipófise, placenta (FSH, LH, PGs).

A avaliação do corpo lúteo fornece informações importantes sobre o estado reprodutivo da fêmea bovina, e possibilita a adequação de procedimentos de manipulação ou sincronização do ciclo estral (VIANA et al., 1999).

É preciso conhecer mais sobre a formação do corpo lúteo, sobre as células que o compõem (células luteais esteroideogênicas, fibroblastos e células endoteliais), sobre a manutenção deste durante o ciclo estral, regressão e de toda estrutura física que o compõe, para que se possa aplicar as novas

biotecnologias de forma correta, sejam elas protocolos de sincronização (BEAL, 1996) pela aplicação de substâncias luteolíticas, progestágenos (BORGES & GREGORY, 2003), gonadotrofinas (BERTAN et al., 2006) e/ou ainda de protocolos de superovulação de fêmeas bovinas visando à coleta e conseqüente transferência de embriões e/ou congelação.

1.1 – Diferenças entre zebuínos e taurinos

Os bovinos, animais biungulados, são pertencentes à família Bovidae, podendo ser subdivididos em duas subespécies: *Bos taurus indicus*, originário da Índia, Ásia e África conhecida como zebuína ou indiana e a subespécie *Bos taurus taurus*, que é proveniente do continente europeu, sendo conhecida como taurina ou européia.

Estas duas subespécies compreendem animais de várias raças com aptidão para produção de leite (gado leiteiro), de carne (gado de corte) ou ainda para produzir leite e carne (dupla aptidão).

O zebuíno é o bovino de corte predominante no Brasil, sendo a raça Nelore a mais disseminada nos rebanhos. Observam-se diferenças de adaptabilidade entre as subespécies taurinas e zebuínas no Brasil, tendo maior resistência os zebuínos ao *Boophilus microplus* encontrados nas pastagens tropicais que os taurinos (VERÍSSIMO, 1991; TEODORO et al., 2004); adicionalmente, diferenças foram relatadas em parâmetros reprodutivos por alguns autores, variando de alterações seminais e degeneração testicular (HORN et al., 1997) a estádios de desenvolvimento embrionário (FONSECA et al., 2001) diferentes respostas a tratamentos superovulatórios (BARUSELLI et al., 2006).

GALINA et al. (1987) relataram que em animais de raças zebuínas, os corpos lúteos são considerados mais difíceis de serem detectados pela palpação transretal, quando comparados à animais de raças européias.

Já SEGERSON et al. (1984) descreveram que as fêmeas zebuínas ficam em anestro e podem ocorrer estros anovulatórios durante as estações menos favoráveis. Relataram ainda que a concentração de progesterona e tamanho do corpo lúteo de vacas *Bos taurus indicus* eram menores que em *Bos taurus taurus* no verão, quando comparado com o inverno.

1.2 – Ciclo estral

O ciclo estral dos bovinos compreende todos os eventos reprodutivos que ocorrem entre dois períodos de receptividade sexual (estro) das fêmeas desta espécie (TEIXEIRA, 2000).

O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos principalmente por hormônios hipotalâmicos, hipofisários (gonadotrofinas), esteróides secretados pelos ovários e a $\text{PGF2}\alpha$ secretada pelo útero, sendo caracterizado por crescimento e regressão de folículos ovarianos e do corpo lúteo. O hipotálamo secreta GnRH e têm a função de estimular a hipófise na liberação das gonadotrofinas, o FSH e o LH. Estas por sua vez, agem nos ovários estimulando o desenvolvimento dos folículos e ovulação. A ação do FSH e do LH é responsável pela dissociação das células do cumulus e estimula a secreção de esteróides ovários. A progesterona estimula a ação da enzima collagenase na parede folicular e o estradiol aumenta o edema da teca. As prostaglandinas, secretadas pelas células granulosas, também têm efeito sobre a dissolução da parede folicular participando da ruptura do folículo ($\text{PGF2}\alpha$) e da transformação das células granulosas em células luteínicas (PGE_2). Também ativam o plasminogênio para dar plasmina, a qual está envolvida na migração celular (PGE_2) e estimulam as contrações ovarianas, as quais facilitam a ruptura folicular ($\text{PGF2}\alpha$) (BAIRD, 1987).

O ciclo estral é composto de quatro períodos, denominados proestro, estro metaestro e diestro. O proestro é caracterizado pelo início da regressão do corpo lúteo e termina do início do estro. O estro é caracterizado por receptividade sexual da fêmea, observando-se rápido desenvolvimento do folículo sob ação do estrógeno; têm duração média de 18 horas nas fêmeas bovinas. Segue-se a esta fase o metaestro, ocorrendo a ovulação 12 horas após o fim do cio. Esta fase dura de 3 – 4 dias, sendo o período inicial de desenvolvimento do CL, onde ocorre diminuição das secreções das glândulas do útero, cérvix e vagina. O diestro é a próxima fase, caracterizada pela atividade do CL, durando normalmente doze dias, terminando com a regressão do CL. A ovulação ocorre no metaestro sendo que o CL começa a se organizar e secretar progesterona (hormônio responsável por manter a gestação). O CL é

regulado pelo LH e regride na presença da prostaglandina F2 α . Encontra-se com maior frequência de duas a três ondas foliculares durante o ciclo estral. Estas se repetem na maior parte da vida reprodutiva das fêmeas bovinas. O ciclo estral pode ter algumas diferenças acompanhando as variações no número de ondas por ciclo (BAIRD, 1987; TEIXEIRA 2000).

1.3 – Ovários

Os ovários são órgãos pares situados na cavidade abdominal com o tamanho variando entre as espécies. Nos bovinos estas gônadas são geralmente ovais e suas características morfológicas variam em função do estágio reprodutivo, da fase do ciclo estral e do período de gestação em que a vaca se encontra (NASCIMENTO et al., 2003; CHACUR et al., 2006).

Os ovários são divididos nas regiões cortical e medular, sendo que a cortical é coberta por epitélio superficial denominado epitélio germinativo. A região medular é composta de tecido conjuntivo fibroelástico, grandes vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. O córtex contém células intersticiais, elementos do estroma e numerosos folículos ovarianos e/ou corpos lúteos em vários estádios de desenvolvimento (BANKS, 1991; HAFEZ & HAFEZ, 2004; CHACUR et al., 2006).

Os folículos ovarianos se desenvolvem sob influência do hormônio hipofisário folículo estimulante (FSH), se luteinizam sob ação do hormônio luteinizante (LH) e liberam o oócito recoberto por células da corona radiata, sobrepostas por células da granulosa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

No processo de ovulação as regiões remanescentes do folículo não degeneram, mas sofrem alterações pronunciadas que conduzem à formação do corpo lúteo. Há um processo de proliferação das células da granulosa, que preencherão a luz residual (BANKS, 1991).

1.4 – Ovulação e Corpo Lúteo (CL)

A ovulação ocorre como resultado de uma interação dinâmica entre a onda de LH e fatores locais ovarianos incluindo esteróides, prostaglandinas e peptídios (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004).

A onda de LH propicia mudanças estruturais e bioquímicas que culminam com a ruptura do folículo pré-ovulatório e desenvolvimento do corpo lúteo (SCHAMS & BERISHA, 2004; ROBINSON et al., 2006). O corpo lúteo (CL) é um órgão endócrino transitório que têm um papel vital na regulação do ciclo estral, fertilidade e manutenção da prenhez (RODGERS et al., 1988; MILVAE et al., 1996; OKUDA et al., 2001; SCHAMS & BERISHA, 2004; CHOUDARY et al., 2005).

Localizado na região cortical do ovário, o CL secreta progesterona (P4) e estrógenos, que atuam sobre a mucosa uterina, estimulando a secreção de suas glândulas. Além disso, a progesterona impede o desenvolvimento dos folículos ovarianos e a ovulação (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

O CL é formado pelas células das camadas da granulosa e da teca do folículo rompido na ovulação, sob estímulo de um pico pré-ovulatório de LH (MILVAE et al., 1996), sendo rapidamente invadido por vasos sanguíneos que ficam disseminados entre células da granulosa e da teca (BAIRD, 1987; MILVAE et al., 1996; KOBAYASHI et al., 2002). O processo de luteinização é caracterizado por extenso tecido remodelante, angiogênese, crescimento e diferenciação celular, além de repetidas mitoses de células esteroideogênicas (DAVIS et al., 1996; PATE, 1996; ACOSTA & MIYAMOTO, 2004; ROBINSON et al. 2006). A hemorragia que acompanha a ovulação formará um coágulo, o corpo hemorrágico, que será invadido por células do estroma e por vasos que removerá o coágulo, resultando na deposição de fibras reticulares e transformação das células luteais formando o corpo lúteo (BANKS, 1991).

O CL é uma glândula endócrina ovariana transitória, sua meia-vida é variável de espécie para espécie, variando entre 12 e 21 dias. A variação na concentração sanguínea de progesterona durante as fases luteais, reflete os sucessivos estágios de crescimento, manutenção e regressão do CL (LEYMARIE & MARTAL, 1993; AROSH et al., 2004; ROBINSON et al., 2006).

Durante todo o processo de surgimento, crescimento e regressão, O'SHEA et al. (1989) e FIELDS & FIELDS (1996) estimaram que mais de 50% das células do corpo lúteo bovino são células não esteroideogênicas, tais como células endoteliais, fibroblastos e outros tipos celulares, como pericito de vasos sanguíneos e linfáticos, e células de defesa como macrófagos, linfócitos e eosinófilos; estrutura esta semelhante ao que ocorre no corpo lúteo de ovino

(RODGERS et al., 1984) e da mulher (LEI et al., 1991), apesar destas células representarem menos de 20% do volume do corpo lúteo.

Alguns autores (PARRY et al, 1980; O'SHEA et al, 1989; WILTBANK, 1994) verificaram que esses dois tipos celulares são responsáveis por até 80% do volume do CL, sendo desta forma responsáveis pela produção da progesterona e de outros hormônios como a oxitocina. MILVAE et al. (1991) demonstraram essa importância retirando 60 – 90% das células da granulosa (precursora de luteais grandes) do folículo pré-ovulatório, resultando em redução de 80% da progesterona circulante. WEBER et al. (1987) e FIELDS & FIELDS (1996). Relataram maior viabilidade de células luteais grandes em fêmeas bovinas gestantes do que em animais não gestantes, isto devido à transformação das luteais pequenas em grandes.

1.5 – Células luteais

Quanto à esteroidogênese, o CL possui dois tipos de células luteais esteroidogênicas que podem ser diferenciadas pelo tamanho, as pequenas (variando de 10 a 20 μm) sendo derivadas da camada da teca interna e as grandes (25 μm) derivadas da camada da granulosa e também das células luteais pequenas (MILVAE et al., 1996; FIELDS et al., 1992; FIELDS & FIELDS, 1996; HANSEL & BLAIR, 1996; PATE, 1996) durante as fases do ciclo estral.

O aumento no peso do corpo lúteo é devido ao aumento no tamanho das células luteais (hipertrofia) que no número destas células. ROBINSON et al. (2006) relataram que o diâmetro das células luteais pequenas não é afetado pela idade do CL, enquanto que o tamanho da célula luteal grande aumentou do quinto ao oitavo dia, respaldando a hipótese que as grandes células luteais sofrem hipertrofia durante o desenvolvimento inicial do CL. Contudo, o número de células dentro do CL é similar ao verificado no folículo pré-ovulatório (BAIRD, 1987).

REDMER et al. (1991) afirmaram que a população de células luteais pequenas têm contato-dependente através das junções do tipo "gap" entre elas, e entre luteais pequenas e grandes, porém a comunicação entre células

grandes não foi detectada. A taxa de comunicação pode ser influenciada por vários hormônios (PGF2 α e LH).

WEBER et al. (1987) e FIELDS & FIELDS (1996) descreveram as características ultra-estruturais das células luteais, demonstrando que as células pequenas têm núcleo em formato de taça, membrana com superfície lisa e alguns microvilos, retículo endoplasmático liso em espiral, retículo endoplasmático rugoso e pequena quantidade de mitocôndrias alongadas com crista tubular, localizada em um arco perto do núcleo, além de possuir um grande complexo de Golgi e junções de adesão entre células luteais pequenas adjacentes e abundância de gotas citoplasmáticas lipídicas em todas as fases do ciclo estral. Já as células luteais grandes têm núcleo centralizado com maior número de mitocôndrias esféricas à sua volta, com retículo endoplasmático liso mais desenvolvido e superfície convoluta espalhados pelo citoplasma, além de não possuírem junções de adesão entre células luteais grandes adjacentes e terem abundância de grânulos secretórios organizados em um grande grupo. Os grânulos secretórios presentes em ambas células luteais grandes e pequenas, podem conter hormônios tais como oxitocina, neurofisina, relaxina, além da progesterona (MILVAE et al., 1996)

A função primária do CL é a síntese de progesterona, mas ele também produz uma variedade de outros hormônios (OKUDA et al., 2001). O controle dos hormônios secretados pelo CL é feito por fatores luteotrópicos hipofisários, LH e prolactina, e fatores luteolíticos como a prostaglandina F2 α (LEYMARIE & MARTAL, 1993), endotelina – 1 (MILVAE et al., 1996; CHOUDARY et al., 2005) e óxido nítrico (KORZEKWA et al., 2006) que é localmente produzido no CL durante o final da fase luteal (KORZEKWA et al., 2004).

As células grandes do CL bovino produzem mais progesterona do que as pequenas, mas as últimas têm melhor resposta à estimulação pelo LH (HANSEL & BLAIR, 1996; PATE, 1996). Em contrapartida, as células luteais grandes são os alvos dos efeitos luteolíticos da prostaglandina F2 α . Apesar de alguns trabalhos citarem que a prostaglandina F2 α uterina promove a luteólise, o CL possui grande estoque de ácido araquidônico e concentrações de prostaglandinas (PGI₂, PGE₂ e PGF 2 α), que são altas no início da fase luteal, sugerindo que a PGF2 α produzida no CL possa estar envolvida no processo de

regressão deste. Desta forma, existem evidências que maior produção de $\text{PGF2}\alpha$, estimulará maior secreção de oxitocina pelo hipotálamo e pelas células luteais grandes (ABDELGADIR et al., 1987, HANSEL & BLAIR, 1996) acelerando o processo de luteólise. Sabe-se ainda que a $\text{PGF2}\alpha$ causa aumento rápido no fluxo sanguíneo para o ovário (ACOSTA et al., 2002; MYAMOTO et al., 2005) e dispara a expressão da Endotelina-1 (ET-1); a Endotelina-1 atuará como mediadora da ação antiesteroideogênica da $\text{PGF2}\alpha$, pela diminuição de receptores para $\text{PGF2}\alpha$ e aumentando o número de receptores para ET-1, que inibirá a secreção de progesterona (MAMLUK et al., 1999; WRIGHT, et al., 2001; CHOUDARY et al., 2005).

Há estudos descrevendo as diferenças entre células luteais pequenas e grandes assim como origem, secreção endócrina, e características microscópicas destas células (ABDELGADIR et al., 1987; FIELDS & FIELDS, 1996; HANSEL & BLAIR, 1996; MILVAE et al., 1996). Outros têm analisado quantitativamente o número de células luteais do corpo lúteo (CL) da mulher no início, meio e final do ciclo menstrual, comparando com o CL da fêmea bovina (LEI et al., 1991) e da ovina (RODGERS et al., 1984). Outros descrevem a proporção de células luteais grandes e pequenas no corpo lúteo em bovinos (CHEGINI et al., 1984; O'SHEA et al., 1989). Adicionalmente, há relato mostrando as características morfológicas das células luteais grandes em fêmeas gestantes e não gestantes (FIELDS et al., 1992). Porém, não há registro na literatura de possíveis diferenças da análise quantitativa das células luteais em fêmeas bovinas taurinas (*Bos taurus taurus*) e zebuínas (*Bos taurus indicus*) no início e final do ciclo estral.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Gerais

3.1.1 – Verificar se há diferenças entre os corpos lúteos de fêmeas taurinas e zebuínas quanto ao aspecto morfológico.

3.1.2 – Verificar se há diferenças no número de células luteais entre fêmeas taurinas e zebuínas.

2.2 – Específicos

3.2.1 - Quantificar as células luteais grandes e pequenas entre as subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, no início (3 – 5 dias) e no final (16 – 18 dias) do ciclo estral.

2.2.2 - Identificar possíveis diferenças ultra-estruturais de organelas citoplasmáticas das células luteais (grandes e pequenas) de corpos lúteos de fêmeas taurinas e zebuínas durante o início e final do ciclo estral.

2.3 – Hipótese

Há diferenças quantitativas entre células luteais grandes e pequenas, no início e final do ciclo estral. Estas diferenças estão presentes, principalmente, quando se compara animais da sub-espécie *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Locais do experimento

O estudo foi desenvolvido nas fazendas Nova Granada, no município de Uberlândia – MG e Nossa Senhora Aparecida, Jaboticabal - SP, no período de janeiro de 2005 a fevereiro de 2006, onde as fêmeas foram selecionadas, sincronizadas e observadas quanto à ocorrência de estro.

As análises laboratoriais foram feitas no Laboratório de Histologia, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

3.2 – Animais

No presente estudo, foram utilizadas 16 fêmeas bovinas, sendo 8 taurinas (*Bos taurus taurus*) da raça Holandesa (variedade preta e branca) e 8 zebuínas (*Bos taurus indicus*) da raça Nelore, aptas à reprodução, com idade variando entre 4 e 7 anos (tendo parido pelo menos uma vez).

As fêmeas foram divididas em 4 grupos de 4 indivíduos, sendo 2 grupos para taurinos e 2 grupos para zebuínos:

- Grupo A - Zebuínos cujo CL foi coletado entre os dias 3 e 5 do ciclo estral.
- Grupo B - Taurinos cujo CL foi coletado entre os dias 3 e 5 do ciclo estral.
- Grupo C - Zebuínos cujo CL foi coletado entre os dias 16 e 18 do ciclo estral.
- Grupo D - Taurinos cujo CL foi coletado entre os dias 16 e 18 do ciclo estral.

3.3 – Manejo e nutrição

As fêmeas zebuínas foram criadas extensivamente em pastagem predominantemente de *Brachiaria decumbens*, com suplementação mineral e água natural *ad libitum* nos pastos. Já as fêmeas taurinas eram criadas em regime de manejo semi-intensivo, ficando logo após as ordenhas confinadas em estábulo, com alimentação à base de silagem, e soltas outra parte do dia em pastagens de *Brachiaria decumbens*, no período da tarde após a

alimentação fornecida logo após a segunda ordenha, sendo recolhidas ao estábulo no final do dia.

3.4 – Sincronização do estro

As fêmeas tiveram o ciclo estral sincronizado pela aplicação de 2 mL do hormônio Prostaglandina PGF2 α (Sincrocio® – Laboratórios Ouro Fino) por via intra-muscular, após palpação e identificação do CL por via transretal. Duas fêmeas zebuínas à palpação não tinham CL, não sendo necessária a aplicação de luteolítico, tendo as mesmas cio natural dois dias após a palpação. Estas fêmeas faziam parte do grupo C. Adotou-se como dia zero, aquele em que as fêmeas exteriorizaram o estro. Para os grupos A e B, os ovários foram colhidos entre os dias 3 e 5 após o estro. Para os grupos C e D os ovários foram obtidos entre os dias 16 a 18 após o estro.

3.5 – Obtenção dos corpos lúteos

Os ovários foram colhidos de dois animais do grupo A, no Hospital Veterinário da FCAV –UNESP – Jaboticabal por ovariectomia, pela laparotomia lateral na altura da fossa paralombar esquerda, feita com os animais em pé, com anestesia e procedimentos cirúrgicos segundo a técnica descrita por TURNER & McILWRAITH (1985). Os ovários dos outros 2 animais do grupo A e dos animais dos grupos B, C e D foram colhidos após abate dos animais no frigorífico Mataboi de Araguari - MG. Após a retirada dos ovários, os corpos lúteos foram separados dos ovários e divididos ao meio com lâmina para bisturi número 4, sendo metade para análise em microscopia óptica e a outra metade para análise em microscopia eletrônica. Os CLs foram obtidos por um tempo máximo de 15 minutos, uma vez que a autólise sofrida por esta estrutura inicia-se rapidamente. Para microscopia óptica, a metade foi fixada em formol a 10% tamponado e a outra foi fixada em solução de glutaraldeído a 3%, tamponado em solução de fosfato de sódio 0,1 M (pH = 7,2) por um período de 24 horas e depois conservada em solução tampão.

3.6 – Processamento do material para microscopia de luz

As metades dos corpos lúteos fixadas em formol a 10%, após 48 horas, foram processadas segundo a técnica histológica de rotina, que consiste em:

A- *Desidratação*- Os fragmentos foram deixados por 1 hora , em cada frasco contendo álcool em concentrações crescentes: 85%, 95%, absoluto I, absoluto II, absoluto III.

B- *Diafanização*- Os fragmentos eram retirados do último frasco com álcool absoluto III e transferidos para três frascos contendo o solvente xilol por 30 minutos, substituindo o álcool e permitindo a penetração de parafina fundida na peça.

C- *Inclusão*- Após a bateria de xilol, os fragmentos foram transportados e submersos em parafina fundida mantidas em estufa à 56°C. Os fragmentos passaram por 3 banhos de parafina, cada um com duração de 1 hora. Em seguida, procedia-se a inclusão propriamente dita, derramando-se numa forma de papel, parafina a 56°C. As peças eram arranjadas no molde de parafina, deixando esfriar a temperatura ambiente para a formação do bloco.

D- *Corte*- Cortes na espessura de 5 micrômetros foram obtidos com o auxílio de um micrótomo e distendidos em banho-maria. A “pescagem” consistia em mergulhar a lâmina com pinceladas de albumina na parte central do banho-maria, fixando o corte à lâmina. A secagem das lâminas foi procedida em estufa para fusão da parafina impregnada no tecido.

E – *Desparafinização* – As lâminas preparadas eram mergulhadas em xilol, fazendo 3 passagens, 1, 2 e 3, por 15 minutos, 4 segundos e 4 segundos, respectivamente.

F – *Hidratação* – Após 3 passagens no álcool absoluto por 10 minutos, 4 segundos e 4 segundos respectivamente e, em seguida, por passagens em álcool 95%, 85% e 70% por 4 minutos. Após, as lâminas eram lavadas em água corrente por 5 minutos e água destilada por 5 minutos.

G – *Refixação em Bouin*

H – *Coloração em Hematoxilina e Eosina* – Corar com hematoxilina por 2 minutos, lavar em água corrente por 10 minutos, corar com eosina por 1 minuto, passar em água acética a 1% por 1 minuto.

I – Desidratação em Álcoois – desidratar em álcool absoluto, por 3 vezes, cada uma de 5 minutos.

J – Diafanização em Xilol – duas passagens por xilol, cada uma de 5 minutos.

K – *Montagem* – Era feita colocando-se uma gota de Bálsamo de Canadá sobre o corte e, posteriormente, uma lamínula sobre a lâmina e comprimida de modo a espalhar o bálsamo em fina camada entre a lâmina e lamínula.

Todos os cortes histológicos foram analisados por imagens digitalizadas obtidas em microscópio Olympus Trinocular BX40 acoplado a câmera Olympus Oly-200, ligada a um computador PC por meio de placa digitalizadora Data Translation 3153.

3.7 – Contagem do número de células luteais

Em cada corte histológico foi realizada a contagem de células luteais grandes e pequenas, determinando-se a proporção entre elas e a quantidade de cada uma por micrometro quadrado (μm^2). Foi realizada ainda a mensuração da área, perímetro e diâmetro, das células luteais grandes, pequenas e intermediárias. Classificou-se como células luteais grandes aquelas com diâmetro acima de $25\mu\text{m}$, células luteais pequenas com diâmetro entre 10 a $20\mu\text{m}$ (utilizando classificação empregada por FIELDS et al., 1992; FIELDS & FIELDS, 1996; HANSEL & BLAIR, 1996; MILVAE et al., 1996; PATE, 1996). Na contagem das células luteais grandes e pequenas verificou-se que algumas células luteais tinham características tanto de uma quanto da outra. Adotou-se então que estas células que continham características dos dois grupos seriam denominadas como células luteais intermediárias, com diâmetro entre 20 a $25\mu\text{m}$. Para a realização destas mensurações foi utilizado o programa HL Image 97 (Western Vision Software). Foram analisadas sete lâminas de cada animal, sendo que destas foram analisados seis campos, em formato de “X” e foram obtidas as médias para cada animal.

3.8 – Processamento do material para microscopia eletrônica

Para a microscopia eletrônica, foram colhidos fragmentos de corpo lúteo de quatro animais de cada grupo (4 animais taurinos e 4 zebuínos para o início e final do ciclo estral) .

Os fragmentos foram fixados em solução de glutaraldeído a 3%, tamponado em solução de fosfato de sódio 0,1 M (pH = 7,2) por um período de 24 horas. A seguir o material foi lavado em tampão fosfato (0,1 M - pH = 7,2), três vezes por 15 minutos.

O material foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% mais ferrocianeto de potássio 1,25% por um período de 60 minutos. Posteriormente, o material foi submetido à desidratação em série crescente de graus de álcoois e óxido de propileno e incluído em resina Epon-812, sendo a seguir realizados cortes ultrafinos.

Os cortes então foram contrastados com acetato de uranila, permanecendo por 45 minutos em estufa à temperatura de 37° C, em seguida foi contrastado pelo citrato de chumbo, permanecendo no mesmo por 30 minutos em temperatura ambiente, como descrito por WATSON (1958) e VENABLE & COGGESHALL (1965).

Posteriormente, os cortes foram analisados e documentados com auxílio de eletronmicrografias obtidas em microscópio eletrônico Zeiss EM-109 da Universidade Federal de Uberlândia – MG.

3.9 – Análise estatística dos dados

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 12 tratamentos, 4 repetições num esquema fatorial 2 x 2 x 3 (com 2 subespécies – taurinas e zebuínas, 2 épocas de colheitas – 3 a 5 dias e 16 a 18 dias, 3 tamanhos celulares – grandes, pequenas e intermediárias).

Os dados obtidos foram processados pelo programa S-Plus 2000 Professional for Windows, Release 3 da Math. Soft. Inc., e submetidos à análise de distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Como nas variáveis analisadas não foi obtido nenhum parâmetro com distribuição normal, as

médias obtidas de cada lâmina foram testadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon-sum 5% de probabilidade de erro.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira coleta todo o material perdeu-se devido à demora em dissecar e separar o corpo lúteo do ovário. Sendo assim, coletou-se todo material novamente, porém nesta segunda coleta, devido à rapidez com que os corpos lúteos entram em autólise logo após os ovários serem retirados dos animais, todos os corpos lúteos (CLs) foram coletados até 15 minutos após os animais serem abatidos, para que não houvesse comprometimento celular.

Os valores médios dos números de células luteais, estão compilados na Tabela 1:

Tabela 1 – Valores Médios e desvio padrão do número de células luteais/ $10^4\mu\text{m}^2$ em corpos lúteos de fêmeas zebuínas e taurinas no início (3 – 5 dias) e no final do ciclo estral (16 – 18 dias).

Animais	Células Luteais Grandes	Células Luteais Pequenas	Células Luteais Intermediárias	Total de Células Luteais
A1	2,35 ± 0,72	15,41 ± 3,00	1,39 ± 1,03	19,15 ± 2,70
A2	2,18 ± 0,39	7,75 ± 1,49	0,78 ± 0,44	10,71 ± 1,71
A3	2,18 ± 0,61	12,19 ± 2,13	1,04 ± 0,46	15,41 ± 2,62
A4	5,92 ± 3,02	16,98 ± 5,75	8,36 ± 5,25	31,25 ± 5,19
Média	3,16 ± 1,84	13,08 ± 4,08	2,89 ± 3,65	19,13 ± 8,79
B1	4,27 ± 1,70	24,46 ± 3,09	2,26 ± 0,54	30,99 ± 4,12
B2	2,78 ± 1,08	22,72 ± 2,31	2,96 ± 1,77	28,47 ± 2,55
B3	3,13 ± 0,57	24,81 ± 3,36	2,18 ± 1,12	30,12 ± 2,97
B4	2,96 ± 0,54	18,37 ± 2,48	1,83 ± 0,55	23,15 ± 2,08
Média	3,29 ± 0,67	22,59 ± 2,96	2,31 ± 0,47	28,18 ± 3,51
C1	2,70 ± 0,96	27,25 ± 2,87	1,92 ± 0,79	31,86 ± 2,52
C2	2,52 ± 0,61	15,24 ± 1,38	0,35 ± 0,27	18,11 ± 1,22
C3	2,61 ± 0,33	17,24 ± 1,72	0,35 ± 0,27	20,20 ± 1,80
C4	2,35 ± 0,44	14,10 ± 1,87	0,17 ± 0,27	16,63 ± 1,96
Média	2,55 ± 0,15	18,46 ± 6,00	0,70 ± 0,82	21,70 ± 6,93
D1	3,05 ± 0,84	25,33 ± 2,55	1,31 ± 0,55	29,68 ± 2,71
D2	4,01 ± 1,22	19,41 ± 2,79	0,52 ± 0,57	23,94 ± 1,60
D3	3,57 ± 0,77	14,36 ± 0,79	0,26 ± 0,29	18,19 ± 1,60
D4	3,48 ± 0,72	17,15 ± 1,53	0,43 ± 0,39	21,06 ± 1,92
Média	3,53 ± 0,39	19,06 ± 4,66	0,63 ± 0,46	23,22 ± 4,91

Legenda:

A1, A2, A3 e A4 – animais do grupo A. – fêmeas zebuínas do início do ciclo estral (3 – 5 dias).

B1, B2, B3 e B4 – animais do grupo B – fêmeas taurinas do início do ciclo estral (3 – 5 dias).

C1, C2, C3 e C4 – animais do grupo C – fêmeas taurinas do final do ciclo estral (16 – 18 dias).

D1, D2, D3 e D4 – animais do grupo D – fêmeas taurinas do final do ciclo estral (16 – 18 dias).

Observa-se na Tabela 1, diferenças entre os indivíduos da mesma subespécie taurina ou zebuína; entre as subespécies quanto ao número de células luteais grandes, pequenas e intermediárias e ainda, no total de células no início e final do ciclo estral. Como houve bastante variação entre indivíduos, mesmo aqueles da mesma subespécie e na mesma fase do ciclo estral, optou-se por reunir os animais de cada grupo e fase do ciclo estral e compor suas médias para submetê-las a uma melhor análise. Esta variabilidade já tinha sido relatada por NEVES & MARQUES JR. (2002) trabalhando com corpos lúteos bovinos coletados de ovários de frigoríficos. Sendo assim, as médias dos animais compiladas na Tabela 1, foram reunidas e constituíram as médias dos grupos de animais e estão sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão de células luteais/ $10^4\mu\text{m}^2$ em corpo lúteo de fêmeas zebuínas e taurinas no início (3 – 5 dias) e no final do ciclo estral (16 – 18 dias).

Animais	Células Luteais Grandes	Células Luteais Pequenas	Células Luteais Intermediárias	Total de Células Luteais
Grupo A	$2,24 \pm 0,10^a$	$11,78 \pm 3,85^a$	$1,07 \pm 0,31^a$	$15,09 \pm 4,23^a$
Grupo B	$3,29 \pm 0,67^b$	$22,59 \pm 2,96^{b,c}$	$2,31 \pm 0,47^{b,c}$	$28,18 \pm 3,51^{b,c}$
Grupo C	$2,55 \pm 0,15^{a,c}$	$18,46 \pm 6,00^{a,c}$	$0,70 \pm 0,82^{a,c,e}$	$21,70 \pm 6,93^{a,c}$
Grupo D	$3,53 \pm 0,39^{b,d}$	$19,06 \pm 4,66^{a,c}$	$0,63 \pm 0,46^{a,d,e}$	$23,22 \pm 4,91^{a,c}$

^{a, b, c} valores seguidos por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pela análise do Teste de Wilcoxon rank-sum com ($p < 0,05$).

Legenda:

Grupo A – fêmeas zebuínas do início do ciclo estral (3 – 5 dias).

Grupo B – fêmeas taurinas do início do ciclo estral (3 – 5 dias).

Grupo C – fêmeas zebuínas do final do ciclo estral (16 – 18 dias).

Grupo D – fêmeas taurinas do final do ciclo estral (16 – 18 dias).

No grupo A, um animal cujo resultado destoava muito dos demais (animal A4 – Tabela 1), foi retirado da média do grupo para que não houvesse comprometimento da análise do grupo A e consequentemente da análise entre os grupos.

Na contagem das células luteais grandes e pequenas verificou-se que algumas células luteais tinham características tanto de uma quanto da outra. Adotou-se então que estas células que continham características dos dois

grupos seriam denominadas como células luteais intermediárias, fato este não relatado por outros autores.

Tanto no início quanto no final do ciclo estral e independentemente da subespécie analisada (taurina ou zebuína) observou-se maior quantidade de células luteais pequenas em relação às grandes, sendo que a proporção entre elas varia conforme a fase do ciclo estral (início ou final), e a subespécie analisada (zebuína ou taurina) (Figuras 1 e 2).

No início do ciclo estral (3 – 5 dias), houve diferença ($p < 0,05$) entre os animais taurinos e zebuínos para o número de células luteais grandes, pequenas, intermediárias e células totais (Tabela 2), tendo as fêmeas taurinas maior número de células.

Analisando os animais no final do ciclo estral (16 – 18 dias) observou-se diferença ($p < 0,05$) na quantidade de células luteais grandes, onde os taurinos apresentaram maior quantidade de células luteais grandes que os zebuínos. Já para as células luteais pequenas, intermediárias e quantidade de células luteais totais, não houve diferença entre as subespécies ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Comparando as fêmeas zebuínas do início do ciclo, com as zebuínas do final do ciclo estral, verifica-se que não houve diferença ($p > 0,05$) entre elas para células luteais grandes, pequenas, intermediárias e totais. Observando também, as fêmeas taurinas do início e comparando-as com as taurinas no final do ciclo estral, verificou-se que houve diferença entre elas ($p < 0,05$) para o número de células grandes (tendo os animais do final do ciclo, maior número de células grandes que no início) e células intermediárias (maior número de células no começo do ciclo estral). Porém, não encontrou-se diferenças entre elas ($p > 0,05$) para células pequenas e células totais.

Comparando as fêmeas zebuínas do início do ciclo com as taurinas do final do ciclo, houve diferença para as células luteais grandes ($p < 0,05$), tendo as fêmeas taurinas um maior número que as zebuínas, porém não houve diferença para células pequenas, intermediárias e totais ($p > 0,05$).

Comparando as fêmeas taurinas do início do ciclo com as zebuínas do final do ciclo, houve diferença para o número de células luteais grandes ($p < 0,05$), tendo as fêmeas taurinas um maior número que as zebuínas, porém não houve diferença para células pequenas, intermediárias e totais ($p > 0,05$).

Houve um aumento no número de células luteais pequenas nos animais zebuínos no final do ciclo estral em relação ao início, fato este não observado nos taurinos, que diminuíram o número de células pequenas, apesar de não ter diferença ($p>0,05$). FARIN et al. (1986) trabalhando com ovinos também observou aumento no número de células luteais pequenas sem aumentar o volume, já nas células grandes não aumentou o número, porém aumentou o volume.

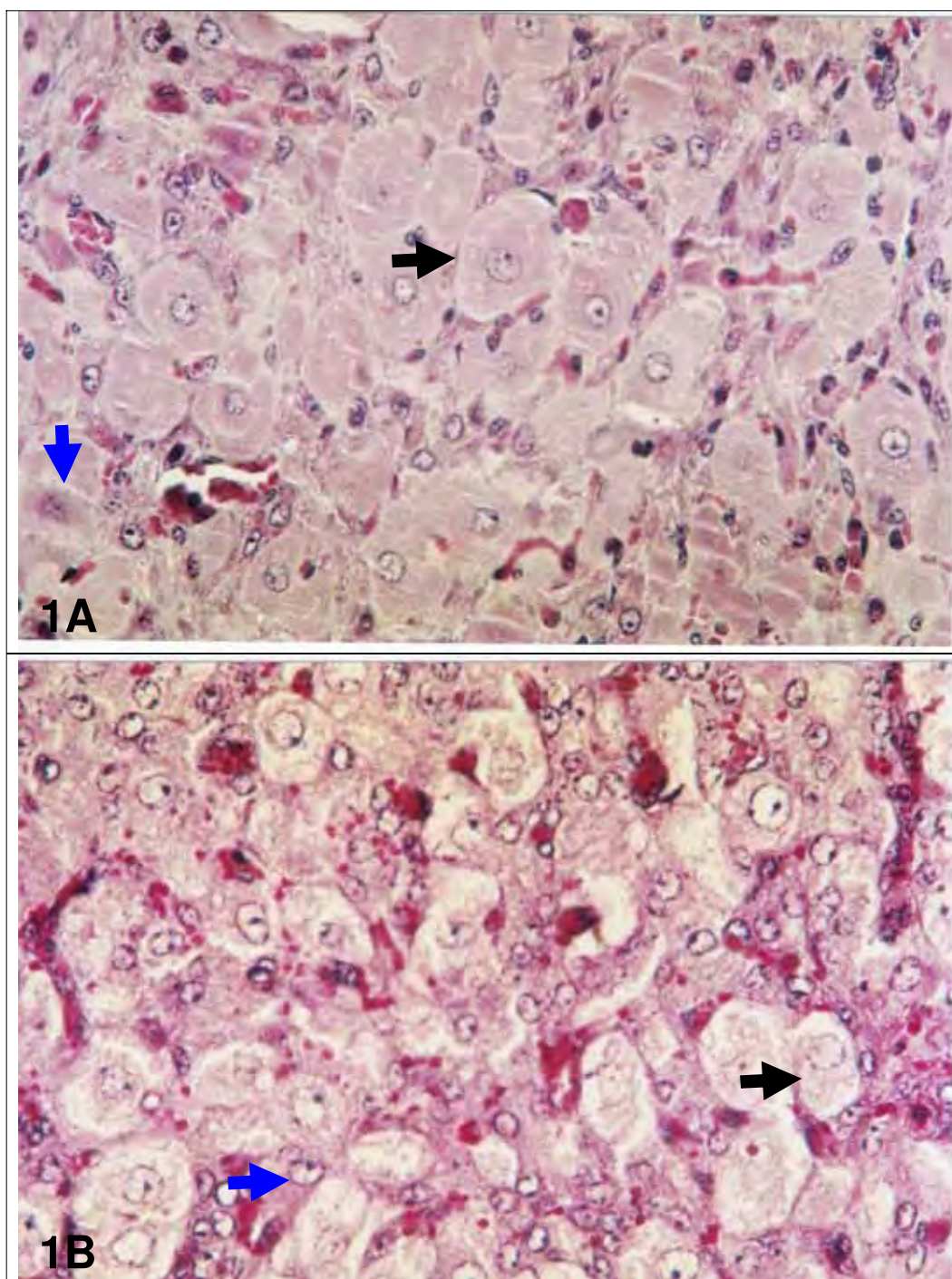


Figura 1 – Fotomicrografias de cortes histológicos de Corpo Lúteo (Coloração HE; Aumento 400x). 1A – fêmea zebuína no início do ciclo estral (3 – 5 dias) - observando na cabeça de seta preta as células luteais grandes; cabeça de seta azul - células luteais pequenas; 1B – fêmea taurina no início do ciclo estral (3 – 5 dias) - observando na cabeça de seta preta as células luteais grandes; cabeça de seta azul - células luteais pequenas.

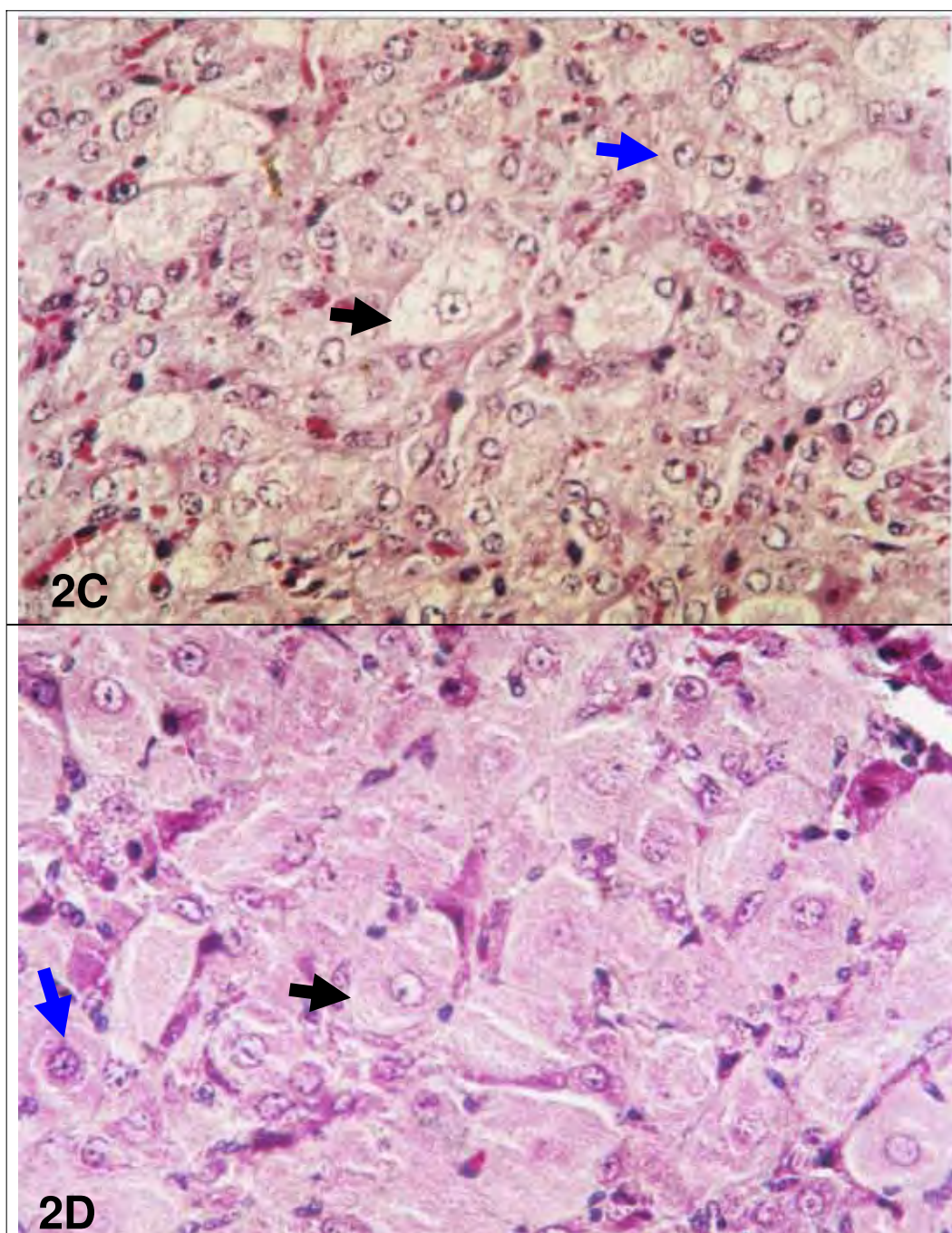


Figura 2 – Fotomicrografias de cortes histológicos de Corpo Lúteo (Coloração HE; Aumento 400x). 1C – fêmea zebuína no final do ciclo estral (16 – 18 dias) - observando na cabeça de seta preta as células luteais grandes; cabeça de seta azul - células luteais pequenas; 1D – fêmea taurina no final do ciclo estral (16 – 18 dias) - observando na cabeça de seta preta as células luteais grandes; cabeça de seta azul - células luteais pequenas.

Nos zebuínos, verificou-se aumento no número de células grandes e pequenas no final em relação ao início do ciclo estral. Contradizendo FISCH et al. (1989) que estudando o corpo lúteo humano, propuseram que células luteais grandes se transformavam em pequenas durante o ciclo menstrual. Nos taurinos, neste estudo, verificou-se o mesmo para as células luteais grandes, porém as células pequenas teve redução no número, no final do ciclo estral. Desta forma, pode-se especular que nos taurinos ocorreu uma transformação de células luteais pequenas em grandes. A transformação celular não obedeceu a um padrão nestas duas subespécies. Outros autores relataram diferenças entre espécies, NISWENDER et al., (1985) trabalhando com ovinos propuseram que células luteais pequenas poderiam se transformar em células grandes.

Observando os números de células luteais dos corpos lúteos descritos, demonstrados na Tabela 2, obteve-se a proporção entre elas, conforme relatado na Tabela 3.

Tabela 3 – Proporção média entre células luteais pequenas, células luteais grandes e células luteais intermediárias/ $10^4\mu\text{m}^2$ em corpo lúteos de fêmeas zebuínas e taurinas no início (3 – 5 dias) e no final do ciclo estral (16 – 18 dias).

Animais	Proporção entre Células Luteais Pequenas e Células Luteais Grandes	Proporção entre Células Luteais Pequenas e Células Luteais Intermediárias	Proporção entre Células Luteais Grandes e Células Luteais Intermediárias
Grupo A	5,24:1	11,01:1	2,09:1
Grupo B	6,87:1	9,78:1	1,42:1
Grupo C	7,24:1	26,37:1	3,64:1
Grupo D	5,39:1	30,25:1	5,60:1

Legenda:

Grupo A – fêmeas zebuínas no início do ciclo estral (3 – 5 dias).

Grupo B – fêmeas taurinas no início do ciclo estral (3 – 5 dias).

Grupo C – fêmeas zebuínas no final do ciclo estral (16 – 18 dias).

Grupo D – fêmeas taurinas no final do ciclo estral (16 – 18 dias).

Os resultados mostram que há maior quantidade de células pequenas em relação às grandes e intermediárias, maior número de grandes em relação

às intermediárias, no início e final do ciclo estral, independentemente da subespécie (taurina ou zebuína). Estes achados corroboram com outros autores trabalhando com outras espécies (RODGERS et al., 1984; trabalhando com ovinos e LEI et al., 1991; com humanos). Porém, não condizem com os achados por Lei et al. (1991) que trabalhando com taurinos observaram maior quantidade de células pequenas no início, no meio do ciclo estral e na prenhez, porém no final do ciclo estral, o número de células grandes era maior que o de pequenas.

Observando-se a proporção entre as células luteais grandes, pequenas e intermediárias (Tabela 3), verifica-se que há tendência de ter-se no início do ciclo estral maior proporção entre células pequenas e células grandes nos taurinos que nos zebuínos. Porém, para as proporções entre células pequenas e intermediárias e entre células grandes e intermediárias, há uma tendência de ter maior proporção nos zebuínos que nos taurinos. No final do ciclo estral tende-se a ter maior proporção entre células pequenas e células grandes nos zebuínos que nos taurinos, e ocorrendo o contrário para as proporções entre células pequenas e intermediárias e entre células grandes e intermediárias onde os taurinos prevalecem sobre os zebuínos.

Mensurou-se ainda a área, o perímetro e o diâmetro das células luteais bovinas (grandes, pequenas e intermediárias), conforme descrito a seguir nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4 – Valores médios e desvio padrão da área/ μm^2 das células luteais bovinas (grande, pequena e intermediária) de fêmeas taurinas e zebuínas.

Animais	Células Luteais Grandes	Células Luteais Pequenas	Células Luteais Intermediárias
Grupo A	746,35 $\pm$ 185,31 [*]	209,50 $\pm$ 33,95 [*]	410,73 $\pm$ 44,81 [*]
Grupo B	693,90 $\pm$ 143,97 [*]	216,10 $\pm$ 45,51 [*]	401,10 $\pm$ 25,41 [*]
Grupo C	685,00 $\pm$ 157,03 [*]	208,60 $\pm$ 52,04 [*]	376,21 $\pm$ 25,93 [*]
Grupo D	673,21 $\pm$ 102,68 [*]	203,39 $\pm$ 45,57 [*]	391,49 $\pm$ 21,25 [*]

^{*} P> 0,05 pelo Teste de Wilcoxon rank-sum.

Legenda:

Grupo A – fêmeas zebuínas do início do ciclo estral (3 – 5 dias).

Grupo B – fêmeas taurinas do início do ciclo estral (3 – 5 dias).

Grupo C – fêmeas zebuínas do final do ciclo estral (16 – 18 dias).

Grupo D – fêmeas taurinas do final do ciclo estral (16 – 18 dias).

Na área média, os resultados encontrados não mostraram diferença (p<0,05) para os três tipos celulares (grandes, pequenas e intermediárias). Não há relato de outros autores para este parâmetro analisado.

Tabela 5 – Valores médios e desvio padrão do perímetro (em μm) das células luteais bovinas (grande, pequena e intermediária) de fêmeas taurinas e zebuínas.

Animais	Células Luteais Grandes	Células Luteais Pequenas	Células Luteais Intermediárias
Grupo A	106,82 $\pm$ 14,17 [*]	56,11 $\pm$ 4,78 [*]	79,22 $\pm$ 4,82 [*]
Grupo B	102,91 $\pm$ 12,04 [*]	56,32 $\pm$ 6,43 [*]	76,52 $\pm$ 3,39 [*]
Grupo C	102,24 $\pm$ 10,50 [*]	55,66 $\pm$ 6,68 [*]	76,22 $\pm$ 3,24 [*]
Grupo D	100,75 $\pm$ 8,08 [*]	54,75 $\pm$ 5,93 [*]	76,23 $\pm$ 3,00 [*]

^{*} P> 0,05 pelo Teste de Wilcoxon rank-sum.

Legenda:

Grupo A – fêmeas zebuínas do início do ciclo estral (3 – 5 dias).

Grupo B – fêmeas taurinas do início do ciclo estral (3 – 5 dias).

Grupo C – fêmeas zebuínas do final do ciclo estral (16 – 18 dias).

Grupo D – fêmeas taurinas do final do ciclo estral (16 – 18 dias).

No que se refere ao perímetro médio não foi observada diferença entre taurinos e zebuínos (p<0,05) nos três tipos celulares: grandes, pequenas e

intermediárias, também neste parâmetro analisado, não há registro de outros autores.

Tabela 6 – Valores médios e desvio padrão do diâmetro (em μm) das células luteais bovinas (grande, pequena e intermediária) de fêmeas taurinas e zebuínas.

Animais	Células Luteais Grandes	Células Luteais Pequenas	Células Luteais Intermediárias
Grupo A	31,66 $\pm$ 5,32 *	16,60 $\pm$ 1,99 *	23,14 $\pm$ 0,98 *
Grupo B	30,65 $\pm$ 4,51 *	16,58 $\pm$ 2,61 *	22,82 $\pm$ 1,54 *
Grupo C	30,14 $\pm$ 4,06 *	16,35 $\pm$ 2,63 *	22,43 $\pm$ 2,90 *
Grupo D	29,83 $\pm$ 4,04 *	16,08 $\pm$ 2,38 *	22,20 $\pm$ 1,88 *

* $P > 0,05$ pelo Teste de Wilcoxon rank-sum.

Legenda:

Grupo A – fêmeas zebuínas do início do ciclo estral (3 – 5 dias).

Grupo B – fêmeas taurinas do início do ciclo estral (3 – 5 dias).

Grupo C – fêmeas zebuínas do final do ciclo estral (16 – 18 dias).

Grupo D – fêmeas taurinas do final do ciclo estral (16 – 18 dias).

O diâmetro médio das células luteais pequenas e grandes foram de aproximadamente 16 e 30 μm , corroborando com os achados por LEI et al. (1991) em taurinos, para as células pequenas em qualquer fase do ciclo e para as grandes no final do ciclo, sendo diferentes no início e no meio do ciclo estral, onde elas se equivaleram em tamanho às células luteais intermediárias do presente estudo. Já ROBINSON et al. (2006) também trabalhando com taurinos, encontrou valores de diâmetro celular diferentes para luteais pequenas e grandes, sendo que esta última, não teve diâmetro maior que 20 μm . Percebe-se que não há ainda uma padronização para classificação celular tomando como referência o diâmetro médio de cada uma. Nos resultados obtidos e demonstrados na Tabela 6, observa-se tendência do diâmetro médio das células luteais grandes, pequenas e intermediárias das fêmeas zebuínas ser maior que o diâmetro das fêmeas taurinas, tanto no início quanto no final do ciclo estral, apesar de não ter observado diferença ($p < 0,05$). Não há diferença no diâmetro das células luteais grandes, pequenas e intermediárias ($p > 0,05$), do início para o final do ciclo estral, contrariando os achados por ROBINSON et al. (2006) onde o diâmetro da população de células

luteais pequenas não foi afetado pela idade do CL, enquanto que o tamanho da célula luteal grande aumentou no dia cinco ao dia oito, não suportando a hipótese levantada por estes autores que as grandes células luteais sofrem hipertrofia durante o desenvolvimento inicial do CL.

Quanto às características ultra-estruturais das células luteais, aparentemente, a análise das eletronicografias não demonstram diferenças relevantes entre as células luteais grandes de animais zebuínos e taurinos, tanto no início, como no final do ciclo estral.

Nos achados (Figura 3) verificou-se a presença de mitocôndrias circulares em ambas as células luteais pequenas e grandes em qualquer fase do ciclo estral, independentemente da subespécie estudada, taurina ou zebuína. Nas células luteais grandes verificou-se ainda a presença de mitocôndrias alongadas, fato este que não ocorreu nas células luteais pequenas.

As células luteais grandes apresentaram um núcleo grande, centralizado, com a presença de grânulos citoplasmáticos elétron-densos espalhados pelo citoplasma, verificando-se ainda a presença de raras gotas lipídicas no citoplasma, concordando com os achados por WEBER et al. (1987) e FIELDS & FIELDS (1996). Neste tipo celular não foram encontradas as junções de aderência entre duas células grandes adjacentes, corroborando com REDMER et al. (1991), WEBER et al. (1987) e FIELDS & FIELDS (1996).

Nas células luteais pequenas o núcleo apresentou-se em formato de taça, verificou-se a presença de gotas lipídicas no citoplasma em grande quantidade, mostrando ainda pouquíssimos grânulos elétron densos citoplasmáticos, corroborando com os achados por WEBER et al. (1987) e FIELDS & FIELDS (1996). Nos limites entre estes tipos celulares adjacentes, verificou-se a presença de junções de aderência e digitações, concordando com WEBER et al. (1987), FIELDS & FIELDS (1996) e REDMER et al. (1991) que encontraram células luteais pequenas com contato através das junções do tipo "gap" entre elas, e entre elas e as luteais grandes.

Segundo MILVAE et al. (1996), os grânulos secretórios presentes em ambas células luteais grandes e pequenas, podem conter hormônios tais como oxitocina, neurofisina, relaxina, além da progesterona.

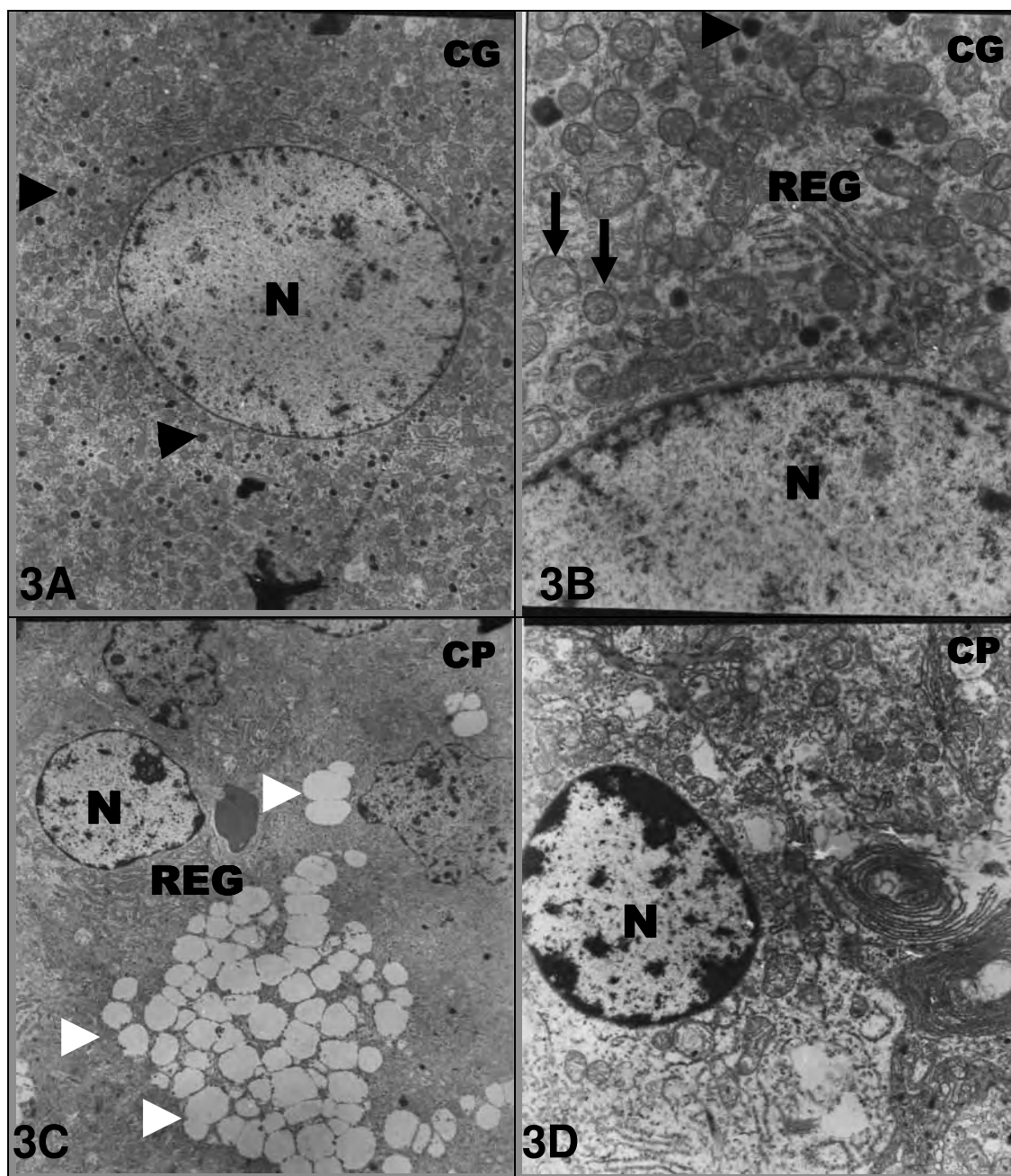


Figura 3 – Eletronmicrografias de Corpo Lúteo. Célula luteal grande (CG); Célula luteal pequena (CP); Núcleo (N); Retículo endoplasmático granular (REG); Cabeça de seta preta - grânulos eletron-densos espalhados pelo citoplasma; Cabeça de seta branca – gotas lipídicas espalhadas pelo citoplasma. Seta preta - mitocôndrias esféricas espalhadas pelo citoplasma. 3A - fêmea taurina no início do ciclo estral (Aumento: 3.000x). 3B - fêmea zebuína no início do ciclo estral (Aumento: 12.000x). 3C - fêmea zebuína no início do ciclo estral. Núcleo (N) em formato de taça (Aumento: 4.400x). 3D - taurina no início do ciclo estral (Aumento: 7.000x).

5 – CONCLUSÕES

A quantidade de células luteais pequenas é maior que a de células grandes, tanto no início, quanto no final do ciclo estral, independentemente da subespécie (taurina ou zebuína). Há ainda maior proporção de células pequenas em relação às grandes e intermediárias no início e final do ciclo, tanto em taurinos quanto em zebuínos.

Os valores médios da área, do perímetro e do diâmetro mostraram-se diferentes, porém sem diferença ($p>0,05$) quer seja no início ou no final do ciclo estral, quer seja na subespécie trabalhada - taurina ou zebuína.

Não houve diferenças entre estruturas celulares de células luteais grandes ou células luteais pequenas de fêmeas taurinas e zebuínas, no início e final do ciclo estral.

6 – REFERÊNCIAS

ABDELGADIR, S. E et al. Prostaglandin F₂ α induced release of oxytocin from bovine corpora lutea. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 37, p.550 – 555, 1987.

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

ACOSTA, T. J. et al. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F₂ α injection in the cow. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, p.651 – 658, 2002.

AROSH, J. A. et al. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. **Endocrinology**, Baltimore, v. 45, n. 5, p. 2551 – 2560, 2004.

BAIRD, D. T. The ovary. In: AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. **Reproduction in mammals Book 3**: hormonal control of reproduction. New York: Cambridge University Press, 1987. p. 91 – 114.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Editora Manole, 1991. 655 p.

BARUSELLI, P. S. et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, n. 1, p. 77 – 88, 2006.

BEAL, W. E. Application of knowledge about corpus luteum function in control of estrus and ovulation in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, n. 7, p. 1399 – 1411, 1996.

BERTAN, C. M. et al. Indução da ovulação em vacas com gonadotrofina corônica humana (hCG) purificada por cromatografia de afinidade. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 379 – 386, 2006.

BORGES, J. B. S.; GREGORY, R. M. Indução da atividade cíclica ovariana pós-parto em vacas de corte submetidas à interrupção temporária do aleitamento associada ou não ao tratamento com norgestomet-estradiol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 1105 – 1110, 2003.

CHACUR, M. G. M. et al. Morfometria de ovários de fêmeas zebu *Bos taurus indicus* coletados em matadouro. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, n. 1, p. 65 – 70, 2006.

CHEGINI, N.; RAMANI, N.; RAO, C. V. Morphological and biochemical characterization of small and large bovine luteal cells during pregnancy. **Molecular Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 89 – 102, 1984.

CHOUDHARY, E. et al. Development sensivity of the bovine corpus luteum to prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) and Endothelin – 1 (ET-1): Is ET-1 a mediator of the luteolytic actions of PGF₂ α or a tonic inhibitor of progesterone secretion?. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 72, n. 3, p. 633 – 642, 2005.

DAVIS, J. S.; MAY, J. V.; KEEL, B. A. Mechanisms of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, n.7, p.1351 – 1380, 1996.

FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, n. 7, p. 1295 – 1325, 1996.

FIELDS, M. J. et al. Characterization of large luteal cells and their secretory granules during the estrous cycle of the cow. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 46, p. 535 – 545, 1992.

FONSECA, J. F. et al. Estádios de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 6, p. 671 – 676, 2001.

GALINA, C. S.; ORIHUELA, A.; DUCHATEAU, A. Reproductive physiology in Zebu cattle – Unique reproductive aspects that affect their performance. **Veterinary Clinics of North America**, Philadelphia, v. 3, n. 3, p. 619 – 632, 1987.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. Ciclos Reprodutivos. In: _____. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Editora Manole, 2004. cap. 4, p. 55 – 67.

HANSEL, W.; BLAIR, R. M. Bovine corpus luteum: A historic overview and implications for future research. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, n.7, p. 1267 – 1294, 1996.

HORN, M. M.; MORAES, J. C.; GALINA, C. S. Qualidade do sêmen de touros Aberdeen Angus e Ibagé frente a degeneração testicular experimental. **Archivos Latinoamericanos Producción Animal**, Mayagüez, v. 5, supl. 1, p. 356 – 358, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427 p.

KOBAYASHI, S. et al. Intraluteal release of Angiotensin II and progesterone in vivo during corpora lutea development in the cow: effect of vasoactive peptides. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, n. 1, p.174 – 179, 2002.

KORZEKWA, A. J. et al. Effects of prostaglandin F-2 alpha and nitric oxide on the secretory function of bovine luteal cells. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 50, n. 4, p. 411 – 417, 2004.

KORZEKWA, A. J. et al. Nitric oxide induces apoptosis in bovine luteal cells. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 52, n.3, p. 353 – 361, 2006.

LEI, Z. M.; CHEGINI, N.; RAO, C. V. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive status. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 44, n. 6, p. 1148 – 1156, 1991.

LEYMARIE, P.; MARTAL, J. The corpus luteum from cycle to gestation. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses, 1993. p. 413 – 459.

LIMA, F. S. et al. Protocolos de sincronização de cio em vacas nelore solteiras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 3, p. 442 – 444, 2003.

MAMLUK, R. et al. Characterization and regulation of type A endothelin receptor gene expression in bovine luteal cell types. **Endocrinology**, Baltimore, v. 140, n. 5, p.2110 – 2116, 1999.

MILVAE, R. A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F2 α in corpus luteum function. **Reviews of Reproduction**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 1 – 5, 2000.

MILVAE, R. A.; HINCKLEY, S. T.; CARLSON, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, n. 7, p.1327 – 1349, 1996.

MILVAE, R. A. et al. Bovine corpus luteum function after removal of granulosa cells from the preovulatory follicle. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 8. p.439 – 443, 1991.

MYAMOTO, A. et al. Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 29, p. 329 – 339, 2005.

NASCIMENTO, A. A. et al. Correlação morfométrica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estádios reprodutivos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 126 – 132, 2003.

NEVES, M. M.; MARQUES JR., A. P. Tamanho da amostra para estudo da proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo bovino. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 81 – 85, 2002.

OKUDA, K. et al. Estradiol-17 β is produced in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 6, p.1634 – 1639, 2001.

O'SHEA, J. D.; RODGERS, R. J.; D'OCCHIO, M. J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 85, p.483 – 487, 1989.

PARRY, D. M.; WILLCOX, D. L.; THORBURN, G. D. Ultrastructural and cytochemical study of the bovine corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 60, p. 349 – 357, 1980.

PATE, J. L. Intercellular communication in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, n. 7, p. 1381 – 1397, 1996.

REDMER, D. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REYNOLDS, L. P. Contact-dependent intercellular communication of bovine luteal cells in culture. **Endocrinology**, Baltimore, v. 129, p. 2757 – 2766, 1991.

ROBINSON, R. S. et al. Endocrine and cellular characteristics of corpora lutea from cows with a delayed post-ovulatory progesterone rise. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 31, n. 1, p. 154 – 172, 2006.

RODGERS, R. J.; O'SHEA, J. D.; BRUCE, N. W. Morphometric analysis of the cellular composition of the ovine corpus luteum. **Journal of Anatomy**, London, v. 138, n. 4, p. 757 – 769, 1984.

RODGERS, R. J.; MITCHELL, M. D.; SIMPSON, E. R. Secretion of progesterone and prostaglandins by cells of bovine corpora lutea from three stages of the luteal phase. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 118, n. 1, p. 121 – 126, 1988.

SAKAMOTO, K. et al. Expression of mRNA encoding the prostaglandin F_{2α} receptor in bovine corpora lutea throughout the oestrous cycle and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 103, n. 1, p. 99 – 105, 1995.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle – an overview. **Reproduction of Domestic Animals**, Berlin, v. 39, n. 1, p. 241 – 251, 2004.

SMITH, M. F.; McINTUSH, E. W.; SMITH, G. W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 7, p. 1857 – 1872, 1994.

TEIXEIRA, A. B. **Responsividade do corpo lúteo de fêmeas da raça Nelore à administração, intramuscular ou intralábio vulvar, de análogos da Prostaglandina F2 α** . 2000. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

TEODORO, R. L. et al. Resistência bovina ao carrapato *Boophilus microplus*: experiência brasileira. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004, Pirassununga. **Anais...** p. 1-7.

TURNER, A. S.; MCILWRAITH, C. W.; **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo: Editora Roca, 1985. 341 p.

VENABLE, J. H.; COGGESHALL, R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 25, n. 10, p. 407, 1965.

VERÍSSIMO, C. J. **Resistência e susceptibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato *Boophilus microplus***. 1991. 170 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1991.

VIANA, J. H. M. et al. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 3, p. 251 – 256, 1999.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections of electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, New York, v. 4, n. 4, p. 475-478, 1958.

WEBER, D. M. et al. Functional differences between small and large luteal cells of the late-pregnant vs. nonpregnant cow. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 37, n. 3, p.685 – 697, 1987.

WILTBANK, M. C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, p.1873 – 1883, 1994.

WILTBANK, M. C. Regulation of the ovary in cattle. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2., 1998, Passos. **Anais ...** Passos: CONAPEC JR. & CBRA, 1998. p. 1 – 13.

WRIGHT, M. F. et al. Prostaglandin F2 α regulation of the bovine corpus luteum endothelin system during the early and midluteal phase. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 6, p. 1710 – 1717, 2001.