

LUIZ GUSTAVO BRUNO SIQUEIRA

USO DA ANÁLISE COMPUTACIONAL DE IMAGENS ULTRA-
SONOGRÁFICAS NA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO LUTEAL EM
BOVINOS

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S618u
2007

Siqueira, Luiz Gustavo Bruno, 1982-

Uso da análise computacional de imagens ultra-
sonográficas na avaliação da função luteal em bovinos /
Luiz Gustavo Bruno Siqueira. – Viçosa, MG , 2007.
xvii, 100f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bovino de leite - Reprodução. 2. Corpo lúteo.
3. Progesterona. 4. Estro. 5. Bovino - Transferência de
embriões. 6. Ultra-som. 7. Processamento de imagens.
8. Visão por computador. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.2082

LUIZ GUSTAVO BRUNO SIQUEIRA

USO DA ANÁLISE COMPUTACIONAL DE IMAGENS ULTRA-
SONOGRÁFICAS NA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO LUTEAL EM
BOVINOS

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2007

Prof. João Henrique Moreira Viana
(Co-orientador)

Prof. José Domingos Guimarães
(Co-orientador)

Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho

Prof. Eduardo Paulino da Costa

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Orientador)

Aos meus pais, José Luiz e Rachel, que me apoiaram em todos os momentos da minha vida.

Ao meu avô, José Carlos Moreira Bruno (in memoriam), exemplo de caráter e honestidade que tento seguir e honrar e que, de alguma forma, me apoiou durante todos os anos de estudo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, instituição que aprendi a amar e me orgulhar, pela oportunidade da realização dos cursos de graduação e mestrado.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Gado de Leite, por ceder o local, animais e materiais necessários à realização dos experimentos e pelo suporte financeiro.

Ao Departamento de Zootecnia da UFV, pela oportunidade de realizar o programa de Pós-Graduação.

Ao Professor orientador Ciro Alexandre Alves Torres, pela orientação, conselhos, ensinamentos e confiança durante o curso.

Ao Pesquisador da Embrapa e co-orientador, João Henrique Moreira Viana, pela orientação, colaboração indispensável na realização dos experimentos, por estar sempre disposto a me ajudar e corrigir os meus erros, pela dedicação imprescindível na finalização da dissertação, incentivo profissional, e sobretudo amizade que foi construída e consolidada durante mais de um ano de trabalho juntos.

Ao conselheiro Prof^o. José Domingos Guimarães, pela participação na banca examinadora e pelos incentivos profissionais iniciais, desde os tempos da graduação em Medicina Veterinária.

Aos Professores Giovanni Ribeiro de Carvalho e Eduardo Paulino da Costa pela participação na banca examinadora.

Ao Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, por emprestar gentilmente a placa de captura de vídeo, sem a qual não seria possível a realização do estudo.

Ao Del (Gilmar), técnico do laboratório de Reprodução Animal de Embrapa Gado de Leite, pela valiosa ajuda na realização dos experimentos, ensinamentos, pela parceria, companheirismo, incentivo e pela amizade construída e consolidada neste ano de trabalho.

Ao José Maurício Franklin Amaral e José Cardoso Macedo Filho, médicos veterinários de extrema competência, por terem possibilitado a avaliação das receptoras de embriões e pela confiança depositada no meu trabalho. Também, pelos momentos sérios e divertidos que passamos juntos nos intermináveis dias de trabalho.

Aos proprietários das fazendas que autorizaram a avaliação das receptoras de embriões, compreendendo a importância da pesquisa.

Ao pesquisador da Embrapa Caprinos, Jeferson Ferreira da Fonseca, pelos conselhos, incentivo e amizade.

Ao pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Rui da Silva Verneque, pela ajuda nas análises estatísticas.

A todos os funcionários da Embrapa Gado de Leite, especialmente ao Miltinho e ao sr. Natalino, funcionários do Campo Experimental de Coronel Pacheco, pelo apoio durante a realização dos experimentos.

À Fernanda Saules Ignácio, grande companheira e incentivadora. Obrigado por ter sido paciente nos momentos críticos e pela confiança depositada em mim.

Aos amigos e colegas de pós-graduação Paulo Gustavo Martins (PG), Herbert Rovay (Lafon), Miller Pereira Palhão, Reno Roldi Araujo e Lincoln da Silva Amorim pelos bons momentos de diversão e trabalho que passamos juntos. O incentivo dos amigos foi imprescindível.

Aos amigos de Viçosa, da minha turma (Vet-2000) e todos os outros que conheci e com os quais convivi por longo tempo.

Aos amigos do Laboratório de Reprodução Animal DZO/UFV, Elenice Moraes, Lincoln Amorim, Nadja Alves, Anselmo Santos, Marilu Gioso, Chico Rennó e Paula Balbinot.

Aos estagiários, Eliza Diniz de Souza, Pedro Leopoldo e Thiago Ferreira, pela ajuda valiosa, sem a qual seria impossível a realização dos experimentos de campo.

Aos colegas de Embrapa, Lincoln, Álcio, André, Alberto, Eduardo Arashiro, Rebeca, Mariana, Deborah, Raquel, Isabela, Alessandra, Fabrício, Miro e Joel, pela convivência sempre agradável.

A todas as pessoas que, eventualmente, eu possa ter esquecido de agradecer, mas que fizeram parte de bons momentos durante a minha vida acadêmica.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Luiz Gustavo Bruno Siqueira, filho de José Luiz De Poli Siqueira e Rachel Bruno Siqueira, nasceu na cidade do Rio de Janeiro, RJ, em 15 de março de 1982.

Em fevereiro de 2000 iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se em janeiro de 2005.

Em março de 2005 iniciou o curso de pós-graduação em Zootecnia, em nível de mestrado, área de concentração Fisiologia e Reprodução Animal, pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Em fevereiro de 2007 submeteu-se à defesa de tese para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Formação do Corpo Lúteo e função luteal.....	4
2.2. Princípios básicos da ultra-sonografia.....	7
2.3. Ultra-sonografia em Medicina Veterinária.....	8
2.4. Análise computacional de atributos de imagens de ultra-som.....	10
2.5. Análise computacional de imagens de corpos lúteos.....	11
2.6. Análise computacional de imagens de folículos ovarianos.....	13
2.7. Perspectivas futuras da análise computacional de imagens.....	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
 CAPÍTULO 1.....	 21
METODOLOGIA E PROCEDIMENTOS PARA CAPTURA E ANÁLISE COMPUTACIONAL DE IMAGENS ULTRA- SONOGRÁFICAS DE CORPOS LÚTEOS BOVINOS.....	 21
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1. Período experimental, local de realização e animais.....	25
2.2. Ultra-sonografia e procedimentos para captura e análise de imagens..	25
2.3. Definição da área mínima representativa.....	28
2.4. Determinação do sistema de captura.....	29
2.6. Análises estatísticas.....	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1. Definição da área mínima representativa.....	31
3.2. Determinação do sistema de captura.....	33

	Página
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
CAPÍTULO 2.....	36
USO DA ANÁLISE COMPUTACIONAL DE IMAGENS DE ULTRA- SOM NA AVALIAÇÃO DA ECOTEXTURA LUTEAL E SUA RELAÇÃO COM A CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA PLASMÁTICA DURANTE O CICLO ESTRAL DE NOVILHAS MESTIÇAS (<i>Bos taurus taurus</i> x <i>Bos taurus indicus</i>).....	36
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	38
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1. Experimento 1 – Análise computacional de imagens ultra- sonográficas de corpos lúteos bovinos durante um ciclo estral com luteólise natural.....	41
2.1.1. Período experimental, local de realização e animais.....	41
2.1.2. Ultra-sonografia e captura de imagens.....	41
2.1.3. Análise computacional das imagens.....	42
2.1.4. Coletas de sangue.....	43
2.1.5. Análises estatísticas.....	43
2.2. Experimento 2 – Análise computacional de imagens ultra- sonográficas de corpos lúteos bovinos durante um ciclo estral com luteólise induzida pela aplicação de um análogo sintético da prostaglandina F _{2alpha}	44
2.2.1. Período experimental, local de realização e animais.....	44
2.2.2. Ultra-sonografia, aquisição e análise computacional de imagens...	44
2.2.3. Coletas de sangue.....	45
2.2.4. Análises estatísticas.....	45
3. RESULTADOS.....	46
3.1. Experimento 1.....	46
3.2. Experimento 2.....	52
4. DISCUSSÃO.....	59

	Página
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
CAPÍTULO 3.....	72
POTENCIALIDADE DO USO DA ANÁLISE COMPUTACIONAL DA ECOTEXTURA DE CORPOS LÚTEOS BOVINOS COMO FERRAMENTA PARA TRIAGEM E SELEÇÃO DE RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS.....	72
RESUMO.....	73
ABSTRACT.....	74
1. INTRODUÇÃO.....	75
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.1. Período experimental, local de realização e animais.....	77
2.2. Exame ultra-sonográficos e transferência de embriões.....	77
2.3. Análises estatísticas.....	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
APÊNDICES.....	96

LISTA DE TABELAS

	Página
 CAPÍTULO 2	
Tabela 1 - Correlações de Pearson entre variáveis analisadas no experimento 1.....	51
Tabela 2 - Correlações de Pearson entre variáveis analisadas no experimento 2.....	57
 CAPÍTULO 3	
Tabela 1 - Média±EPM da [P ₄] plasmática no 7º dia do ciclo estral de fêmeas bovinas que possuíam corpo lúteo cavitário ou sem cavidade.....	80
Tabela 2 - Média±EPM da concentração de progesterona plasmática no 7º dia do ciclo estral de receptoras de embrião bovino, diagnosticadas posteriormente como gestantes ou não gestantes, e que receberam embriões TE ou PIV.....	82
Tabela 3 - Taxas de gestação (%) em receptoras de embriões bovinos de acordo com a [P ₄] plasmática no dia da transferência dos embriões (D7).....	84
Tabela 4 - Média±EPM da área do corpo lúteo em receptoras de embriões bovinos, gestantes e não gestantes que receberam embriões TE ou PIV.....	85
Tabela 5 - Média±EPM da área de tecido luteal em receptoras de embriões bovinos, gestantes e não gestantes que receberam embriões TE ou PIV.....	85
Tabela 6 - Correlações de Pearson entre área do corpo lúteo e área de tecido luteal e a [P ₄] plasmática no 7º dia do ciclo estral de receptoras de embriões bovinos.....	86
Tabela 7 - Média±EPM dos valores médios de pixels em imagens de corpos lúteos de receptoras de embrião bovino, gestantes e não gestantes que receberam embriões TE ou PIV.....	87

		Página
Tabela 8 -	Média da heterogeneidade dos pixels em imagens de corpos lúteos de receptoras de embrião bovino, gestantes e não gestantes que receberam embriões TE ou PIV.....	88
Tabela 9 -	Correlações de Pearson entre parâmetros avaliados por análise computacional de imagens e características do corpo lúteo e [P ₄] plasmática, em bovinos.....	88

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	Página
Figura 1 - Aparelho de ultra-som utilizado nos experimentos, conectado ao videocassete usado na gravação das imagens.....	26
Figura 2 - Software utilizado na análise computacional das imagens. Após a digitalização de uma imagem de CL, uma área amostral foi selecionada e os valores de cada pixel contidos naquela região, quantificados numericamente, em escala de 0 a 255.....	27
Figura 3 - Histogramas de regiões distintas que apresentam diferentes valores de heterogeneidade. Na região (A) os valores de pixel são homogêneos e pouco distribuídos na escala de 256 tons de cinza, levando a um valor de heterogeneidade menor. Já na região (B), os valores se distribuem mais na escala de 256 tons, representando uma região mais heterogênea.....	28
Figura 4 - Representação do modo de análise para comparação dos dois sistemas de captura de imagem. Duas imagens do corpo lúteo, em um mesmo instante, foram digitalizadas diretamente para um computador; ou gravadas em fita VHS e digitalizadas posteriormente. A imagem da esquerda foi gravada em fita VHS e a imagem da direita foi digitalizada diretamente para o computador. A análise computacional foi feita no mesmo momento e utilizando a mesma área amostral para os dois sistemas de captura.....	30
Figura 5 - Variações percentuais dos valores médios de pixel obtidos utilizando áreas amostrais decrescentes, no 7º e no 10º dias do ciclo estral. A linha horizontal pontilhada indica o máximo de variação (5%) que poderia haver em relação à maior área (1,00 cm²), seguindo o critério previamente proposto.....	31

CAPÍTULO 2

Figura 1 -	Média±EPM da área de tecido luteal durante o ciclo estral. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey ($P<0,05$).....	47
Figura 2 -	Média±EPM da $[P_4]$ plasmática durante o ciclo estral, sem correção para momento da luteólise. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey ($P<0,05$)....	47
Figura 3 -	Média±EPM da $[P_4]$ plasmática (▲) e dos valores de pixel (colunas) durante o ciclo estral natural.....	48
Figura 4 -	Média±EPM da $[P_4]$ plasmática (▲) e da heterogeneidade dos pixels (colunas) durante o ciclo estral natural.....	49
Figura 5 -	Média±EPM da $[P_4]$ plasmática ao longo o ciclo estral, após correção para o momento da luteólise natural. Médias seguidas de letras diferentes diferiram pelo teste Tukey ($P<0,05$).....	50
Figura 6 -	Média±EPM da $[P_4]$ plasmática (●) e dos valores médios dos pixels (colunas) durante o ciclo estral em bovinos, após correção para o momento da luteólise natural.....	51
Figura 7 -	Média±EPM da $[P_4]$ plasmática (●) e da heterogeneidade dos pixels (colunas) durante o ciclo estral em bovinos, após correção para o momento da luteólise natural. Médias seguidas de letras diferentes, nas colunas, diferiram entre si pelo teste Tukey ($P<0,01$).....	52
Figura 8 -	Média±EPM da área de tecido luteal em bovinos, mensurada por exame ultra-sonográfico obtidos por via transretal durante os dias iniciais do ciclo estral e após a aplicação da $PGF_{2\alpha}$. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey ($P<0,05$).....	53
Figura 9 -	Média±EPM da $[P_4]$ plasmática no início do ciclo estral e após a aplicação de um análogo da $PGF_{2\alpha}$ no 10º dia do ciclo, em bovinos. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey ($P<0,05$).....	54

	Página
Figura 10 - Médias da (●) [P ₄] plasmática e (▲) área de tecido luteal após a aplicação da PGF _{2α}	55
Figura 11 - Média±EPM dos valores médios de pixel nos dias do ciclo estral, em bovinos, e horas após a injeção de PGF _{2α}	55
Figura 12 - Média±EPM da heterogeneidade dos pixels ao longo do ciclo estral, em bovinos, e horas após a injeção de PGF _{2α}	56
Figura 13 - Média±EPM da [P ₄] plasmática (●) e dos valores de pixel (colunas) nos dias iniciais do ciclo estral em bovinos e após a aplicação da PGF _{2α} . Não houve diferença nos valores de pixel em função dos dias e após a PGF _{2α} (P>0,10). Também não foi observada correlação entre as duas variáveis (r = -0,28; P>0,10).....	56
Figura 14 - Média±EPM da [P ₄] plasmática (●) e da heterogeneidade dos pixels (colunas) nos dias iniciais do ciclo estral em bovinos e após a aplicação da PGF _{2α} . A heterogeneidade não variou em função dos dias e após a PGF _{2α} (P>0,10). Foi observada uma correlação negativa entre as duas variáveis (r = -0,48; P<0,05).....	57
Figura 15 - Distribuição dos valores médios de pixel (colunas) e da [P ₄] plasmática (▲) ao longo do ciclo estral bovino, de um animal experimental.....	58
Figura 16 - Distribuição da heterogeneidade dos pixels (colunas) e da [P ₄] plasmática (▲) ao longo do ciclo estral bovino, de um animal experimental.....	58
CAPÍTULO 3	
Figura 1 - Protocolo hormonal utilizado em receptoras para transferências de embriões em tempo fixo (Adaptado de NASSER et al., 2004).....	77

RESUMO

SIQUEIRA, Luiz Gustavo Bruno, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Uso da análise computacional de imagens ultra-sonográficas na avaliação da função luteal em bovinos.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-Orientadores: João Henrique Moreira Viana e José Domingos Guimarães.

Atributos de imagens de ultra-som, quantificados por análise computacional, têm o potencial de indicar o status fisiológico e funcional de corpos lúteos (CL). Ainda não foi estabelecido, contudo, um padrão de captura e processamento das imagens para bovinos. Os objetivos desta pesquisa foram estabelecer uma metodologia para aquisição, processamento e análise computacional de imagens; avaliar as mudanças morfológicas e de ecotextura do CL ao longo do ciclo estral natural ou após indução da luteólise; e verificar a eficiência da técnica de análise computacional na seleção e triagem de receptoras de embrião. No primeiro estudo, foram avaliados métodos de geração de imagens, sistemas de captura e área de amostragem mínima representativa. Para imagens geradas por via transretal (TR), a área mínima estabelecida foi de 0,25 cm² (4,42% de variação em relação à maior área). Foi constatada uma correlação nos valores médios de pixel ($r=0,99$; $P<0,001$) e heterogeneidade ($r=0,99$; $P<0,001$) entre imagens gravadas em fitas VHS e com digitalização direta. No segundo estudo, foram realizados dois experimentos: avaliação do ciclo natural ou após luteólise induzida no 10º dia do ciclo. No experimento 1, os parâmetros de ecotextura do CL foram analisados após o ajuste dos dados para o momento da luteólise. Em ambos os experimentos, o valor médio dos pixels não variou em função dos dias ($P>0,10$) e não foi observada relação entre a concentração de progesterona [P₄] plasmática e este parâmetro ($r = -0,39$ e $r = -0,28$; $P>0,10$). A heterogeneidade variou em função dos dias na luteólise natural ($P<0,01$), mas não na induzida ($P>0,10$). Ainda, foram observadas relações entre heterogeneidade e a [P₄] plasmática nos dois experimentos ($r = -0,69$ e $r = -0,48$; $P<0,05$). No terceiro estudo, receptoras de embrião ($n=259$) foram examinadas por ultra-sonografia no dia da transferência de embriões (TE). Foi feito o mesmo tipo de análise dos atributos das imagens previamente testado nos estudos 1 e 2. Foram transferidos embriões de boa qualidade (1 e 2) obtidos por superovulação convencional (TE; $n=94$) ou produzidos *in vitro* (PIV; $n=88$). As taxas de gestação foram de 56,4% e 30,2% para embriões TE e PIV, respectivamente. Nas receptoras TE, os valores de [P₄] plasmática foram maiores nos animais posteriormente diagnosticados como gestantes que nos não gestantes ($5,88\pm0,77$ vs $3,98\pm0,48$ ng/mL, respectivamente; $P<0,05$). No

entanto, nas receptoras PIV não houve diferenças entre gestantes ou não ($3,97 \pm 0,57$ vs $3,52 \pm 0,23$; $P > 0,10$). A área do CL e área de tecido luteal entre gestantes e não gestantes não diferiu. Não foram observadas diferenças nos valores médios ($71,80 \pm 1,29$ vs $71,19 \pm 1,14$; $P > 0,10$; escala de 0 a 255) e na heterogeneidade ($14,80$ vs $14,52$; $P > 0,10$) dos pixels, em receptoras gestantes ou não gestantes, que receberam embriões TE ou PIV. Os parâmetros de ecotextura (média dos pixels e heterogeneidade) apresentaram baixas relações com a $[P_4]$ plasmática ($0,17$ e $0,18$; respectivamente; $P < 0,01$). Conclui-se que as diferenças nos métodos de captura, processamento e análise de imagens devem ser consideradas quando se avalia a ecotextura luteal; a heterogeneidade, ao contrário do valor médio, de pixels em imagens ultrasonográficas é indicativo de funcionalidade e capacidade esteroidogênica da glândula luteal; e a análise computacional de imagens não foi eficiente no auxílio à seleção e triagem de receptoras de embriões, possivelmente pela forte influência que outras variáveis exercem sobre a taxa de gestação final.

ABSTRACT

SIQUEIRA, Luiz Gustavo Bruno, M.S. Universidade Federal de Viçosa, February 2007. **Use of computer-assisted ultrasound image analysis to evaluate bovine luteal function.** Adviser: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-Advisers: João Henrique Moreira Viana and José Domingos Guimarães.

Ultrasound image attributes, quantified by computer-assisted analysis, are a good indication of corpora lutea (CL) physiological and functional status. However, a standard method to capture and processing images has not been established for bovine. The purposes of this research were to establish a methodology for capture, processing and computer-assisted analysis; to evaluate CL morphological and echotexture changes throughout a natural estrous cycle or a luteolysis induced estrous cycle; and to determine whether computer-assisted analysis is efficient or not for embryo recipient selection. In the first study, evaluations were made of methods to capture images, systems of capture and the minimum representative sample area. For transrectal (TR) images, the minimum established area was 0.25 cm² (4.42% of the major area). A correlation was found in mean pixel values ($r = 0.9930$; $P < 0.001$) and heterogeneity ($r = 0.9861$; $P < 0.001$) between images videotaped or direct digitized. In a second study, two experiments were developed: natural estrous cycle and induced luteolysis (day 10) estrous cycle. Echotexture parameters of the CL, in the expt. 1, were analyzed after data adjustment to the onset of luteolysis. In both experiments, mean pixel values did not differ throughout the days of the cycle ($P > 0.10$) and there was no correlation between plasma progesterone and mean pixel value ($r = -0.39$ and $r = -0.28$; $P > 0.10$). Pixel heterogeneity varied through the days in a cycle with natural luteolysis ($P < 0.01$), but did not in a luteolysis induced cycle ($P > 0.10$). Correlations were observed between pixel heterogeneity and plasma P₄ in both of the experiments ($r = -0.69$ and $r = -0.48$; $P < 0.05$). In a third study, embryo recipients ($n=259$) were examined by transrectal ultrasonography on the embryo transfer day (ET). The same type of analysis was done to assess image attributes, as previously tested in the 1st and 2nd studies. Good quality embryos (grades 1 and 2) collected after conventional superovulatory treatment (MOET; $n=94$) or *in vitro* produced (IVP; 88) were transferred to the recipients. Pregnancy rates were 56.4% and 30.2% for MOET and IVP, respectively. Plasma progesterone concentration values were greater in the recipients later diagnosed as pregnant, than in non-pregnant (5.88 ± 0.77 vs 3.98 ± 0.48 ng/mL, respectively; $P < 0.05$). There was no difference in plasma P₄ between pregnant and non pregnant IVP

recipients (3.97 ± 0.57 vs 3.52 ± 0.23 ; $P > 0.10$). Corpus luteum and luteal tissue area did not differ between pregnant and non-pregnant animals. In addition, no difference in mean pixel values (71.80 ± 1.29 vs 71.19 ± 1.14 ; $P > 0.10$; scale of 0 to 255) and heterogeneity (14.80 vs 14.52 ; $P > 0.10$) was observed, between pregnant and non pregnant MOET or IVP recipients. Echotexture parameters (mean pixel value and heterogeneity) showed correlations with plasma P_4 (0.17 and 0.18, respectively; $P < 0.01$). In conclusion, differences between capture, processing and image analysis methods should be considered in luteal echotexture evaluation; if on one hand, pixel heterogeneity in ultrasound images is a strong indicative of functional status and steroidogenic capacity of luteal gland, on the other hand, mean pixel values are a poor indicator of these characteristics. Finally, in this approach computer-assisted analysis of ultrasound images was not efficient on embryo recipient selection, probably due to other variables which strongly influence overall pregnancy rate.

1. INTRODUÇÃO GERAL

No atual cenário mundial observa-se, por um lado, uma crescente demanda por alimentos para a população e, por outro lado, uma progressiva restrição nas áreas para produção agrícola e pecuária juntamente a uma maior preocupação com a preservação ambiental. O que se espera, ou deseja-se, é um aumento de produtividade com maior oferta de alimentos produzidos utilizando a menor área possível, tendo como base um sistema de produção viável e sustentável tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental. Sistemas de produção excessivamente extensivos ou baseados em ações tipicamente extrativistas tendem, portanto, a tornarem-se inviáveis, tanto para o agricultor/pecuarista quanto para a sociedade e o meio ambiente.

Dentro deste contexto, a exploração racional da pecuária tornou-se dependente da utilização de tecnologias desenvolvidas visando o melhoramento genético animal, o qual, aliado às melhorias no manejo e alimentação, proporciona avanço em produtividade e, conseqüentemente, maior retorno econômico na atividade agropecuária. Particularmente, quando se fala em biotecnologias aplicadas à reprodução animal, encontramos um cenário bastante favorável, no qual produtores e criadores vêm aceitando e aderindo às novas tecnologias e desfrutando de seus benefícios.

Esta crescente aceitação de biotecnologias pode ser constatada pelos dados da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) que mostram que, no ano de 2005 o Brasil tornou-se líder na produção de embriões nos países fora do eixo Estados Unidos - Canadá, com 107.217 embriões transferidos após superovulação e coleta de embriões convencional. No caso de embriões produzidos *in vitro* (PIV), o Brasil se destaca como líder mundial e leva a América do Sul ao topo do ranking, com 143.916 embriões PIV, respondendo por 50% da produção mundial (VIANA, 2006).

A transferência de embriões (TE) tem papel fundamental no aumento da eficiência produtiva e reprodutiva de rebanhos bovinos leiteiros ou de corte. Quando se utiliza esta técnica na produção animal, uma fêmea de alto valor genético pode produzir um número de descendentes muito superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante a sua vida reprodutiva. A TE fornece a base técnica para viabilizar a implementação de biotécnicas afins, como a produção de clones e de animais transgênicos. Para o melhoramento zootécnico, é um importante instrumento porque acelera e confere maior precisão ao processo de seleção animal (GONÇALVES et al., 2001).

Um dos fatores mais importantes que determinam o sucesso ou fracasso de um programa de TE é a seleção e triagem de receptoras de embrião. O cuidado na seleção dos animais utilizados pode ser decisivo para que se obtenham altas taxas de gestação (VIANA, 1996). Além dos critérios de seleção usuais (aspectos sanitários, nutricionais, patologias reprodutivas, etc) uma receptora deve estar em condição hormonal e uterina compatíveis com o estágio de desenvolvimento do embrião a ser transferido, ou seja, deve haver uma estreita sincronia entre a fase do ciclo estral da receptora e da doadora dos embriões no momento da coleta e transferência de embriões. Neste sentido, a presença de um corpo lúteo funcional, produzindo quantidades adequadas de progesterona, é condição *sine qua non* para o estabelecimento e manutenção da gestação.

A técnica de ultra-sonografia é um método de diagnóstico não-invasivo, portanto mais adequado nos exames em animais sem sedação; seguro para o paciente e o operador; não provoca alteração de parâmetros fisiológicos no paciente e permite a avaliação em tempo real do órgão em questão em um animal vivo (GONÇALVES et al., 2001; KING, 2006). O uso de aparelhos de ultra-som que geram imagens bi-dimensionais em tempo real (B-mode) possibilitou um avanço significativo no estudo da função reprodutiva, particularmente em áreas como dinâmica do crescimento folicular na fase antral, ovulação, função luteal e início de gestação. No caso específico da avaliação da função luteal, o emprego da ultra-sonografia confere maior precisão e acurácia na identificação do corpo lúteo. No entanto, na grande maioria das vezes em que o exame ultra-sonográfico é empregado, este se limita à identificação da presença e mensuração de diâmetro ou área do tecido luteal, e este tipo de mensuração não elimina completamente os erros de avaliação do corpo lúteo (PIETERSE et al., 1990).

Resumidamente, a ultra-sonografia está baseada na propriedade dos diferentes tecidos de refletir ondas sonoras de alta frequência. A ecotextura (padrão ultra-sonográfico) de um determinado tecido reflete diretamente sua estrutura histológica e a análise da ecogenicidade de uma imagem ultra-sonográfica do corpo lúteo permite uma estimativa do fluxo sanguíneo luteal e da produção de progesterona, mesmo sem o conhecimento prévio da fase do ciclo estral (TOM et al., 1998b). Estudos realizados no final do século passado começaram a utilizar diferenças de ecogenicidade como parâmetro de avaliação. A análise computacional de imagens permite identificar variações de ecotextura imperceptíveis ao olho humano, assim como mensurá-las de forma bastante objetiva, pelo estabelecimento de algoritmos computacionais. Esta

análise qualitativa do corpo lúteo pode contornar as inconsistências da avaliação visual subjetiva (SINGH et al., 2003).

As possíveis aplicações práticas desse tipo de tecnologia são evidentes, como no caso da avaliação da função luteal em receptoras bovinas no dia da transferência de embriões. A concentração plasmática de progesterona até o momento da TE (dia 7) pode ser utilizada para a rejeição de receptoras com função luteal anormal (CHAGAS e SILVA et al., 2002). A estimativa da produção de progesterona por meio da análise de uma imagem ultra-sonográfica do corpo lúteo pode tornar a triagem e a seleção de receptoras muito mais eficientes, particularmente nos casos em que são utilizadas doadoras de alto valor econômico e tecnologias de ponta que têm um custo elevado (transferência nuclear, transgenia), tornando o estabelecimento de cada gestação um fator de extrema importância. Levando em consideração todos esses fatores, a rigorosa seleção de receptoras tem grande importância e todo método que auxilie e aumente a acurácia deste processo deve ser levado em consideração.

Para que a análise computacional de imagens ultra-sonográficas seja utilizada rotineiramente, ainda são necessários estudos mais específicos que aumentem a confiabilidade do método empregado em situações de exame a campo. É importante o estabelecimento de padrões ideais nos valores de pixel (p.ex. intervalos de valores ideais) que reflitam a maior ou menor capacidade esteroidogênica do corpo lúteo. A combinação de ultra-sonografia em modo B e análise computacional da ecogenicidade tem as características de uma ferramenta de diagnóstico ideal por permitir avaliações contínuas e em tempo real da função ou disfunção de um órgão ou tecido.

Os objetivos deste estudo foram estabelecer uma metodologia de captura, processamento e análise computacional de imagens ultra-sonográficas de corpos lúteos bovinos, investigar a relação entre as características de ecotextura (valores de pixel) e a concentração de progesterona plasmática ao longo do ciclo estral e, ainda, verificar a eficiência da análise computacional de imagens como ferramenta na seleção e triagem de receptoras de embriões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Formação do Corpo Lúteo e função luteal

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina transitória necessária na gestação normal na maioria dos mamíferos (FRANKEL, 1903) que se desenvolve após a ruptura do folículo à ovulação (HAFEZ, 1995; FIELDS e FIELDS, 1996). O estabelecimento progressivo de um corpo lúteo funcional nos dias seguintes à ovulação implica em grandes mudanças morfológicas. Este processo de luteinização (luteogênese) envolve a transformação de um folículo pré-ovulatório em uma estrutura altamente vascularizada e capaz de secretar grandes quantidades de progesterona (SMITH et al., 1994; NISWENDER et al., 2000; SCHAMS e BERISHA, 2004), a qual é necessária ao estabelecimento e manutenção da gestação em várias espécies de mamíferos. A formação do CL é iniciada por uma série de mudanças morfológicas, endócrinas e bioquímicas nas células da teca interna e da granulosa do folículo pré-ovulatório. Sendo função principal do CL a secreção de progesterona (P_4) durante o ciclo estral e gestação, o seu desenvolvimento normal e a capacidade de produzir P_4 , fatores de crescimento, fatores angiogênicos e substâncias vasoativas são dependentes da vascularização, i.e., do suprimento sanguíneo (ACOSTA e MYIAMOTO, 2004).

Estudos sobre vascularização do corpo lúteo (NISWENDER et al., 1994; FRASER e WULFF, 2003) sugerem que o CL inicia a sua organização por meio de intensa atividade angiogênica na qual vasos sanguíneos invadem o espaço antral do folículo e há a formação de uma extensa e densa rede capilar que permite às células produtoras de hormônio obter oxigênio, nutrientes e precursores hormonais. Esta rápida vascularização das camadas celulares originárias das células granulosas pode estar relacionada à existência de atividade angiogênica no fluido folicular (SCHAMS e BERISHA, 2004), a qual, aparentemente, é induzida pela lise da membrana basal que separa células da teca e granulosa durante o período peri-ovulatório (THIBAUT, 1993). Durante o processo de luteinização, há significativa hipertrofia das células da granulosa, hiperplasia das células tecais (NISWENDER et al., 1994) e proliferação de células fibroblásticas (GONÇALVES et al., 2001). Macroscopicamente, este processo resulta na aquisição progressiva de tamanho, forma, consistência e padrão ecogênico do corpo lúteo (TOM et al., 1998b). Segundo Luck e Zhao (1995), está envolvido no processo de luteinização um extenso remodelamento tecidual (semelhante ao observado nos processos cicatriciais e em neoplasias), caracterizado por hiperplasia, hipertrofia e

migração celular, e por intensa angiogênese, com migração e proliferação de células endoteliais e desenvolvimento de rede capilar. Existe alta relação entre a concentração de P_4 plasmática e a massa e volume do corpo lúteo (MACIEL et al., 1992). A rede vascular é tão extensa que a maioria das células esteróidogênicas parece estar justaposta a um capilar sanguíneo (DHARMARAJAN et al., 1985; FIELDS et al., 1989). O extenso processo de angiogênese, característico da luteinização (SMITH *et al.*, 1994) é também responsável pelo padrão hipocogênico do corpo lúteo à ultra-sonografia (TOM *et al.*, 1998b).

Segundo Wiltbank (1994) o fluxo sanguíneo para o corpo lúteo é maior que para qualquer outro tecido no corpo. No diestro, de 65 a 95 % do fluxo sanguíneo do ovário é destinado ao corpo lúteo, e existe uma estreita relação anatômica entre as células luteais e endoteliais. O fluxo sanguíneo está diretamente relacionado à produção de progesterona, pois determina a disponibilidade de hormônios, nutrientes e substratos, e a remoção da progesterona produzida. Fatores que modulam o fluxo sanguíneo ovariano podem aumentar (LH, PGI_2) ou reduzir ($PGF_{2\alpha}$, catecolaminas) a esteroidogênese luteal.

Formado, o CL maduro é composto por pelo menos dois tipos de células esteroidogênicas (células luteais pequenas e grandes), que diferem morfológica e funcionalmente e também na sua origem folicular. As células luteais pequenas originam-se das células da teca e respondem ao hormônio luteinizante (LH) com aumento na secreção de P_4 , via ativação da proteína kinase A. As células luteais grandes são originárias das células da granulosa, contém receptores para $PGF_{2\alpha}$ e, aparentemente, fazem a mediação das ações luteolíticas deste hormônio, além de serem responsáveis por aproximadamente 80% da progesterona secretada *in vivo*, também via proteína kinase A (SMITH et al., 1994; FIELDS e FIELDS, 1996; NISWENDER et al., 2000). Grande parte do parênquima do CL é constituído por estas células luteais esteroidogênicas, no entanto, células de suporte respondem por aproximadamente 20% do volume e incluem elementos vasculares (células endoteliais e pericitos), macrófagos, células musculares lisas e fibroblastos (NISWENDER et al., 1994).

As células endoteliais, uma vez diferenciadas, normalmente permanecem funcionais por períodos de 2 a 3 anos, porém no CL, um ciclo não fértil resulta em luteólise estrutural e estes vasos sanguíneos recém-formados regredem em algumas semanas. Se houver gestação, a vida útil do CL e de sua vascularização é prolongada. Desta forma, em um curto espaço de tempo, o CL passa por um período de angiogênese, regressão controlada da vascularização no ciclo não fértil, ou manutenção dos vasos

sanguíneos por ocasião da gestação (FRASER e WULFF, 2003). Após a luteogênese, o volume do corpo lúteo atinge seu valor máximo antes da concentração de P_4 , e a variação na produção desta, observada após o 7º dia do ciclo, parece ser decorrente da maturação funcional do corpo lúteo, e não do aumento na massa de tecido luteal (VIANA et al., 1999b).

A prostaglandina $F_{2\alpha}$ é o hormônio luteolítico uterino em várias espécies de animais incluindo os bovinos e controla a vida útil do corpo lúteo, que por sua vez regula a extensão do ciclo (HAFEZ, 1995). Se não for estabelecida a gestação, i.e., não houver o reconhecimento materno da gestação, desencadeia-se uma cascata de eventos iniciada pela formação de receptores endometriais de ocitocina induzida pelos estrógenos produzidos pelo folículo pré-ovulatório, e que culmina na produção e liberação de $PGF_{2\alpha}$, em um feedback positivo com a ocitocina luteal (NISWENDER et al., 2000). A $PGF_{2\alpha}$ é um potente vasoconstritor e reduz o fluxo sanguíneo para o corpo lúteo (WEEMS et al., 2006) levando o CL à lise e posterior formação do corpo albicans. A presença de receptores para $PGF_{2\alpha}$ no corpo lúteo sugere que a prostaglandina exerce um efeito diretamente sobre o CL (PATE, 1994). A aceleração do catabolismo de P_4 , diminuição de enzimas luteais (colesterol esterase, colesterol sintetase) e redução no número de receptores para gonadotrofina (LH) também parecem ser ações mediadas pela $PGF_{2\alpha}$.

Iniciada a luteólise, há uma queda na progesterona sanguínea, diminuição do peso luteal, redução do tamanho das células luteais pequenas e grandes e interrupção da vascularização luteal (NISWENDER et al., 1994). Durante o processo de luteólise, a redução na concentração plasmática de progesterona resulta em valores basais em apenas 24 horas, enquanto a regressão do tecido luteal ocorre mais lentamente (VIANA et al., 1999a). Esta queda inicial da concentração de P_4 no sangue não ocorre devido à perda de células esteroideogênicas, visto que, o número de células luteais não diminui antes da concentração de P_4 , mas sim devido ao decréscimo no fluxo sanguíneo com conseqüente diminuição da capacidade esteroideogênica de cada célula luteal individualmente (NISWENDER et al., 2000). Mesmo sendo a $PGF_{2\alpha}$ o hormônio que inicia a luteólise funcional, mecanismos adicionais parecem ser necessários para a completa lise do corpo lúteo. Embora a luteólise englobe uma série de eventos sequenciais, a distinção entre mudanças funcionais e estruturais ajuda no entendimento de todo o processo. A regressão funcional do CL é caracterizada pelo decréscimo na produção de progesterona, e a regressão estrutural se manifesta como uma degradação do tecido luteal (PATE, 1994).

As variações na concentração de progesterona sanguínea ao longo da fase luteal do ciclo estral refletem os sucessivos estádios de crescimento, manutenção e regressão do corpo lúteo (THIBAULT, 1993). Há relatos da existência de uma relação entre as mudanças cíclicas no fluxo sanguíneo luteal e a concentração de progesterona no plasma de ovelhas e ratas (PANG *et al.*, 1979; BROWN *et al.*, 1980), demonstrando a estreita inter-relação entre a estrutura histológica do corpo lúteo (vascularização e células luteais) e a produção de progesterona por esta glândula.

Grande parte dos estudos iniciais de estruturas gonadais foi realizada por meio da observação visual e de cortes histológicos de amostras de tecido, após a retirada do órgão. Até mesmo os mais detalhados estudos deste tipo eram limitados, pois não conseguiam avaliar como estas estruturas se comportavam em um organismo vivo, e que tipos de mecanismos controlam processos fisiológicos. Embora o conhecimento adquirido por estudo de tecidos *ex vivo* deva ser considerado, um entendimento mais profundo das relações entre estrutura e funções fisiológicas não era possível devido à natureza estática dos exames. Somente após a introdução da ultra-sonografia em tempo real foi possível estudar eventos fisiológicos de maneira seriada, sem interrupção ou distorção da função do órgão, permitindo a visualização das mudanças que ocorrem no tecido vivo (SINGH *et al.*, 2003).

2.2. Princípios básicos da ultra-sonografia

Em extensa revisão, King (2006) relata a descoberta pelo casal Curie, em 1880, das propriedades piezoelétricas de alguns cristais que se deformavam quando lhes era aplicada eletricidade, produzindo ondas sonoras de alta frequência (até 20 KHz), conhecidas como ondas ultra-sônicas. O casal Curie notou ainda que o retorno das ondas aos cristais promovia sua reorganização e a conversão da energia mecânica em elétrica. As ondas acústicas do ultra-som são ondas de pressão, produzidas pela compressão e descompressão alternadas das moléculas dos tecidos adjacentes. Estas ondas de pressão são geradas pela vibração dos cristais com propriedades piezoelétricas, presentes no transdutor do aparelho, quando submetidos a correntes elétricas alternadas. Ainda, as ondas refletidas pelos tecidos são reconvertidas em pulsos elétricos, e estes pulsos, após serem amplificados e compensados para diferenças de intensidade, são utilizados por um receptor na geração de uma imagem bidimensional (VIANA, 1996). Resumidamente, os princípios da ultra-sonografia se baseiam na habilidade dos diferentes tecidos de refletir ondas sonoras de alta frequência. Uma onda de pressão

acústica é emitida a partir do transdutor piezoelétrico e transmitida aos tecidos adjacentes. A proporção da onda refletida (eco) pelas várias interfaces entre os tecidos é recebida pelo transdutor, convertida em energia elétrica, e mostrada na tela como uma imagem em escala de cinza (PIERSON e ADAMS, 1995).

Quando um pulso de ultra-som é direcionado a uma substância ou tecido, quantidades variadas das ondas são refletidas de volta à fonte (transdutor) de acordo com a natureza do material encontrado (KING, 2006). À medida que uma onda de ultra-som atravessa um tecido, parte é refletida na forma de um eco e parte prossegue interagindo com tecidos mais profundos. Substâncias anecóicas (p.ex. líquidos) não refletem as ondas e aparecem como áreas negras na imagem, enquanto tecidos hiperecóicos (p.ex. ossos) refletem grande parte das ondas e aparecem como áreas brancas. A imagem ultra-sonográfica representa, de forma aproximada, uma “fatia” do tecido em exame (PIERSON e ADAMS, 1995; VIANA, 1996).

O aparelho de ultra-som B-mode transmite e recebe ondas sonoras de alta frequência (geralmente entre 2-8 MHz) para criar uma imagem do tecido examinado em um plano seccional. A secção de tecido mostrada no monitor é a imagem gerada em matriz bi-dimensional, composta por “picture elements” ou “pixels” (TOM et al., 1998b). Uma imagem ultra-sonográfica é composta por fileiras de pixels exibidos em uma tela de vídeo. Milhares de pixels formam a imagem. Cada pixel é descrito por um tom de cinza, em escala de 256 tons (0 = preto; 255 = branco) e representa um discreto reflexo do tecido. A densidade e as características do tecido podem ser observadas por ultra-som, mas não quantificadas pelo olho humano. Diferentes percepções individuais da escala de cinza podem levar a variações extremas na interpretação da imagem (PIERSON e ADAMS, 1995).

2.3. Ultra-sonografia em Medicina Veterinária

Os primeiros relatos de aplicações da ultra-sonografia em veterinária surgiram em 1966, no diagnóstico de gestação em ovelhas. A partir daí, melhorias na qualidade dos equipamentos, combinadas com crescente aceitação nos benefícios da técnica levaram a uma utilização diversificada do ultra-som dentro da Medicina Veterinária (KING, 2006). Em meados da década de 80, no século passado, a utilização da técnica de ultra-sonografia para avaliação de tecidos moles em diversas espécies animais revolucionou as pesquisas em reprodução animal, aprimorando conhecimentos sobre estrutura e função gonadal (ovários e testículos) e patologias dos órgãos genitais, além

de ter permitido o melhor entendimento da fisiologia reprodutiva. A ultra-sonografia é um método de diagnóstico não invasivo, portanto mais tolerado nos exames em animais sem sedação; seguro para o paciente e o operador; não provoca modificações fisiológicas no paciente e permite a avaliação em tempo real, do órgão em questão, em um animal vivo (GONÇALVES et al., 2001; KING, 2006).

O advento da ultra-sonografia possibilitou um avanço significativo no estudo da função reprodutiva, particularmente em áreas como dinâmica do crescimento folicular na fase antral (ondas de crescimento), ovulação, função luteal e gestação inicial. Segundo Ginther (1986) o diagnóstico ultra-sonográfico em escala de cinza constituiu-se no mais profundo avanço tecnológico nas pesquisas com grandes animais e reprodução clínica, desde a introdução da palpação retal e do radioimunoensaio para análise de hormônios circulantes. Pela imagem de ultra-som é possível a avaliação do tamanho, forma, localização e textura do tecido em exame.

Um dos melhores exemplos do impacto causado por pesquisas com imagens na reprodução animal é a comprovação da teoria de crescimento folicular em ondas. Esta teoria foi originalmente proposta por Rajakoski, em 1960, após observações feitas em ovários de vacas sacrificadas em dias previamente conhecidos do ciclo estral. A controvérsia em relação ao assunto durou cerca de três décadas, até que surgissem os primeiros estudos com ultra-sonografia, nos anos 1980 (SINGH et al., 2003). Estudos da dinâmica folicular ovariana, divergência e dominância folicular e do momento da ovulação tem sido conduzidos nas diferentes raças e espécies, incluindo zebuínos (FIGUEIREDO et al., 1997, VIANA et al., 2000), possibilitando estabelecer e/ou adequar protocolos de manipulação hormonal da função reprodutiva, como superovulação, sincronização de estro e indução da ovulação. O conceito de ondas de crescimento folicular é tão importante que se tornou parte inerente nos delineamentos de experimentos que envolvem função ovariana, quer sejam de caráter básico ou aplicado. Mesmo levando-se em consideração as diferenças da fisiologia reprodutiva entre as diversas espécies animais (poliestrais, poliestrais estacionais, ovulação simples ou múltipla, induzida ou espontânea, etc.) o padrão básico de ondas no desenvolvimento folicular parece ser um fenômeno biológico amplamente disseminado (SINGH et al., 2003).

Tecnologias de imagem de ultra-som também possibilitaram estudos mais profundos sobre o corpo lúteo e função luteal (SINGH et al., 1997; TOM et al. 1998b; DAVIES et al., 2006), folículo gênese (SINGH et al., 1998; TOM et al., 1998a); produção de progesterona e crescimento/atresia folicular; magnitude da fase luteal

(concentração de progesterona e duração) e competência do folículo/oócito (VASSENA et al., 2003). O exame ultra-sonográfico tornou possível o monitoramento do desenvolvimento da glândula luteal (CL) seqüencialmente (PIERSON e GINTHER, 1987; KASTELIC e GINTHER, 1989), permitindo a avaliação do tamanho, forma, localização e consistência do corpo lúteo. A mensuração ultra-sonográfica, contudo, não elimina completamente os erros de avaliação do corpo lúteo (PIETERSE *et al.*, 1990). Também foram melhor caracterizadas patogenias das patologias ovarianas, como cistos foliculares e luteais (ADAMS, 2000), folículos hemorrágicos anovulatórios em éguas (GINTHER, 1992), e síndrome do ovário policístico em mulheres (PIERSON e CHIZEN, 1994). Paradoxalmente, grande parte dos estudos com emprego de ultra-sonografia limita-se à identificação da presença e mensuração de diâmetro ou área das estruturas, e apenas recentemente começou-se a utilizar diferenças de ecogenicidade como parâmetro de avaliação.

2.4. Análise computacional de atributos de imagens de ultra-som

A análise computacional dos atributos de imagens é uma extensão natural dos avanços em diagnóstico ultra-sonográfico. A técnica é baseada na identificação, quadro a quadro (pixel), da intensidade do retorno da onda ultra-sonográfica. Cada pixel que compõe a imagem representa um discreto reflexo do tecido e pode assumir um dos 256 valores da escala de cinza, que varia de preto (0) a totalmente branco (255) (SINGH et al., 1998). A combinação de milhares de pixels forma uma imagem. A densidade e as características do tecido podem ser observadas via ultra-som, mas não quantificadas pelo olho humano. Visualmente, podemos distinguir somente 18 a 20 tons de cinza, o que leva a diferentes percepções individuais e, conseqüentemente, variações na interpretação da imagem (PIERSON e ADAMS, 1995). A análise computacional permite identificar diferenças de ecotextura imperceptíveis ao olho humano, assim como mensurá-las de forma bastante objetiva, pelo estabelecimento de algoritmos computacionais. Estes algoritmos computacionais têm sido desenvolvidos especificamente para análises de imagens de ultra-som com o objetivo de reduzir as inconsistências da avaliação visual subjetiva, quantificando os valores de cada pixel da imagem (SINGH et al., 2003).

A ecotextura (i.e. padrão da imagem ultra-sonográfica) é determinada pela estrutura histológica do tecido em exame (GINTHER, 1995; SINGH et al., 1998; SINGH e ADAMS, 2000). Em várias espécies animais, diferenças no estágio fisiológico

estão associadas a variações na impedância acústica do tecido ovariano, relativas a mudanças macromoleculares e estruturais (CARNES e DUNN, 1988). Após a digitalização de uma imagem de ultra-som, esta pode ser manipulada como qualquer outro arquivo gráfico. Há diferentes métodos de análise, i.e., podem ser obtidos diferentes resultados, de acordo com a estrutura a ser analisada e o objetivo da análise. Na avaliação da ecotextura luteal, algumas áreas de interesse no corpo lúteo podem ser selecionadas e analisadas, gerando valores médios de pixel daquela região específica, o que possibilita a exclusão de áreas onde há artefatos de imagem que não representariam a real estrutura histológica. Os valores obtidos podem ser comparados entre diferentes porções da mesma imagem ou entre imagens de tempos distintos (SIQUEIRA et al., 2006). No caso de folículos ovarianos, pode ser utilizada a mesma técnica e as comparações podem ser feitas entre regiões do antro ou da parede folicular, a partir de imagens seqüenciais, a fim de detectar mudanças na característica do folículo em crescimento, dominância, atresia ou próximo à ovulação (TOM et al., 1998a).

2.5. Análise computacional de imagens de corpos lúteos

Em estudos ultra-sonográficos, a área de tecido luteal (KASTELIC et al., 1990) e ecotextura (SINGH et al., 1997) estão diretamente relacionados com as concentrações de progesterona circulante e glandular. Estudos de análise quantitativa da imagem de corpos lúteos bovinos sugerem que alterações na ecotextura luteal refletem mudanças no status fisiológico do CL (TOM et al., 1998b) e que a imagem ultra-sonográfica permite uma estimativa da concentração de progesterona (sanguínea e luteal), além das características histomorfológicas e hemodinâmicas do corpo lúteo (TOWSON e GINTHER, 1989; SINGH et al., 1997). No caso específico do corpo lúteo, estas diferenças refletem variações na vascularização e na proporção de células luteais e, conseqüentemente, na sua capacidade esteroidogênica (SINGH et al., 1997). Alterações na angiogênese, características dos períodos de luteogênese e luteólise, podem ser rapidamente identificadas pela variação na ecogenicidade da imagem ultra-sonográfica, desde que sejam utilizadas ferramentas apropriadas para análise da imagem.

Com o objetivo de determinar se mudanças quantitativas na ecotextura de corpos lúteos (CL) bovinos em diferentes estágios de desenvolvimento são reflexos das características estruturais e funcionais da glândula, Singh et al. (1997) obtiveram, *in vitro*, imagens de ovários de novilhas após ovariectomia em diferentes fases do ciclo estral (metaestro, diestro inicial, diestro e proestro). Após análise das imagens com

auxílio de um software de computador, observaram que os valores de pixel foram altos durante o metaestro, baixos durante todo o diestro, aumentando novamente na regressão do CL no proestro. Estes autores sugerem que uma ecotextura mais escura e homogênea no diestro, em relação às outras fases, está associada ao maior volume e maiores células luteais presentes nesta fase, e maior quantidade de componentes do estroma durante o metaestro e proestro. Ainda neste estudo, foram verificadas relações entre os valores médios de pixel e a densidade volumétrica de células luteais ($r = -0,75$), tecido conjuntivo ($r = 0,69$), componentes do estroma ($r = 0,75$), progesterona plasmática ($r = -0,71$) e concentração de progesterona no tecido luteal ($r = -0,72$). Os resultados levaram os autores a concluir que mudanças quantitativas nos valores de pixel de imagens ultra-sonográficas ocorrem concomitantemente a alterações nas características estruturais e endócrinas de corpos lúteos bovinos.

Em outro estudo, realizado *in vivo*, Tom et al. (1998b) examinaram os ovários de novilhas com ultra-sonografia por via transretal, realizando posteriormente análises computacionais da ecotextura das imagens obtidas. Os valores médios de pixel obtidos foram altos inicialmente (dias 0 e 1), diminuíram no dia 2 e permaneceram constantes até o início da regressão luteal (dia 14). No dia 18 do ciclo estral, estes valores aumentaram rapidamente até o momento da ovulação, sendo o valor máximo no final do intervalo interovulatório (dia 20). Não foi observada correlação entre os valores de pixel e o diâmetro luteal ($r = 0,06$). Os autores atribuem as alterações dos valores de pixel durante o desenvolvimento e regressão luteal às mudanças histológicas e bioquímicas no tecido luteal, tornando a análise computacional da ecotextura luteal um ferramenta promissora na avaliação da função ou disfunção do corpo lúteo bovino.

A análise computacional de imagens de corpos lúteos já foi aplicada em estudos utilizando outras espécies animais. Davies et al. (2006) avaliaram imagens de corpos lúteos geradas por exame ultra-sonográfico transretal em ovelhas de duas raças e taxas de ovulação. Os resultados mostraram uma relação entre os valores de pixel e a concentração plasmática de progesterona nos dias 3 a 15 após a ovulação ($r = 0,48$ e $r = 0,27$) nas duas raças de ovelhas, respectivamente. No entanto, estas correlações se mostraram mais baixas que as registradas em estudos anteriores (SINGH et al., 1997). A ecotextura do corpo lúteo (valores médios de pixel) apresentou aumento do 3º ao 4º dia após a ovulação e não diferiu do dia 4º ao 13º dia, quando declinou, em uma das raças estudadas. Na outra raça, os valores de pixel aumentaram do 4º ao 10º dia e declinaram do 10º ao 14º dia. O padrão temporal dos valores de pixel foi semelhante entre as duas raças. As correlações entre progesterona e valores de pixel não foram altas o suficiente

para considerar a mensuração de ecotextura como um valor que possa prever algo, levando a conclusão de que este parâmetro não foi suficiente para prever funcionalidade do CL (DAVIES et al., 2006).

2.6. Análise computacional de imagens de folículos ovarianos

Análises de imagens com auxílio de algoritmos computacionais vêm sendo desenvolvidas e permitem quantificar a ecotextura tecidual de folículos ovarianos (PIERSON e ADAMS, 1995). Em pesquisas envolvendo análises de imagens de folículos ovarianos bovinos, obtidas *in vitro*, foram observadas mudanças temporais nos valores médios de pixel do antro e da parede folicular nas diferentes fases do ciclo estral (folículo em crescimento, fase estática e regressão) assim como valores distintos para folículos dominantes e subordinados com um aumento progressivo nos valores de pixel da parede e antro folicular da fase de crescimento até a fase de regressão no folículo dominante da primeira onda. Ainda, o antro e a parede folicular dos subordinados apresentaram valores médios de pixel maiores que nos folículos dominantes correspondentes, levando a conclusão de que a análise computacional da ecotextura pode se tornar uma ferramenta de diagnóstico para acessar o status fisiológico, funcional e endócrino de um folículo ovariano (i.e. anovulatório vs. ovulatório, em crescimento vs. em regressão/atresia) e até eventuais patologias foliculares (SINGH et al., 1998).

Tom et al. (1998a) analisando a ecotextura de folículos ovarianos de bovinos, após a obtenção de imagens de ultra-som diariamente por exame transretal, observaram mudanças ao longo do tempo nos valores médios de pixel da parede do folículo dominante anovulatório, que mostrou queda na fase estática inicial e aumento na fase de regressão, atingindo valor máximo no folículo atrésico. Outros estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar a relação entre as mudanças quantitativas na ecotextura e as alterações funcionais e morfológicas de estruturas ovarianas (SINGH et al., 2003).

2.7. Perspectivas futuras da análise computacional de imagens

As possíveis aplicações práticas desta tecnologia são evidentes, como no caso da avaliação da qualidade luteal em receptoras no dia da transferência de embriões. A possibilidade de estimar a produção de progesterona por meio da análise de imagem

ultra-sonográfica do corpo lúteo tornaria a seleção e triagem de receptoras muito mais eficientes, com grande impacto nos casos em que a manutenção de gestação é de grande importância (clones, animais transgênicos ou de alto valor econômico, etc.). A implementação destas novas tecnologias de análise de imagem ainda requer mais estudos, visando o estabelecimento de padrões ideais dos valores de pixel que refletiriam a maior/menor capacidade esteroidogênica do corpo lúteo e, conseqüentemente, a maior/menor chance de estabelecimento da gestação, assim como avaliando o impacto de diferenças metodológicas (SIQUEIRA et al., 2006b; 2007).

Alterações na angiogênese, características dos períodos de luteogênese e luteólise, podem ser rapidamente identificadas para variação na ecogenicidade da imagem ultra-sonográfica do corpo lúteo, desde que sejam utilizadas ferramentas apropriadas para análise de imagem. Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar a relação entre as mudanças quantitativas na ecotextura e as alterações funcionais e morfológicas dos tecidos, porém um número reduzido destes aplicou este tipo de tecnologia em situações onde a avaliação da função ovariana é essencial, como na identificação de causas de mortalidade embrionária precoce, ou na seleção de receptoras para transferência de embriões.

Experimentos que utilizaram a ultra-sonografia possibilitaram elucidar complexos processos reprodutivos, incluindo dinâmica folicular ovariana (GINTHER et al., 1989), função e morfologia do corpo lúteo (KASTELIC et al., 1990) e desenvolvimento fetal (KÄHN, 1989). Houve um avanço significativo no entendimento destes processos devido às avaliações com imagens seriadas obtidas em tempo real, pelas quais se tornou possível observar as mudanças dinâmicas que acontecem em um animal vivo. Na medida em que a ultra-sonografia foi reconhecida como uma importante ferramenta de diagnóstico e seu uso ampliado (KING, 2006), abriu-se espaço para o desenvolvimento de novas tecnologias de imagens, ampliando a acuidade e objetividade das análises (SINGH et al., 2003). Características morfométricas e de ecotextura dos tecidos estão relacionadas ao status fisiológico e endócrino dos mesmos, tal como já observado em folículos e corpos lúteos. Estes avanços em tecnologias de imagens, por sua vez, deram suporte ao desenvolvimento de outras biotecnologias da reprodução, fornecendo ferramentas importantes de pesquisa e aplicação comercial, e eliminando o conceito de que a ultra-sonografia seria apenas uma ferramenta secundária no manejo reprodutivo.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, T.J., MYIAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, 82-83, p. 127-140, 2004.
- ADAMS, G. P. Developments in the use of ultrasonography in buiatrics. **Proceedings of Congresso Nazionale della Societa Italiana de Buatria**, v. 32, p. 435-450, 2000.
- ARTEAGA, A. A., BARTH, A. D., BRITO, L. F. C. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. **Theriogenology**, v. 64, p. 408-415, 2005.
- BROWN B. W., EMERY, M. J., MATTNER, P. E. Ovarian arterial blood velocity measured with Doppler ultrasonic transducers in conscious ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 58, p. 295-300, 1980.
- CARNES, K. I., DUNN, F. Absorption of ultrasound by mammalian ovaries. **Journal of Acoustic Society of America**, v. 84, p. 434-437, 1988.
- 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.
- 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.
- DHARMARAJAN, A.M., BRUCE, N.W., MEYER, G.T. Quantitative ultrastructural characteristics relating to transport between luteal cell cytoplasm and blood in the corpus luteum of the pregnant rat. **American Journal of Anatomy**, v. 172, p. 87-99, 1985.

- FIELDS, M.J., DUBOIS, W., BRACKETT, K.H., FAULKNER, R.F., BALL, B.A., MARTIN, J.M., DROST, M., FIELDS, P.A. In-vivo effect of prostaglandin F₂ treatment on secretory granules in the corpus luteum of the late pregnant cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 37, p. 215-223, 1989.
- FIELDS, M. J., FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, p. 1295-1325, 1996.
- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M. Ovarian follicular dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p. 1489-1505, 1997.
- FRANKEL, L. Die function des corpus luteum. **Arch Gynaekol**, v. 80, p. 190-191, 1903.
- FRASER, H.M., WULFF, C. Angiogenesis in the corpus luteum. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 1, p. 1-8, 2003.
- GÁBOR, G., SASSER, R. G., KASTELIC, J. P., MÉZES, M., FALKAY, G.Y., BOZÓ, S., VRLGVI CSIK, J., BÁRÁNI, I., HIDAS, A., SZÁISZ, F., BOROS, G. Computer analysis of video and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. **Theriogenology**, v. 50, p. 223-228, 1998.
- GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. **Equiservices Publishing**, Cross Plains, WI, 1986.
- GINTHER, O.J., KNOFF, L., KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.
- GINTHER, O. J. Reproductive Biology of the Mare. 2^a edição. **Equiservices Publishing**, Cross Plains, WI, 224p, 1992.

- GINTHER, O. J. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Fundamental Book 1. **Equiservices Publishing**, Cross Plains, WI, 1995.
- GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 1ª edição. Editora Varela, São Paulo, 2001.
- HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6ª edição. Editora Manole, São Paulo, 1995.
- KÄHN, W. Sonographic fetometry in the bovine. **Theriogenology**, v. 31, no 5, p. 1105-1121, 1989.
- KASTELIC, J. P., GINTHER, O. J. Fate of conceptus and corpus luteum after induced embryonic loss in heifers. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 194, p. 922-928, 1989.
- 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, no 3, p. 487-498, 1990.
- KING, A. M. Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, p.408–420, 2006.
- LUCK, M. R., ZHAO, Y. Structural remodeling of reproductive tissues. **Journal of Endocrinology**, v. 146, p. 191-195, 1995.
- MACIEL, M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., GUSTAFSSON, H. Fine structure of corpora lutea in superovulated heifers. **Zentralbl Veterinarmed A**. v. 39, n. 2, p. 89-97, (Abstract), 1992.
- NISWENDER, G.D., JUENGEL, J.L., MCGUIRE, W.J., BELFIORE, C.J., WILTBANK, M.C. Luteal Function: The estrous cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, 50, p. 239-247, 1994.
- NISWENDER, G.D., JUENGEL, J.L., SILVA, P.J., ROLLYSON, M.K, MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, 80, p. 1-29, 2000.

- PANG, C. Y., BEHRMAN, H. R. Relationship of luteal blood flow and corpus luteum function in pseudopregnant rats. **American Journal of Physiology**, v. 237, p. 30-41, 1979.
- PATE, J.L. Cellular components involved in luteolysis. **Journal of Animal Science**, 72, p. 1884-1890, 1994.
- PIERSON, R. A., GINTHER, O. J. Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**, v. 28, p. 929-936, 1987.
- PIERSON, R. A., CHIZEN, D. R. Transvaginal ultrasonographic assessment of normal and aberrant ovulation. **Imaging in Infertility and Reproductive Endocrinology**, p. 129-142, 1994.
- PIERSON, R. A., ADAMS, G. P. Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. **Theriogenology**, v. 43, p. 105-112, 1995.
- 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.
- SCHAMS, D., BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle – An overview. **Reproduction in domestic animals**, 39, p. 241-251, 2004.
- 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. Histomorphometry of dominant and subordinate bovine ovarian follicles. **The Anatomical Record**, v. 258, p. 58-70, 2000.
- SINGH, J., ADAMS, G. P., PIERSON, R. A. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 371-399, 2003.
- SIQUEIRA, L.G.B.; VIANA, J.H.M.; DINIZ, E.S.; CAMARGO, L.S.; AMORIM, L.S.; FONSECA, J.F.; FERNANDES, C.A.C.; TORRES, C.A.A. Aferição de ecogenicidade luteal com o uso de diferentes transdutores de ultra-som. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.281, 2006 (a).
- SIQUEIRA, L.G.B., VIANA, J.H.M. Novas tecnologias em diagnóstico por imagem. **Jornal “O Embrião”**, Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, n. 28, 2006 (b).
- SIQUEIRA, L.G.B., VIANA, J.H.M.; SOUZA, E.D.; CAMARGO, L.S.A., FONSECA, J.F.; FERNANDES, C.A.C.; TORRES, C.A.A. Use of computer assisted ultrasound image analysis in embryo recipient selection. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 323-324, 2007.
- SMITH, M.F., MCINTUSH, E.W., SMITH, G.W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **Journal of Animal Science**, 72, p. 1857-1872, 1994.
- THIBAUT, C., LEVASSEUR, M. C., HUNTER, R. H. F. **Reproduction in mammals and man**. 5a Edição. Editora Ellipses, 1993.
- TOM, J. W., PIERSON, R. A., ADAMS, G. P. Quantitative echotexture analysis of bovine ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 50, p. 339-346, 1998 (a).
- TOM, J. W., PIERSON, R. A., ADAMS, G. P. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. **Theriogenology**, v. 49, p. 1345-1352, 1998 (b).
- TOWNSON D. H., GINTHER, O. J. Ultrasonic echogenicity of developing corpora lutea in pony mares. **Animal Reproduction Science**, v. 20, p. 143-153, 1989.

- VASSENA, R., ADAMS, G.P., MAPLETOFT, R.J., PIERSON, R.A., SINGH, J. Ultrasound image characteristics of ovarian follicles in relation to oocyte competence and follicular status in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 76, p. 25-41, 2003.
- VIANA, J.H.M. **Avaliação ultra-sonográfica de estruturas ovarianas em doadoras e receptoras de embrião**. 1996. 120f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.
- VIANA, J. H. M., FERREIRA, A. M., SÁ, W. F., CAMARGO, L. S. A. Características da dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida em vacas da raça Gir. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 251-256, 1999 (a).
- 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 (b).
- VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SA, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2501-2509, 2000.
- VIANA, J.H.M. Cenário atual da Transferência de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* no Brasil e no Mundo. **Jornal “O Embrião”**, Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, n. 29, 2006.
- WEEMS, C.W., WEEMS, Y.S., RANDEL, R.D. Prostaglandin and reproduction in female farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 206-228, 2006.
- WILTBANK, M. C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid cycle corpus luteum function. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1873-1883, 1994.

CAPÍTULO 1

METODOLOGIA E PROCEDIMENTOS PARA CAPTURA E ANÁLISE COMPUTACIONAL DE IMAGENS ULTRA-SONOGRÁFICAS DE CORPOS LÚTEOS BOVINOS

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estabelecer uma metodologia e procedimentos para captura, processamento e análise computacional de imagens ultra-sonográficas de corpos lúteos (CL) bovinos. Novilhas mestiças (n=12) foram examinadas diariamente durante o ciclo estral com o auxílio de um aparelho portátil de ultra-som (Aloka SSD 500) acoplado a um transdutor linear de 5MHz, por via transretal (TR). As imagens geradas foram gravadas em fitas VHS com auxílio de um aparelho de videocassete e posteriormente digitalizadas, ou transferidas diretamente para um computador pessoal (PC). As análises computacionais das imagens foram realizadas utilizando um software desenvolvido especificamente para análise gráfica de imagens. Regiões de tamanhos decrescentes (1,0; 0,75; 0,50; 0,25 e 0,125 cm²) foram selecionadas e analisadas objetivando estabelecer uma área de amostragem mínima que representasse a ecotextura do CL. A área mínima estabelecida, para imagens TR, foi de 0,25 cm² (4,42% de variação em relação à maior área). Foi observada correlação dos valores médios de pixel ($r=0,99$; $P<0,001$) e da heterogeneidade ($r=0,99$; $P<0,001$) entre imagens gravadas em fitas VHS ou transferidas diretamente para o PC. Conclui-se que as diferenças nos métodos de captura, processamento e análise de imagens devem ser levadas em consideração quando da avaliação da ecotextura luteal. Padrões de valores para cada sistema de captura, além de uma área mínima representativa da imagem inteira, devem ser previamente estabelecidos.

Palavras-chave: ultra-sonografia, corpo lúteo, análise computacional, área mínima, ecotextura, bovino

ABSTRACT

The aim of this study was to establish and standardize procedures and methods for acquiring, processing and computer-assisted ultrasound image analysis of bovine corpora lutea (CL). Crossbred heifers (n=12) were daily examined through the estrous cycle using a real-time echo camera (Aloka SSD 500), equipped with a 5MHz, linear-array rectal transducer (RT). Ultrasound images were videotaped with a videocassette recorder and digitized later, or transferred direct to a personal computer (PC). Computer-assisted analyses were performed using a custom-developed software. Regions with decreasing areas (1.0; 0.75; 0.50; 0.25 and 0.125 cm²) were selected and analyzed to establish a minimum representative sample area of the CL echotexture. The minimum spot area, to RT images, was 0.25 cm² (4.42% of variation in relation to the greater area). Mean pixel value ($r = 0.99$; $P < 0.001$) and pixel heterogeneity (0.99; $P < 0.001$) were correlated with images videotaped or direct digitized to the PC. It is concluded that the differences in acquiring, processing and computer-assisted image analysis methods must be considered for luteal echotexture evaluation. Standard values to each method and a minimum representative spot area should be established previously.

Key-words: ultrasound, corpus luteum, computer analysis, minimum spot area, echotexture, bovine

1. INTRODUÇÃO

O uso da ultra-sonografia para avaliação de estruturas ovarianas tem possibilitado avanços significativos no entendimento dos complexos processos fisiológicos relacionados à reprodução dos animais domésticos. Nas três últimas décadas, o exame ultra-sonográfico dos ovários de bovinos foi extensamente utilizado tanto em pesquisas de caráter básico, com objetivo de elucidar eventos fisiológicos primários (PIERSON e GINTHER, 1987; GINTHER et al., 1989; FIGUEIREDO et al., 1997), quanto em pesquisas aplicadas ao uso de biotecnologias (GALLI et al., 2001; VASSENA et al., 2003; VIANA et al., 2005).

A análise computacional é uma extensão natural dos avanços em diagnóstico por imagens de ultra-som. Quando aplicada na avaliação de um tecido ou órgão, esta técnica permite identificar diferenças de ecotextura (padrão ultra-sonográfico) imperceptíveis ao olho humano, assim como mensurá-las de forma bastante objetiva, pelo estabelecimento de algoritmos computacionais. A quantificação numérica de cada pixel que compõe a imagem reduz as inconsistências da avaliação visual subjetiva (SINGH et al., 2003).

Embora já tenham sido realizados diferentes estudos envolvendo análise computacional de imagens (SINGH et al., 1997; SINGH et al., 1998; TOM et al., 1998a, 1998b; DAVIES et al., 2006), ainda não foi estabelecido um procedimento e metodologias únicas e eficientes na geração, captura, digitalização e análise de imagens de ultra-som, assim como não há no Brasil nenhum software desenvolvido especificamente para este tipo de análise.

Após a digitalização de uma imagem de ultra-som, esta pode ser manipulada como qualquer outro arquivo gráfico. Os diferentes métodos de análise podem levar a resultados distintos, que variam de acordo com o equipamento utilizado, a estrutura a ser analisada e o objetivo da análise. Na avaliação da ecotextura luteal, podem ser feitas análises de toda a área de tecido luteal (DAVIES et al., 2006) ou de regiões (áreas de amostragem) previamente selecionadas (SINGH et al., 1997; TOM et al., 1998b), gerando valores médios de pixel daquela região específica, o que possibilita a exclusão de áreas onde há artefatos de imagem que não representariam a real estrutura histológica.

Os objetivos deste estudo foram estabelecer uma metodologia e padronizar procedimentos utilizados na geração e captura de imagens ultra-sonográficas de corpos lúteos bovinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Período experimental, local de realização e animais

O experimento foi realizado no período de julho a novembro de 2006, no Laboratório de Reprodução Animal e Embriologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Leite) localizada em Juiz de Fora, MG. Foram utilizadas imagens ultra-sonográficas de corpos lúteos (CL) bovinos geradas em exames ultra-sonográficos realizados no período de 21 de junho a 25 de julho de 2006, feitos diariamente ao longo do ciclo estral de novilhas mestiças *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* (n=12), com grau de sangue variando entre 1/2 a 7/8 holandês-zebu, 23,73±3,75 meses de idade, 358±40,54 kg de peso vivo, 3,0±0,45 pontos de escore de condição corporal (escala de 1-5; EDMONSON, 1989) e estro sincronizado com dispositivo intravaginal impregnado com 1,9 g progesterona (CIDR®) e aplicação de 0,50 mg de um análogo sintético da prostaglandina F_{2α} (cloprostenol sódico). Durante o período experimental, os animais permaneceram em pastagens de *Brachiaria decumbens* e receberam sal mineral e água *ad libitum*, seguindo o manejo nutricional adotado pela Embrapa Gado de Leite.

2.2. Ultra-sonografia e procedimentos para captura e análise de imagens

Os exames foram realizados com um aparelho de ultra-som portátil¹ (Aloka SSD 500) acoplado a transdutor linear transretal com frequência de 5MHz. Os exames ultra-sonográficos diários tiveram início no dia do estro (D0) e duração até a manifestação do estro subsequente. Todos os exames foram realizados pelo mesmo operador e as configurações do aparelho de ultra-som (ganhos proximal, distal e total; área de foco; brilho e contraste) foram padronizadas em valores pré-determinados e iguais durante todo o experimento. As áreas (em cm²) dos corpos lúteos e das cavidades luteais, se presentes, foram mensuradas por meio de comandos no próprio equipamento de ultra-som e anotadas em planilhas individuais de cada animal.

Para captura das imagens que seriam posteriormente analisadas por computador, a saída de vídeo do aparelho de ultra-som foi conectada à entrada de vídeo de um

¹ Aloka, modelo SSD 500, Aloka Co., Japão.

aparelho de vídeo-cassete² com auxílio de um cabo coaxial (Figura 1). Após a identificação dos corpos lúteos, imagens de boa qualidade com o mínimo de artefatos de imagem (refração, dispersão e atenuação das ondas ultra-sônicas) foram congeladas na tela do ultra-som e foi iniciado o processo de gravação para o videocassete. As imagens foram gravadas em fitas VHS, em velocidade SP por cerca de 10 segundos.



Figura 1. Aparelho de ultra-som utilizado nos experimentos, conectado ao videocassete usado na gravação das imagens.

As fitas VHS com as gravações foram levadas a uma sala no interior do laboratório, e todas as imagens digitalizadas com auxílio de um computador pessoal³ (PC) e uma placa de captura de vídeo⁴ (Pinnacle DC10[®]). As imagens digitais foram arquivadas em formato não compactado, extensão TIFF, com definição de 1500 x 1125 pixels e 256 tons de cinza (4,87 MB de tamanho em disco).

As análises (quantificação da ecotextura) das imagens de ultra-som capturadas foram realizadas com o auxílio de um software específico e aperfeiçoado para análise de imagens⁵ (Quantporo[®]), desenvolvido pelo Laboratório de Geoprocessamento do Departamento de Solos, Universidade Federal de Viçosa. Após a seleção, pelo usuário, de uma área específica do tecido luteal, a tonalidade de cinza de cada pixel que compõe a região selecionada foi calculada pelo software e representada numericamente em uma escala de 256 tons de cinza, na qual zero (0) representa um pixel de tonalidade

² Gradiente[®], 7 Head Hi-Fi Stereo HT-GSV870.

³ Pentium[®] 4 2,7GHz, 1,0 GB RAM.

⁴ Pinnacle Studio DC10 AV/DV, Versão 9, Pinnacle Systems, São Paulo, Brasil.

⁵ Quantporo[®], UFV, Viçosa, MG

totalmente preta e 255 um pixel de tonalidade totalmente branca (Figura 2). A região selecionada para análise compreendia somente tecido luteal, tendo sido retirada da análise regiões que possuíam artefatos de transmissão das ondas de ultra-som, estroma ovariano e cavidades preenchidas por líquido.

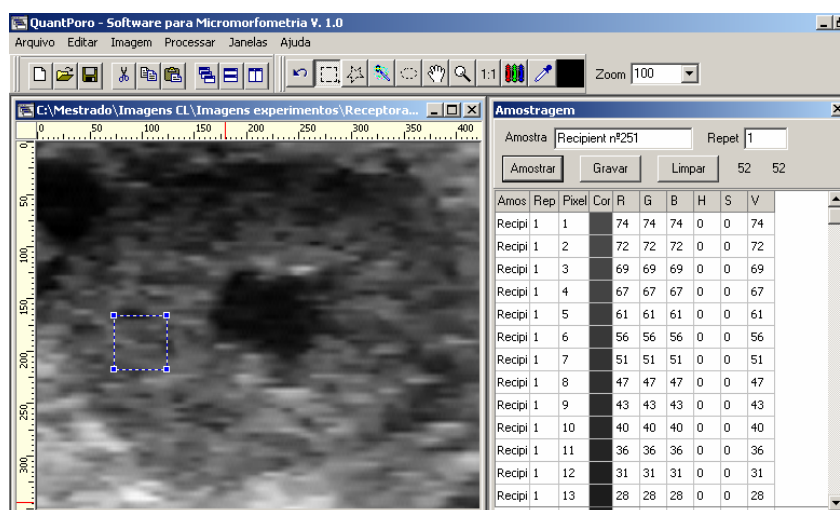


Figura 2. Software utilizado na análise computacional das imagens. Após a digitalização de uma imagem de CL, uma área de amostragem foi selecionada e os valores de cada pixel contidos naquela região, quantificados numericamente, em escala de 0 a 255.

Os valores numéricos expressos pelo software foram salvos em arquivos na forma de uma matriz, onde linhas e colunas representavam a posição do ponto (pixel) e, o valor da célula, o brilho do ponto (0-255). Essa matriz foi importada para a planilha Excel (Excel®, Microsoft Co., 2003), processada e analisada descartando-se a informação de posição do ponto. A partir daí, obteve-se um valor médio da tonalidade de cinza dos corpos lúteos, ou seja, uma representação quantitativa da ecotextura do CL. Foram considerados dois valores para avaliar as características de ecogenicidade do CL: o valor médio dos pixels da região analisada (escala 0-255) e o desvio padrão destes valores, utilizado como um indicador da heterogeneidade na região analisada e analisado separadamente ao valor médio, como uma variável independente. Valores altos, neste parâmetro, indicam maior heterogeneidade entre os valores de pixel da região analisada (Figura 3).

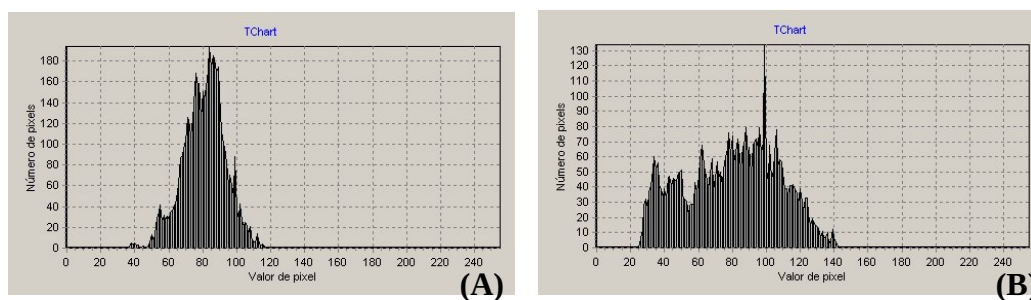


Figura 3. Histogramas de regiões distintas que apresentam diferentes valores de heterogeneidade. Na região (A) os valores de pixel são homogêneos e pouco distribuídos na escala de 256 tons de cinza, levando a um valor de heterogeneidade menor. Já na região (B), os valores se distribuem mais na escala de 256 tons, representando uma região mais heterogênea.

2.3. Definição da área mínima representativa

A fim de determinar a área de amostragem mínima de uma imagem necessária para representar a ecotextura de um determinado corpo lúteo, regiões de tamanhos decrescentes (1,00; 0,75; 0,5; 0,25 e 0,125 cm²) representando diferentes números de pixel mensurados (20.164; 14.884; 10.404; 5.184 e 2.704 pixels, para cada área, respectivamente) foram selecionadas (livres de artefatos de imagem significativos) em imagens de corpos lúteos dos dias 7 (D7) e 10 (D10) do ciclo estral. O sétimo dia do ciclo foi escolhido por ser o dia em que se faz, em bovinos, a transferência de embriões para receptoras; o 10º dia foi selecionado por ser o dia em que o corpo lúteo atingiu a área máxima, em cm².

Por não ter sido possível a seleção das áreas de amostragem dos tamanhos estudados (1,00; 0,75; 0,5; 0,25 e 0,125 cm²) nos corpos lúteos de todos os animais, principalmente devido à presença de cavidades, foram utilizadas imagens dos corpos lúteos (CL) de seis animais, ou seja, seis repetições para cada uma das cinco áreas decrescentes descritas previamente, totalizando 30 análises computacionais de ecotextura. Foram selecionadas, na mesma imagem, regiões de amostragem de tamanhos decrescentes, partindo de uma região de 1,00 cm², e as imagens de ultra-som foram analisadas por um software de computador conforme procedimentos descritos anteriormente.

Para a verificação da porcentagem de variação nos valores médios de pixel em uma mesma região do CL quando a área de amostragem foi diminuída, calculou-se a seguinte equação:

$$\Delta V (\%) = [(V_{\text{atual}}/V_{1,00}) - 1] * 100, \text{ na qual:}$$

$\Delta V (\%) = \% \text{ de variação}$

V_{atual} = Valor médio de pixel obtido quando se utilizou a área (0,75; 0,5; 0,25; 0,125 cm²) em que se deseja saber a variação em relação à maior área (1,00 cm²)

$V_{1,00}$ = Valor médio de pixel obtido quando selecionou-se uma região com 1,00 cm² de área, i.é., a maior área de amostragem analisada.

Para a determinação da área mínima representativa, baseou-se no critério proposto por VandenBygaart e Protz (1999), no qual a área elementar representativa seria uma área na qual os valores médios de pixel não variassem mais do que 10% em relação aos valores da área imediatamente maior. Este critério foi modificado, ficando estabelecido que a área mínima representativa seria uma área na qual os valores médios de pixel não variassem mais de 5% em relação aos valores da maior área de amostragem utilizada, ou seja, a área máxima de 1,00 cm².

2.4. Determinação do sistema de captura

Para determinar a eficiência do sistema de captura, imagens de corpos lúteos dos 12 animais, em três dias do ciclo (D5, diestro inicial; D7, dia da TE; D13, diestro), foram congeladas na tela e transferidas, pela saída de vídeo do aparelho de ultra-som, para o videocassete⁶ e gravadas em fitas VHS conforme procedimentos previamente descritos.

No mesmo momento, as mesmas imagens congeladas, foram transferidas (digitalizadas) diretamente para um computador pessoal (PC) com o auxílio de uma placa de captura de vídeo⁷ (Pinnacle DC 10[®]) e arquivadas em formato não compactado (TIFF), com definição de 1500 x 1125 pixels, sem passar pela gravação em videocassete. As imagens gravadas em fitas VHS, foram digitalizadas da mesma forma (placa de captura de vídeo) e arquivadas no mesmo formato e definição (TIFF, 1500 x 1125) das imagens capturadas diretamente para o computador.

Utilizando a área representativa mínima previamente estabelecida, imagens de corpos lúteos digitalizadas diretamente para o computador e imagens digitalizadas após gravação em fitas VHS, foram analisadas com o auxílio do software utilizado nos

⁶ Gradiente[®], 7 Head Hi-Fi Stereo HT-GSV870.

⁷ Pinnacle Studio DC10 AV/DV, Versão 9, Pinnacle Systems, Inc., Mountain View, CA, USA.

procedimentos anteriores (Figura 4). Foi selecionada uma região (área de amostragem) de tecido luteal livre ou com o mínimo de artefatos de imagens, e mensurada, pelo software, a intensidade de brilho de cada pixel presente nesta região (escala 0 a 255). A partir desta tonalidade, expressa em valores numéricos, obteve-se um valor médio da ecotextura dos corpos lúteos nos dias 5, 7 e 13 do ciclo estral, em imagens processadas de formas diferentes: digitalizadas diretamente para o computador ou gravadas em fita VHS e digitalizadas posteriormente.

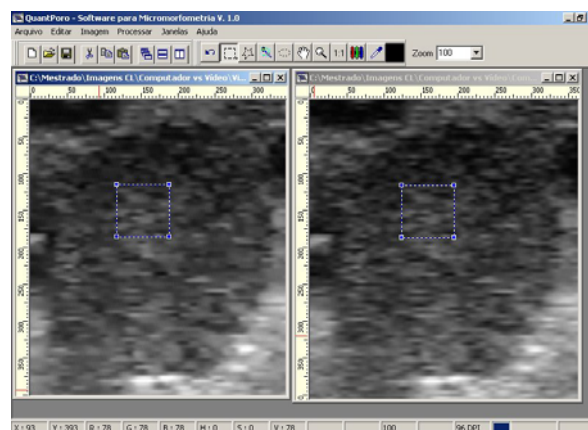


Figura 4. Representação do modo de análise para comparação dos dois sistemas de captura de imagem. Duas imagens do corpo lúteo, em um mesmo instante, foram digitalizadas diretamente para um computador; ou gravadas em fita VHS e digitalizadas posteriormente. A imagem da esquerda foi gravada em fita VHS e a imagem da direita foi digitalizada diretamente para o computador. A análise computacional foi feita no mesmo momento e utilizando a mesma área de amostragem para os dois sistemas de captura.

2.5. Análises estatísticas

Para comparação dos dois sistemas de captura (gravação em fitas VHS vs digitalização direta) foi feita análise estatística pelo método das correlações de Pearson entre as matrizes de valores médios de pixel obtidas em imagens do mesmo corpo lúteo, em cada sistema.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAEG 9.0 (UFV, 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Definição da área mínima representativa

Após análises das imagens transretais do 7º e 10º dias do ciclo estral, os valores de variação percentual, obtidos pela fórmula descrita anteriormente, das áreas 0,75; 0,50; 0,25 e 0,125 cm² em relação à área de 1,00 cm² foram 2,72; 2,38; 3,10 e 12,16% (D7) e 2,80; 2,70; 5,75 e 8,28% (D10), respectivamente. Desta forma, usando como parâmetro a média das variações percentuais nas imagens dos dois dias avaliados, verifica-se que a variação percentual em relação à maior área (1,00 cm²) foi de 2,76; 2,54; 4,42 e 10,22%, na medida em que a área de amostragem decresceu (figura 5).

Esta variação percentual só foi maior que 5%, em relação à maior área, quando a área de amostragem foi de 0,125 cm² de área e 2.704 pixels. Seguindo o critério previamente proposto, a área mínima representativa para análise computacional de imagens ultra-sonográficas de corpos lúteos bovinos, obtidas por via transretal, foi estabelecida em 0,25 cm², o que representa 5.184 pixels quantificados quanto à sua tonalidade de cinza, na qual a variação foi de 4,42%.

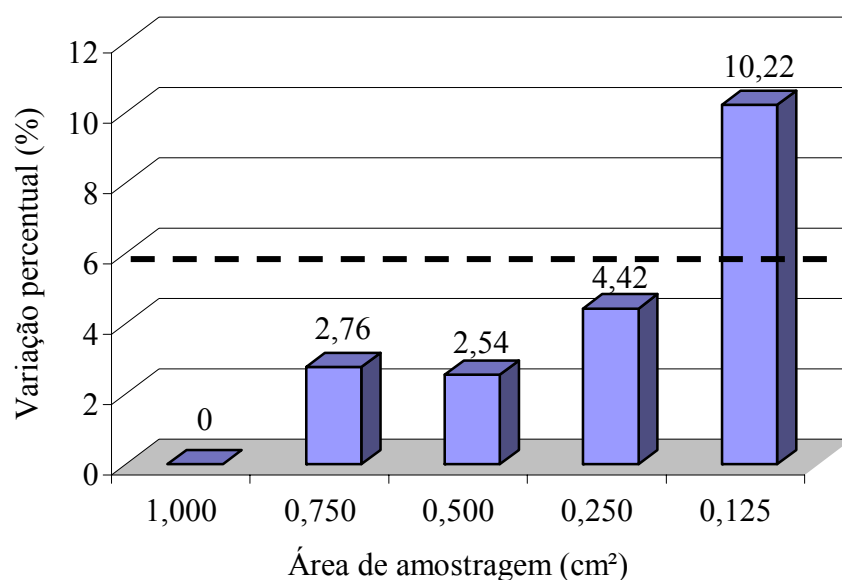


Figura 5. Variações percentuais dos valores médios de pixel obtidos utilizando áreas amostrais decrescentes, no 7º e no 10º dias do ciclo estral. A linha horizontal pontilhada indica o máximo de variação (5%) que poderia haver em relação à maior área (1,00 cm²), seguindo o critério previamente proposto.

O aumento da variação percentual em função da redução da área de amostragem, conforme foi observado no presente estudo, é coerente com o fato de que a distribuição dos valores de pixel é irregular no corpo lúteo. Desta forma, quanto menor a área estudada, maior é a chance de se observar um desvio em relação ao valor original (área máxima). Na maioria dos estudos que envolvem análises de imagens, é necessária a seleção de uma área de amostragem. A análise da imagem inteira gera matrizes de valores excessivamente grandes e impossibilita a exclusão de áreas que não representam, de forma fiel, a estrutura em questão.

Estudos anteriores que avaliaram ecotextura de corpos lúteos não definiram uma área mínima representativa (SINGH et al., 1997; TOM et al., 1998b). Singh et al. (1997) utilizando imagens obtidas *in vitro*, com o ovário imerso em água, dividiram cada imagem de corpo lúteo em quatro quadrantes, e selecionaram uma região em cada quadrante, que representava 20% da área do quadrante. Contudo, não foi definida uma área mínima para análise com valores numéricos conhecidos (mm², cm², etc). Em estudo conduzido com ovelhas, Davies et al. (2006) fizeram dois tipos de análise de ecotextura dos corpos lúteos. Na primeira análise, selecionaram a área total do CL para quantificação da intensidade de todos os pixels que compunham o CL. Na segunda análise, quatro regiões de amostra foram selecionadas em cada corpo lúteo. As áreas destas regiões selecionadas representavam, aproximadamente, 70% da área total do corpo lúteo em questão.

A seleção da área total do corpo lúteo se mostrou inviável, no presente estudo, devido ao tamanho do CL bovino. A seleção de uma área maior que a máxima utilizada (1,00 cm²) gera uma matriz de dados excessivamente grande, não suportada tanto pelo processador do computador (Pentium® 4 2,7GHz, 1,0 GB RAM) quanto pelo software de análise de dados disponível (Excel®, Microsoft Co., 2003). O uso de uma área mínima representativa também possibilita a análise de corpos lúteos de forma irregular, com presença de cavidades centrais ou com partes da imagem comprometidas por artefatos, sem que haja comprometimento da coerência do estudo.

Quando se utiliza amostragem em análise computacional para quantificar aspectos gráficos em imagens, seja qual for o objeto em análise, é necessário o estabelecimento de uma área mínima que é requerida para representar as características gráficas distribuídas na imagem inteira (VANDENBYGAART e PROTZ, 1999).

São escassas as informações sobre tamanho da área de amostragem utilizada em estudos anteriores. O critério proposto e adotado, no presente estudo, para determinação da área mínima representativa apresentou um comportamento coerente com a variação

esperada na distribuição de pixels em função da estrutura histológica do tecido, além de conferir um padrão objetivo de análise para os diferentes experimentos realizados.

3.2. Determinação do sistema de captura

Das 36 imagens que seriam analisadas, três foram excluídas do procedimento por não apresentarem as características desejadas (boa qualidade, i.e., mínimo de artefatos de imagem) ou por não ter sido possível a seleção de uma região de amostragem do tamanho da área mínima representativa determinada previamente, devido à presença de uma cavidade central preenchida por líquido no corpo lúteo.

Foi observada relação dos valores médios de pixel ($r = 0,99$; $P < 0,001$) e da heterogeneidade destes valores ($r = 0,98$; $P < 0,001$) entre as imagens que foram digitalizadas diretamente para o computador e as imagens gravadas em fitas VHS, digitalizadas posteriormente.

O processo de gravação em VHS pode ocasionar alguma perda de qualidade e definição das imagens. No presente estudo, esta perda de características da imagem original não afetou significativamente a intensidade da tonalidade de cinza dos pixels que a compunham. Desta forma, a gravação em fitas VHS parece não prejudicar as características gráficas inerentes às imagens, mostrando-se uma alternativa viável para armazenamento das mesmas até o momento da análise computacional e eliminando a necessidade do transporte do computador até o local de obtenção, i.e., até o campo.

No entanto, variações extremamente pequenas na impedância acústica de estruturas ovarianas em imagens ultra-sonográficas de alta resolução podem indicar diferenças no status fisiológico (PIERSON e ADAMS, 1995, SINGH et al., 2003), de forma que, a perda de qualidade decorrente da gravação em VHS deve ser considerada para análises de maior sensibilidade.

Os resultados do presente estudo indicam que é importante a definição prévia de uma área de amostragem mínima para análise computacional de imagens, que represente a ecotextura da estrutura inteira, com pouca variação em relação a uma área de amostragem maior. A gravação das imagens em fitas VHS não ocasiona perda de qualidade que comprometa o parâmetro gráfico analisado (intensidade de brilho dos pixels) e é uma alternativa para o armazenamento de imagens até a digitalização.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- EDMONSON, A. J., LEAN, I. J., WEAVER, L. D., FARVER, T., WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 68-78, 1989.
- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M. Ovarian follicular dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p. 1489-1505, 1997.
- GALLI, C., CROTTI, G., NOTARI, C., TURINI, P., DUCHI, R., LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v.55, p.1341-1357, 2001.
- GINTHER, O.J., KNOPF, L., KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.
- PIERSON, R. A., GINTHER, O. J. Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**, v. 28, p. 929-936, 1987.
- PIERSON, R. A., ADAMS, G. P. Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. **Theriogenology**, v. 43, p. 105-112, 1995.
- 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 imaging technologies for assessing ovarian function. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 371-399, 2003.
- TOM, J. W., PIERSON, R. A., ADAMS, G. P. Quantitative echotexture analysis of bovine ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 50, p. 339-346, 1998 (a).
- TOM, J. W., PIERSON, R. A., ADAMS, G. P. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. **Theriogenology**, v. 49, p. 1345-1352, 1998 (b).
- UFV. SAEG versão 9.0. Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- VANDENBYGAART, A. J., PROTZ, R. The representative elementary area (REA) in studies of quantitative soil micromorphology. **Geoderma**, v. 89, p. 333-346, 1999.
- VASSENA, R., ADAMS, G.P., MAPLETOFT, R.J., PIERSON, R.A., SINGH, J. Ultrasound image characteristics of ovarian follicles in relation to oocyte competence and follicular status in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 76, p. 25-41, 2003.
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M.; SA, W.F.; FERNANDES, C.A.C.; MARQUES JUNIOR, A.P. Norgestomet implants reduce lh release pattern in zebu cows undergoing repeated oocyte pick-up **Reproduction, Fertility and Development**, v.17, p.255–255, 2005.

CAPÍTULO 2

USO DA ANÁLISE COMPUTACIONAL DE IMAGENS DE ULTRA-SOM NA AVALIAÇÃO DA ECOTEXTURA LUTEAL E SUA RELAÇÃO COM A CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA PLASMÁTICA DURANTE O CICLO ESTRAL DE NOVILHAS MESTIÇAS (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*)

RESUMO

Estudos preliminares sugerem que atributos de imagens ultra-sonográficas têm o potencial de indicar o status fisiológico e funcional do corpo lúteo (CL) durante o ciclo estral. Com o objetivo de avaliar as mudanças morfológicas e de ecotextura do CL e sua relação com a concentração de progesterona [P₄] plasmática, novilhas mestiças foram examinadas diariamente com o auxílio de um aparelho portátil de ultra-som acoplado a um transdutor linear transretal de 5 MHz, durante um ciclo estral natural (Experimento 1; n=12) ou com luteólise induzida pela aplicação de um agente luteolítico no 10º dia do ciclo (Experimento 2; n=6). Amostras de sangue foram coletadas a cada 48 horas (Expto. 1) ou diariamente (Expto. 2) para análise da [P₄] plasmática. A área do CL (cm²) foi mensurada e as imagens gravadas em fitas VHS para posterior digitalização. A análise computacional dos atributos das imagens foi realizada com o auxílio de um software específico. No experimento 1, houve aumento da área de tecido luteal até uma área máxima no 10º dia do ciclo ($P<0,05$), quando se estabilizou e iniciou uma queda no 14º dia. Quando foi aplicado um agente luteolítico (Expto. 2), a [P₄] plasmática retornou a valores basais 24 horas após a aplicação. A diminuição da área de tecido luteal foi menos brusca, retornando a valores semelhantes aos do metaestro 36 horas após o tratamento. No ciclo estral natural, foi observada correlação entre área de tecido luteal e a [P₄] plasmática ($r=0,69$; $P<0,01$). Os parâmetros de ecotextura do CL, no Expto. 1, foram analisados após o ajuste dos dados para o momento da luteólise. Em ambos os experimentos, o valor médio dos pixels não variou em função dos dias ($P>0,10$) e não foi observada correlação entre [P₄] plasmática e este parâmetro ($r=-0,39$ e $r=-0,28$; para os experimentos 1 e 2, respectivamente; $P>0,10$). A heterogeneidade variou em função dos dias na luteólise natural ($P<0,01$), mas não na induzida ($P>0,10$). Ainda, foram observadas correlações entre heterogeneidade e a [P₄] plasmática nos dois experimentos ($r=-0,69$ e $r=-0,48$; $P<0,05$). Os resultados sugerem que a heterogeneidade dos valores de pixel de imagens de ultra-som seja um forte indicador de funcionalidade e capacidade esteroideogênica da glândula luteal. Entretanto, os valores médios dos pixels não refletiram as mudanças morfológicas e funcionais do corpo lúteo ao longo do ciclo estral.

Palavras-chave: Ultra-sonografia, corpo lúteo, ecotextura, pixel, heterogeneidade, bovino.

ABSTRACT

It has been suggested that ultrasound image attributes are a potential indicator of the physiological and functional status of the corpus luteum (CL) throughout the estrous cycle. The aim of this study was to evaluate corpus luteum's morphological and echotextural changes, and correlate echotexture changes with plasma progesterone concentrations. Crossbred heifers were daily examined using a real-time echo camera equipped with a 5MHz, linear-array rectal transducer, throughout a natural estrous cycle (Experiment 1; n=12) or during an estrous cycle after luteolysis induction, on the 10th day, by a luteolytic substance (Experiment 2; n=6). Blood samples were collected for further plasma progesterone concentration [P₄] analysis. Corpora lutea areas (cm²) were measured and images of each CL videotaped (VHS tapes) until being digitized. Computer-assisted analyses of image attributes were performed using custom-developed software. In the first experiment, luteal tissue area increased to a maximum area on the 10th day ($P<0.05$), followed by a plateau and then declined, from day 14 to next estrus. When a luteolytic agent was injected (Expt. 2), plasma progesterone dropped to basal values 24 hours after injection. Luteal tissue area decreased slowly, and reached values similar to ones from metoestrus 36 hours after treatment. There was a significant correlation between luteal tissue area and plasma [P₄] ($r=0.69$; $P<0.01$) during natural estrous cycle. In the experiment 1, echotexture parameters of the CL were analyzed after data adjustment to the onset of luteolysis. In both experiments, mean pixel values did not differ throughout the estrous cycle ($P>0.10$) and no correlation was found between mean pixel values and plasma [P₄] ($r=-0.39$ and $r=-0.28$; $P>0.10$). Pixel heterogeneity changed throughout natural estrous cycle ($P<0.01$), but did not change when luteolysis was induced (Expt. 2; $P>0.10$). It was observed correlations between pixel heterogeneity and plasma progesterone in both of the experiments ($r=-0.69$ and $r=-0.48$; $P<0.05$). The results suggest that pixel heterogeneity of ultrasound images is a good indication of functionality and steroidogenic capacity of the luteal gland. However, mean pixel values do not reflect morphological neither functional changes of the CL through the estrous cycle.

Key-words: ultrasound, corpus luteum, echotexture, pixel, heterogeneity, bovine.

1. INTRODUÇÃO

Em mamíferos domésticos, após a ruptura do folículo na ovulação há o desenvolvimento e formação de uma glândula endócrina transitória especializada na secreção de progesterona (FRANKEL, 1903; FIELDS e FIELDS, 1996), necessária ao estabelecimento e manutenção da gestação (NISWENDER et al., 1994). Em várias espécies animais, a vida útil desta glândula, o corpo lúteo (CL), é em parte controlada pelo hormônio luteolítico uterino, a prostaglandina F_{2alfa}. O CL, por sua vez, regula a extensão do ciclo estral (HAFEZ, 1995).

A ultra-sonografia bidimensional em tempo real (B-mode) tem sido largamente utilizada em pesquisas relacionadas à reprodução animal, em áreas distintas, variando desde áreas de fisiologia básica (p.ex. dinâmica folicular ovariana; FORTUNE et al., 1988; GINTHER et al., 1989a; FORTUNE, 1993; WILTBANK et al., 2002) até áreas de biotecnologia aplicada (p.ex. aspiração folicular por via transvaginal; CARLIN et al., 1999, GOODHAND et al., 1999). O crescente uso do ultra-som permitiu aos pesquisadores elucidar fenômenos reprodutivos de extrema importância no ciclo estral, possibilitando o estabelecimento e/ou adequação de protocolos de manipulação hormonal da função reprodutiva, como superovulação, sincronização de estro e indução da ovulação. Também, o uso da ultra-sonografia tornou possível o monitoramento do desenvolvimento da glândula luteal (CL) seqüencialmente (PIERSON e GINTHER, 1987; KASTELIC e GINTHER, 1989), permitindo a avaliação do tamanho, forma, localização e consistência do corpo lúteo. No entanto, o exame de ultra-som, por si só, não elimina completamente os erros de avaliação do corpo lúteo (PIETERSE *et al.*, 1990).

A formação da imagem ultra-sonográfica é baseada na habilidade dos diferentes tecidos de refletir ondas sonoras de alta frequência de forma distinta, indicando variações na densidade do tecido em exame (PIERSON e ADAMS, 1995). Cada imagem de ultra-som é composta por milhares de “picture elements” ou pixels e cada um destes pixels representa um discreto reflexo do tecido em exame, assumindo assim, umas das 256 tonalidades da escala de cinza (SINGH et al., 1998).

A análise computacional de imagens é uma técnica baseada na identificação, quadro a quadro (pixel), da intensidade do retorno da onda ultra-sonográfica. A densidade e as características do tecido podem ser observadas por ultra-som, mas não quantificadas pelo olho humano, levando a diferentes percepções individuais e, conseqüentemente, variações na interpretação da imagem (PIERSON e ADAMS, 1995).

Este tipo de análise quantifica, numericamente, a tonalidade de cinza de cada pixel em uma imagem ou região analisada, gerando uma matriz de valores que podem ser usados para avaliar de forma bastante objetiva a ecotextura do tecido ou órgão em exame.

Estudos anteriores tentaram relacionar a ecotextura do CL nas diferentes fases do ciclo estral com as mudanças fisiológicas, endócrinas e histológicas que ocorrem nestes períodos (SINGH et al., 1997; TOM et al., 1998b; DAVIES et al., 2006). Contudo, ainda não há confiabilidade no uso da técnica devido às inconsistências dos resultados de cada estudo, provavelmente causadas pelos métodos distintos utilizados na geração (*in vitro* vs *in vivo*) e processamento das imagens (digitalização direta ou gravação em videocassete).

Os objetivos do presente estudo foram avaliar as mudanças morfológicas e de ecotextura do corpo lúteo nos períodos de luteogênese e luteólise durante um ciclo estral natural ou com luteólise induzida e, ainda, correlacionar as medidas de ecogenicidade com a concentração de progesterona plasmática ao longo do ciclo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Experimento 1 – Análise computacional de imagens ultra-sonográficas de corpos lúteos bovinos durante um ciclo estral com luteólise natural

2.1.1. Período experimental, local de realização e animais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Leite), Campo Experimental de Coronel Pacheco (CECP), na cidade de Coronel Pacheco-MG. O período de coleta de dados (imagens ultra-sonográficas) foi de 21 de junho a 25 de julho de 2006, considerando o início da sincronização do estro até a manifestação do estro subsequente à fase de avaliação do corpo lúteo. Foram utilizadas novilhas mestiças (n=12) com grau de sangue variando de 1/2 a 7/8 holandês-zebu, $23,73 \pm 3,75$ meses de idade, $358 \pm 40,54$ kg de peso vivo, escore de condição corporal $3,0 \pm 0,45$ (escala de 1-5, EDMONSON, 1989), atividade ovariana luteal cíclica regular e sem patologias do aparelho reprodutivo detectáveis à palpação retal, ultra-sonografia e vaginoscopia.

Os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens*, seguindo o manejo nutricional adotado pela Embrapa Gado de Leite. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*. A fim de padronizar as observações ao longo do ciclo, o estro foi sincronizado com a inserção (dia 0) de um dispositivo intravaginal impregnado com progesterona⁸ (CIDR[®]) e sua retirada após seis dias (dia 6), além de uma aplicação de 0,50 mg de um análogo da PGF_{2α}⁹ (Ciosin[®]) no dia 5 (24 horas antes da retirada do dispositivo CIDR[®]). Trinta e seis horas após a retirada do dispositivo intravaginal, iniciaram-se as observações quanto à manifestação de estro com o auxílio de um rufião. Foram consideradas em estro as novilhas que permaneciam imóveis à monta.

2.1.2. Ultra-sonografia e captura de imagens

Após a manifestação de estro, foi considerado iniciado o período experimental e começaram as avaliações ultra-sonográficas diárias, até a ocorrência do estro

⁸ 1,9 g de Progesterona, CIDR[®], Pfizer Saúde Animal, Brasil.

⁹ 0,25 mg/mL Cloprostenol Sódico, Ciosin[®], Shering-Plough Coopers, Brasil.

subseqüente. Utilizou-se um aparelho de ultra-som portátil¹⁰ (Aloka SSD 500) acoplado a um transdutor linear transretal com frequência de 5 MHz. Todos os exames foram realizados pelo mesmo operador e as configurações do aparelho de ultra-som (ganhos proximal, distal e total; área de foco; brilho e contraste) foram padronizadas em valores pré-determinados e iguais durante todo o experimento.

O folículo pré-ovulatório (maior folículo presente no dia anterior à ovulação) e o corpo lúteo (CL) formado após a ovulação foram identificados e mensurados em cada animal. As medidas diárias, em cm², da área do corpo lúteo foram anotadas em planilhas individuais de cada animal, para posterior avaliação da dinâmica luteal durante o ciclo estral. Imagens dos corpos lúteos de cada animal experimental foram gravadas durante todos os dias do ciclo estral, desde a identificação visual do CL na imagem ultrasonográfica, até a manifestação de estro subseqüente.

Para captura das imagens que seriam posteriormente analisadas por computador, a saída de vídeo do aparelho de ultra-som foi conectada à entrada de vídeo do aparelho de vídeo-cassete¹¹ com auxílio de um cabo coaxial. Imagens dos corpos lúteos foram selecionadas considerando a mínima presença de artefatos (refração, dispersão e atenuação das ondas ultra-sônicas). As imagens selecionadas foram congeladas e foi iniciado o processo de gravação para o videocassete. As imagens foram gravadas em fitas VHS, em velocidade SP por cerca de 10 segundos e, posteriormente, digitalizadas com auxílio de um computador pessoal¹² (PC) e uma placa de captura de vídeo¹³ (Pinnacle DC10[®]). As imagens digitais foram arquivadas em formato não compactado, extensão TIFF, com definição de 1500 x 1125 pixels e 256 tons de cinza (4,87 MB de tamanho em disco).

2.1.3. Análise computacional das imagens

A análise computacional das imagens arquivadas foi feita conforme previamente descrito (Capítulo 1). A área de amostragem utilizada nas análises foi a área mínima representativa estabelecida previamente (0,25 cm²; 5184 pixels). Com a quantificação, expressa em valores numéricos, de cada pixel que forma uma região analisada, obteve-se um valor médio da tonalidade de cinza dos corpos lúteos durante o ciclo estral, ou seja, uma representação quantitativa da ecotextura do CL em cada dia do ciclo.

¹⁰ Aloka, modelo SSD 500, Aloka Co., Japão.

¹¹ Gradiente[®], 7 Head Hi-Fi Stereo HT-GSV870.

¹² Pentium 4[®] 2,7GHz, 1,0 GB RAM.

¹³ Pinnacle Studio DC10 AV/DV, Versão 9, Pinnacle Systems, Inc., Mountain View, CA, USA.

Para avaliar a ecogenicidade do CL, foram considerados os mesmos valores utilizados no capítulo 1: o valor médio dos pixels (escala 0-255) e o desvio padrão destes valores, representando a heterogeneidade dos pixels na região analisada.

2.1.4. Coletas de sangue

Amostras de sangue foram coletadas para mensuração da concentração de progesterona [P₄] plasmática. As coletas foram realizadas a cada 48 horas, tendo início no dia do estro e término no estro subsequente (D0, D2, D4, D6,..., 2º estro). O sangue, coletado por punção da veia coccígea em tubos para coleta de sangue a vácuo contendo anticoagulante EDTA sódico¹⁴ (Vacutainer®), foi centrifugado a 894 G (Apêndice 1) por 20 minutos em centrífuga laboratorial refrigerada a 5 °C para completa separação do plasma.

O plasma, recuperado com pipetas automáticas, foi transferido para tubos *ependorf* estéreis (1,5 mL) devidamente identificados com o número do animal, data da coleta e dia do ciclo estral. Os tubos com plasma foram congelados e estocados em freezer a -20 °C até a que a análise das amostras fosse feita.

As análises da [P₄] plasmática foram realizadas no Laboratório de Radioimunoensaio da Embrapa Gado de Leite, com auxílio de um contador gama¹⁵ (Gammatec 600) utilizando-se kits comerciais¹⁶ para radioimunoensaio em fase sólida e progesterona marcada por I¹²⁵.

2.1.5. Análises estatísticas

As variáveis [P₄] plasmática, valor médio de pixels e heterogeneidade dos valores de pixels foram testadas para verificação de normalidade (Teste Lilliefors) e de homogeneidade das variâncias (Teste Cochran e Bartlett). As três variáveis apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas.

Os valores diários mensurados da área e ecotextura luteal e da [P₄] plasmática, avaliados em função do dia do ciclo, por análise de variância, e as diferenças entre médias, de cada dia do ciclo, determinadas pelo teste de Tukey. Foram determinados os períodos de luteogênese e luteólise em função da presença de variações significativas na área luteal e concentração de progesterona, e as mesmas medidas correlacionadas com

¹⁴ Vacutainer®, BD, Juiz de Fora, MG, Brasil.

¹⁵ Gammatec model 600, The Nucleus, Inc., Oak Ridge, TN, USA.

¹⁶ Kit para Progesterona, Coat a Count® – DPC-Med Lab, Rio de Janeiro, Brasil.

os valores de pixels, utilizando-se o método das correlações de Pearson. As análises foram realizadas utilizando-se o software para análises estatísticas SAEG 9.0 (UFV, 2005).

2.2. Experimento 2 – Análise computacional de imagens ultra-sonográficas de corpos lúteos bovinos durante um ciclo estral com luteólise induzida pela aplicação de um análogo sintético da prostaglandina F_{2α}

2.2.1. Período experimental, local de realização e animais

O estudo foi realizado entre 05 e 26 de maio de 2006, no Campo Experimental Fazenda Santa Mônica, pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Valença-RJ. Novilhas mestiças *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* (n=6), com grau de sangue entre 1/2 a 3/4 *Bos taurus taurus*, 399±23,64 kg de peso vivo, condição corporal de 3,17±0,38 pontos (escala 1-5, EDMONSON, 1989) tiveram o estro sincronizado com inserção de um dispositivo intravaginal impregnado com progesterona ¹⁷(CIDR[®]) por 6 dias e uma injeção intramuscular de 0,50 mg de análogo sintético da PGF_{2α} ¹⁸(Ciosin[®]) no dia 5 (24 horas antes da retirada do dispositivo). Cerca de 24 horas após a retirada do dispositivo intravaginal, iniciaram-se as observações quanto à manifestação de estro com o auxílio de um rufião. Foram consideradas em estro as novilhas que permaneciam imóveis à monta.

Após a manifestação de estro, foi considerado o início do período experimental e, os animais foram examinados por ultra-sonografia diariamente até o 10º dia do ciclo estral (dia 0 = estro), quando receberam uma dose de 0,50 mg de cloprostenol sódico (análogo sintético da PGF_{2α}) por via intramuscular.

2.2.2. Ultra-sonografia, captura e análise computacional de imagens

Os procedimentos de exames ultra-sonográficos, captura, digitalização e análise computacional das imagens de corpos lúteos foram os mesmos adotados para o experimento 1.

¹⁷ 1,9 g de Progesterona, CIDR[®], Pfizer Saúde Animal, Brasil.

¹⁸ 0,25 mg/mL Cloprostenol Sódico, Ciosin[®], Shering-Plough Coopers, Brasil.

Só houve diferença na frequência dos exames de ultra-som que, após a aplicação da PGF_{2α} no 10º dia do ciclo, passaram a ser realizados a cada 12 horas, às 7:00 e às 19:00 horas. As novilhas foram examinadas na hora 0 (manhã do D10 = momento da aplicação), 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após a injeção do luteolítico ou até a manifestação do estro, se este ocorresse antes das 96 horas.

2.2.3. Coletas de sangue

Amostras de sangue foram coletadas, processadas e armazenadas da mesma maneira descrita para o experimento 1.

Contudo, a frequência de coletas de sangue foi diária até o momento da aplicação da PGF_{2α} (dia 10 do ciclo), quando passou a ser a cada 12 horas, no momento dos exames ultra-sonográficos, até a manifestação do estro.

A análise da concentração de progesterona [P₄] plasmática foi feita seguindo o mesmo processo do experimento 1 e utilizando o mesmo aparelho de radioimunoensaio.

2.2.4. Análises estatísticas

Os procedimentos para análises estatísticas foram os mesmos adotados no experimento 1.

3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1

Após o fim do protocolo de sincronização de cios utilizado para que fosse iniciado o período experimental, as novilhas manifestaram estro $58,10 \pm 19,95$ (40,5-89,5) horas após a retirada do dispositivo intravaginal. O diâmetro do folículo pré-ovulatório (dia anterior à ovulação) foi de $12,3 \pm 1,8$ mm e foi observada correlação positiva ($r = 0,66$; $P < 0,01$; Tabela 1) entre o diâmetro folicular e o tamanho do corpo lúteo no dia 14 do ciclo estral, quando a $[P_4]$ plasmática atingiu seu valor máximo. Entretanto, não houve correlação entre o diâmetro folicular e a área de tecido luteal, i.e., área do corpo lúteo corrigida para a presença de cavidades subtraindo-se área da cavidade de área total do CL ($r = 0,48$; $P > 0,05$; Tabela 1).

O local da ovulação (corpo hemorrágico) foi visualizado na imagem de ultrassom no D1 (D0 = estro) em somente um animal (9%), no D2 em oito animais (66%) e no D3 em três animais (27%). Dos corpos lúteos formados, oito (66,66%) apresentaram uma cavidade central anecóica preenchida por líquido em algum momento do ciclo estral avaliado.

A duração média do ciclo estral foi de $19,80 \pm 1,55$ dias, com o ciclo mais curto tendo durado 17 dias e o mais longo 22 dias. Estes valores não incluem dados de dois animais que não foram observados em estro após o período de ultra-sonografia, e nos quais foi considerado encerrado o período experimental após a ocorrência de ovulação.

Das 12 ovulações, nove (75%) ocorreram no ovário direito e três (25%) no ovário esquerdo. Houve efeito de tempo (dias do ciclo) sobre as medidas da área de tecido luteal ($P < 0,0001$). As mensurações da secção transversal do corpo lúteo ao longo do ciclo estral, por via transretal, mostraram aumento da área de tecido luteal até a atingir uma área máxima no 10º dia do ciclo. A partir daí, houve um platô e posteriormente uma ligeira queda iniciada no 14º dia (Figura 1).

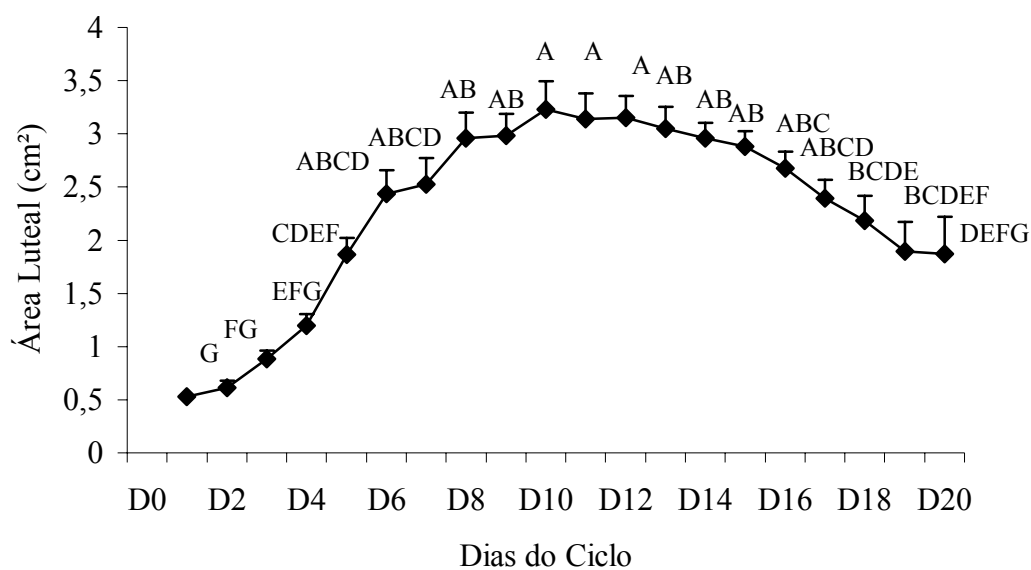


Figura 1. Média±EPM da área de tecido luteal durante o ciclo estral. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

A $[P_4]$ plasmática ao longo do ciclo estral está representada na Figura 2.

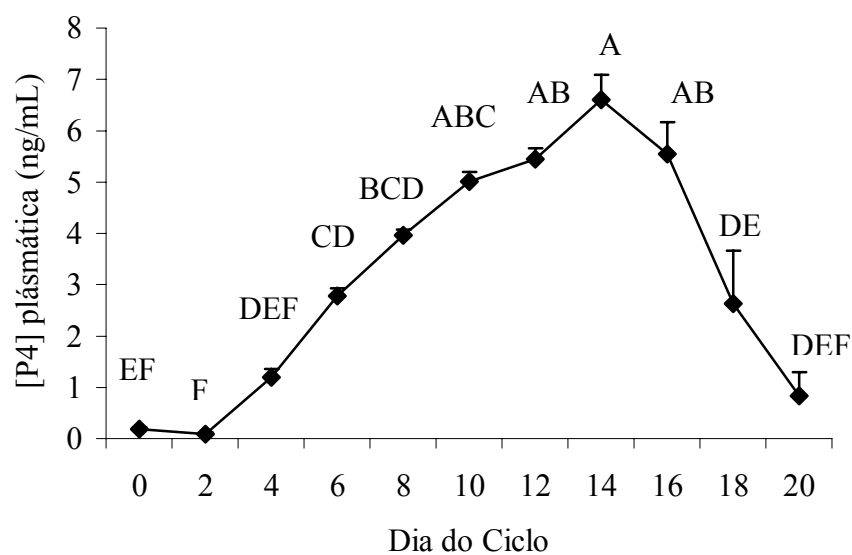


Figura 2. Média±EPM da $[P_4]$ plasmática durante o ciclo estral, sem correção para momento da luteólise. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Foi verificada correlação da área de tecido luteal com a $[P_4]$ plasmática ($r = 0,69$; $P < 0,0001$; Tabela 1). Ainda, a $[P_4]$ plasmática aumentou em função dos dias do ciclo estral e atingiu um valor máximo por volta do 14º dia do ciclo, quando começou a declinar, até atingir valores basais após a luteólise, o que aconteceu por volta do 16º dia do ciclo estral, i.e., três dias antes do estro seguinte.

Não foi observada correlação entre os valores médios de pixel e a $[P_4]$ plasmática ($r = -0,006$; $P > 0,05$; Tabela 1) ou a área de tecido luteal ($r = 0,09$; $P > 0,05$; Tabela 1) durante o ciclo estral avaliado. Entretanto, foi observada correlação negativa entre a heterogeneidade dos pixels e a $[P_4]$ plasmática ($r = -0,18$; $P < 0,05$; Tabela 1) e a área de tecido luteal ($r = -0,12$; $P < 0,05$; Tabela 1). O valor médio da tonalidade e a heterogeneidade dos pixels não variou em função do dia do ciclo (Figuras 3 e 4; $P > 0,05$).

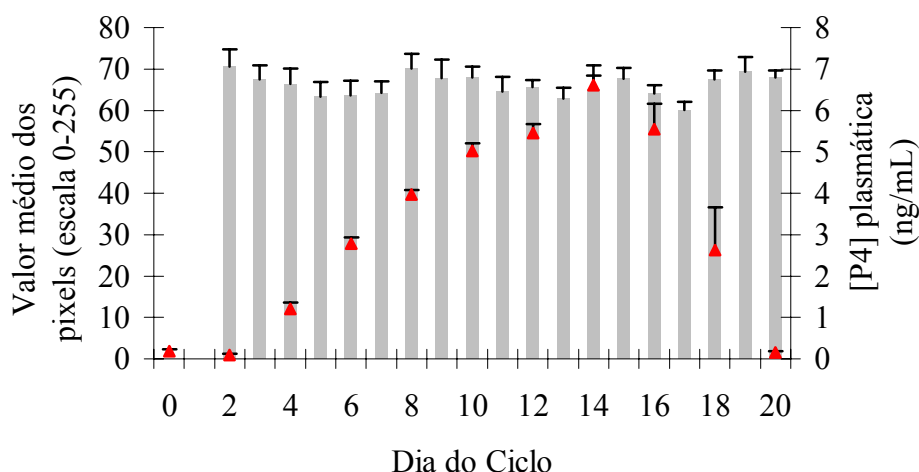


Figura 3. Média±EPM da $[P_4]$ plasmática (▲) e dos valores de pixel (colunas) durante o ciclo estral natural em bovinos.

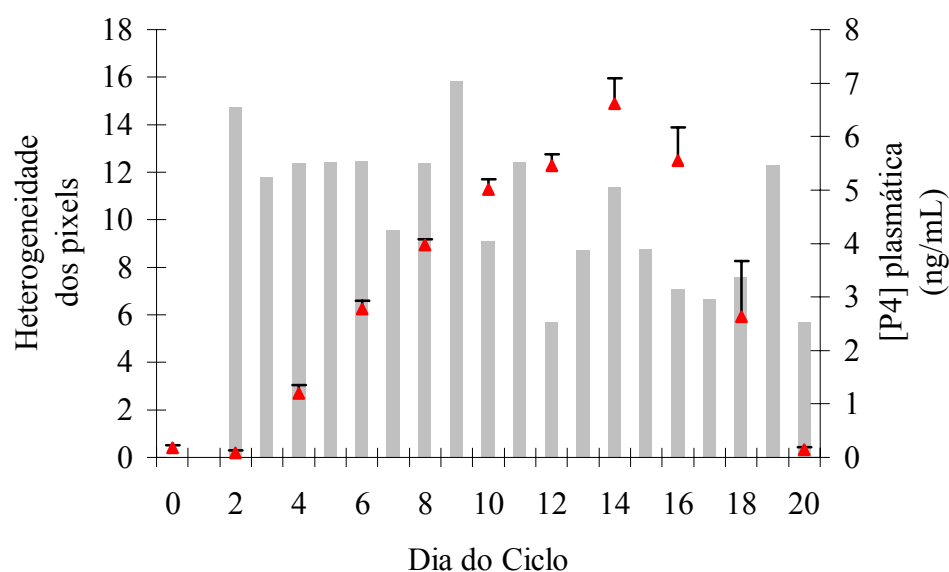


Figura 4. Média±EPM da [P₄] plasmática (▲) e da heterogeneidade dos pixels (colunas) durante o ciclo estral natural em bovinos.

A representação gráfica dos resultados de [P₄] plasmática, valor médio e heterogeneidade dos pixels apresentados nos gráficos anteriores não leva em consideração que os animais experimentais apresentaram ciclos estrais de diferentes durações e, conseqüentemente, o corpo lúteo passou por mudanças funcionais e morfológicas em momentos distintos para cada animal, principalmente próximos à luteólise. Desta forma, os gráficos mascaram variações fisiológicas reais dos parâmetros.

A fim de corrigir este tipo de distorção que possa ter acontecido durante o experimento, outras análises foram realizadas com as variáveis [P₄] plasmática, valor médio de pixels e heterogeneidade dos pixels ajustadas para o momento do início da luteólise. Foi determinado como momento inicial da luteólise (momento 0) o dia anterior (intervalo de 48 horas entre as amostras) a uma queda acentuada da [P₄] plasmática, atingindo valores inferiores a 1,0 ng/mL (Figuras 5, 6 e 7).

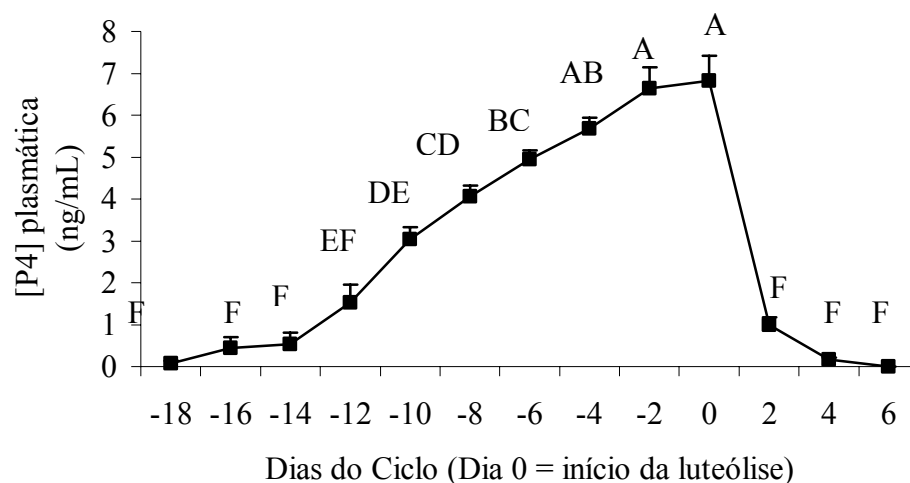


Figura 5. Média±EPM da [P₄] plasmática ao longo o ciclo estral, após correção para o momento da luteólise natural. Médias seguidas de letras diferentes diferiram entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

Após a correção para o momento da luteólise, o valor médio dos pixels (escala 0-255) não variou em função dos dias em relação à luteólise (Figura 6; P>0,10). Contudo, a heterogeneidade apresentou variações em função dos dias em relação à luteólise (Figura 7; P<0,01). Não foi observada correlação da área de tecido luteal com os valores médios de pixel ($r = 0,09$; P>0,05; Tabela 1) mas sim com a heterogeneidade ($r = -0,12$; P<0,05; Tabela 1).

Os valores dos coeficientes de correlação entre as variáveis estudadas após análise computacional das imagens de ultra-som estão na tabela 1.

Tabela 1. Correlações de Pearson entre variáveis analisadas no experimento 1.

Variável 1	Variável 2	r	P
Diâmetro folículo ovulatório	Área do CL no 14º dia	0,66	<0,01
Diâmetro folículo ovulatório	Área do tec. luteal no 14º dia	0,48	>0,05
Área de tecido luteal	[P ₄] plasmática	0,69	<0,0001
Valor médio de pixels	[P ₄] plasmática	-0,006	>0,05
Valor médio de pixel (corrigido)	[P ₄] plasmática	-0,39	0,11
Valor médio de pixels	Área de tecido luteal	0,09	>0,05
Valor médio de pixel (corrigido)	Área de tec. luteal	0,09	>0,05
Heterogeneidade dos pixels	[P ₄] plasmática	-0,18	<0,05
Heterogeneidade dos pixels (corrigido)	[P ₄] plasmática	-0,69	0,008
Heterogeneidade dos pixels	Área de tecido luteal	-0,13	<0,05
Heterogeneidade dos pixels (corrigido)	Área de tec. luteal	-0,12	<0,05

* r = coeficiente de correlação

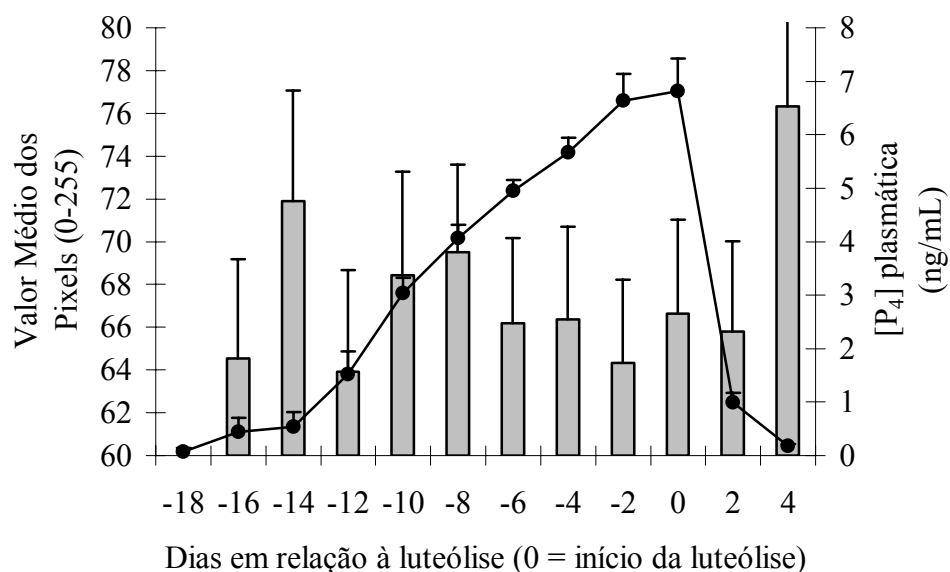


Figura 6. Média±EPM da [P₄] plasmática (●) e dos valores médios dos pixels (colunas) durante o ciclo estral em bovinos, após correção para o momento da luteólise natural.

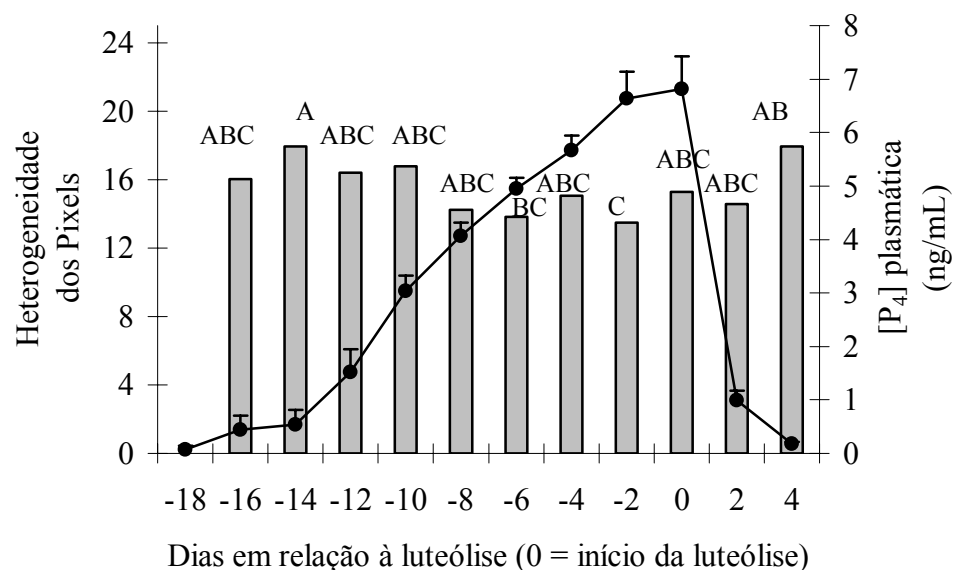


Figura 7. Média±EPM da [P₄] plasmática (●) e da heterogeneidade dos pixels (colunas) durante o ciclo estral em bovinos, após correção para o momento da luteólise natural. Médias seguidas de letras diferentes, nas colunas, diferiram entre si pelo teste Tukey (P<0,01).

3.2. Experimento 2

Após o estro, foi possível visualizar com o auxílio do aparelho de ultra-som dois (33,33%) corpos hemorrágicos no 2º dia (dia 0 = estro) e quatro (66,7%) no 3º dia do ciclo estral. Dos seis corpos lúteos formados, três (50%) apresentaram uma cavidade central anecóica preenchida por líquido. O diâmetro médio do folículo observado no dia anterior à ovulação foi de 12,4±1,4mm. Não foram observadas correlações (P>0,05) entre o diâmetro do folículo pré-ovulatório e área do corpo lúteo no dia 10 do ciclo estral (dia de maior [P₄] plasmática) ou área de tecido luteal (após correção para presença de cavidades) neste mesmo dia.

Com a aplicação da PGF_{2α} no décimo dia do ciclo estral, cinco novilhas (83,33%) manifestaram estro em média 86,9±13,2 horas após o tratamento. Um animal não apresentou estro ou ovulação até o fim das avaliações (96 horas após a PGF_{2α}).

A dinâmica da área de tecido luteal, corrigida para a presença de cavidades, está representada na Figura 8. Foi observado aumento da área luteal, com valor diferente, em relação aos valores do metaestro, a partir do 5º do ciclo (P<0,05), semelhante ao observado no experimento 1. A área luteal máxima foi atingida no 10º dia do ciclo estral (momento da aplicação da PGF_{2α}). Trinta e seis horas após a injeção do luteolítico, a

área de tecido luteal estava reduzida à mesma área observada no 3º dia do ciclo, ainda no período inicial de formação do corpo lúteo. Mesmo durante a manifestação de estro após o tratamento, embora já sem atividade esteroidogênica, o corpo lúteo ainda podia ser identificado na imagem de ultra-som.

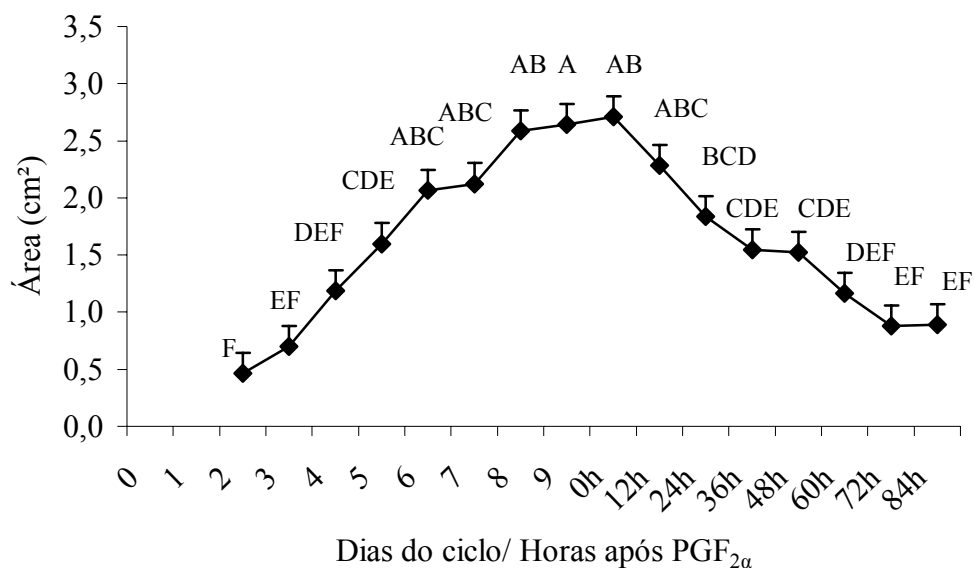


Figura 8. Média±EPM da área de tecido luteal em bovinos, mensurada por exame ultrassonográfico obtidos por via transretal durante os dias iniciais do ciclo estral e após a aplicação da PGF_{2α}. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

A $[P_4]$ plasmática durante o ciclo estral e após o tratamento com cloprostenol sódico está representada no Figura 9.

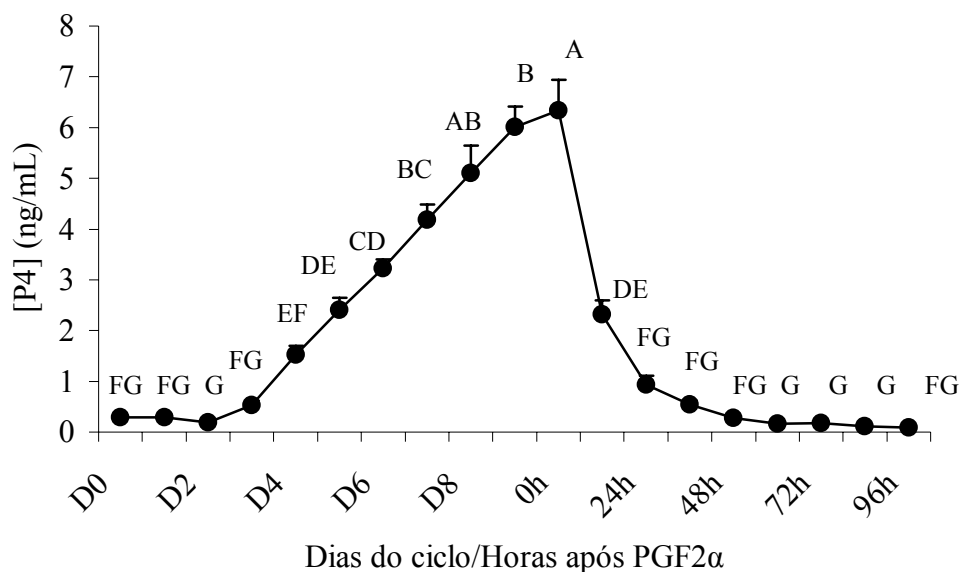


Figura 9. Média±EPM da $[P_4]$ plasmática no início do ciclo estral e após a aplicação de um análogo da $PGF_{2\alpha}$ no 10º dia do ciclo, em bovinos. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Foi observado aumento na $[P_4]$ plasmática em função dos dias do ciclo, com diferença, em relação aos valores no estro, a partir do quinto dia do ciclo estral ($P < 0,05$). A $[P_4]$ plasmática atingiu valor máximo (6,33 ng/mL) no 10º dia do ciclo, momento da aplicação de $PGF_{2\alpha}$ (0h). Vinte e quatro horas após a aplicação de $PGF_{2\alpha}$, a $[P_4]$ plasmática retornou a valores basais, similares aos observados no estro. Contudo, a queda na área de tecido luteal foi menos brusca, em relação à $[P_4]$ plasmática (Figura 10).

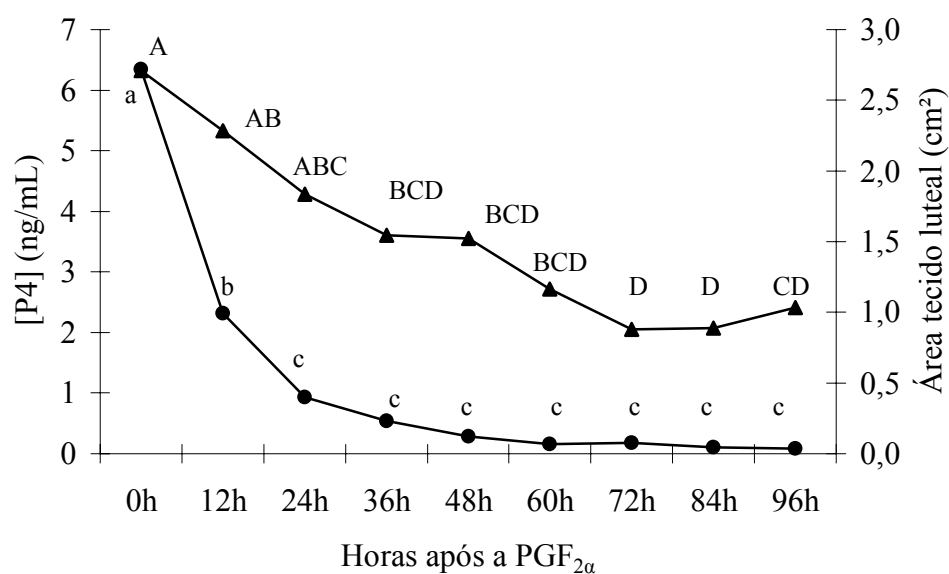


Figura 10. Médias da (●) [P4] plasmática e (▲) área de tecido luteal após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Os valores médios e de heterogeneidade dos pixels após análise computacional das imagens de ultra-som são representados nas figuras 11 e 12, e a ilustração gráfica da relação entre a [P4] plasmática e o valor médio de pixels e heterogeneidade está representada nas figuras 13 e 14, respectivamente.

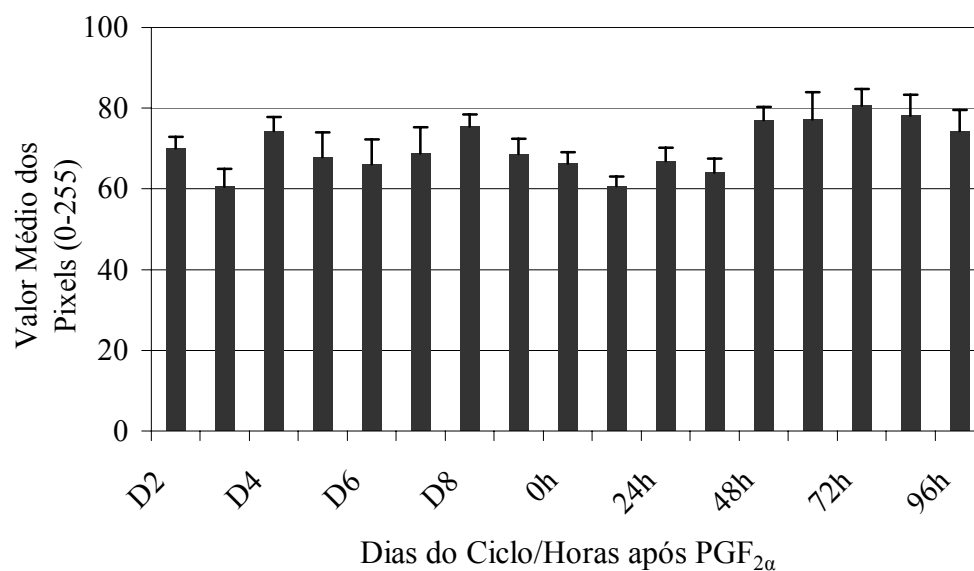


Figura 11. Média±EPM dos valores médios de pixel nos dias do ciclo estral, em bovinos, e horas após a injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

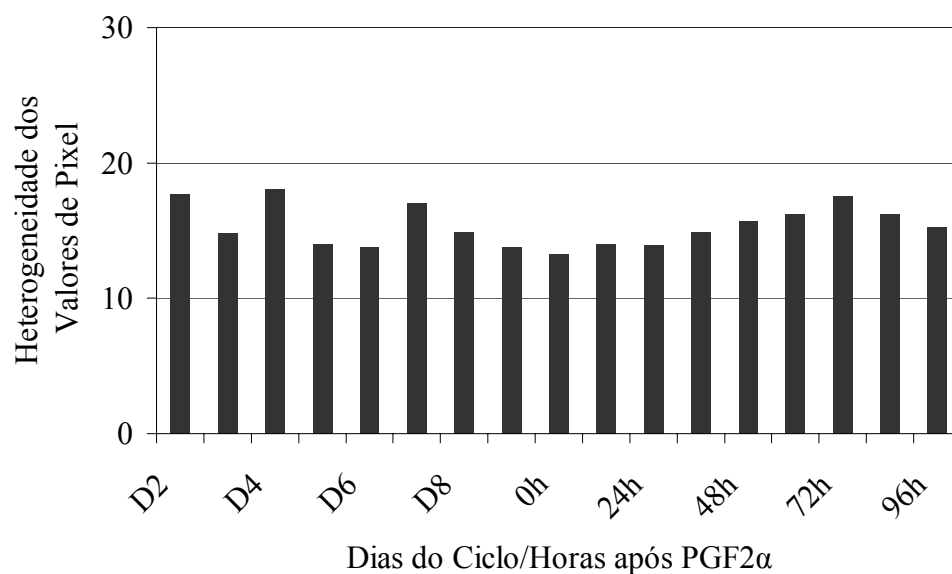


Figura 12. Média da heterogeneidade dos pixels ao longo do ciclo estral, em bovinos, e horas após a injeção de PGF_{2α}.

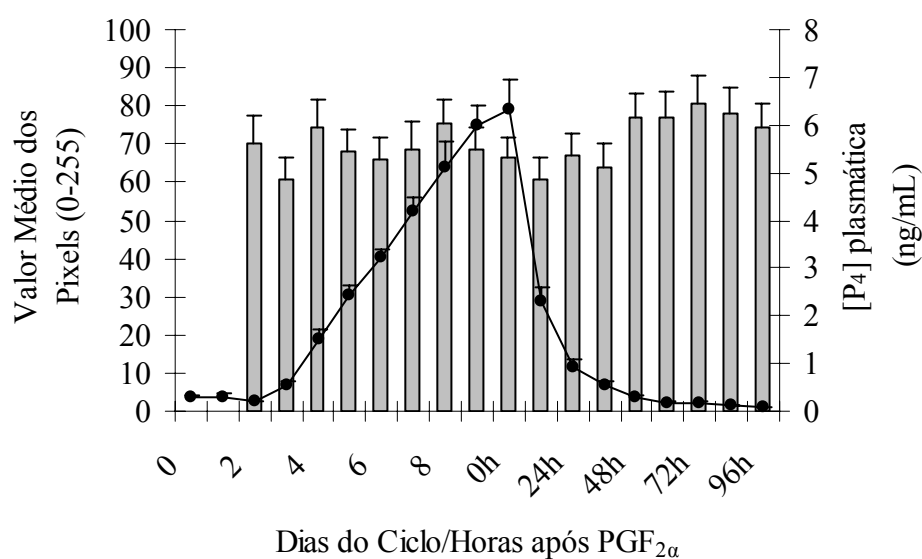


Figura 13. Média±EPM da [P₄] plasmática (●) e dos valores de pixel (colunas) nos dias iniciais do ciclo estral em bovinos e após a aplicação da PGF_{2α}. Não houve diferença nos valores de pixel em função dos dias e após a PGF_{2α} ($P>0,10$). Também não foi observada correlação entre as duas variáveis ($r = -0,28$; $P>0,10$).

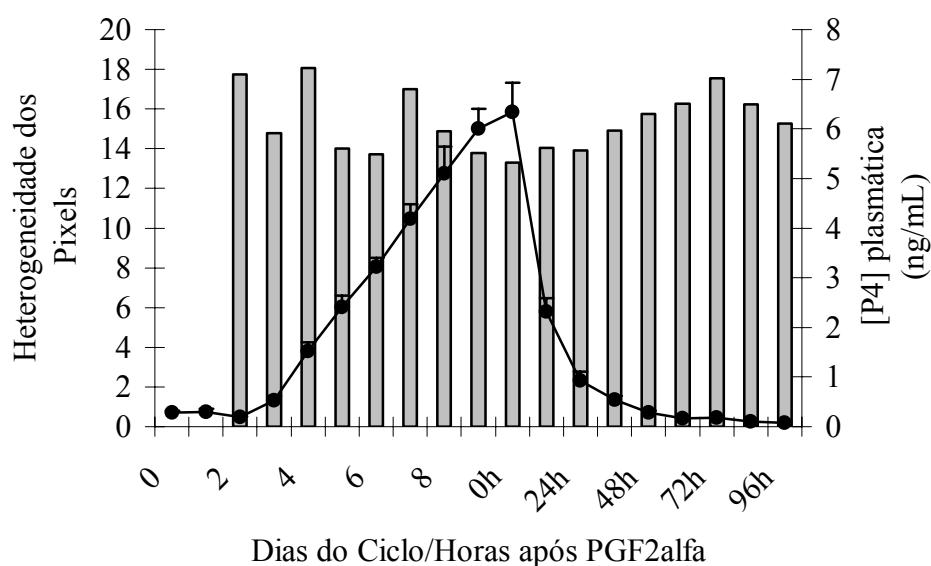


Figura 14. Média±EPM da [P₄] plasmática (●) e da heterogeneidade dos pixels (colunas) nos dias iniciais do ciclo estral em bovinos e após a aplicação da PGF_{2α}. A heterogeneidade não variou em função dos dias e após a PGF_{2α} (P>0,10). Foi observada uma correlação negativa entre as duas variáveis (r = -0,48; P<0,05).

Tabela 2. Correlações de Pearson entre variáveis analisadas no experimento 2.

Variável 1	Variável 2	r	P
Valor médio de pixel	[P ₄] plasmática	-0,28	>0,10
Heterogeneidade dos pixels	[P ₄] plasmática	-0,48	<0,05

* r = coeficiente de correlação

As figuras 15 e 16 ilustram um exemplo individual do comportamento e da distribuição dos valores médios e de heterogeneidade dos pixels, relacionados com a [P₄] plasmática ao longo do ciclo estral e após o tratamento com PGF_{2α} em um animal experimental.

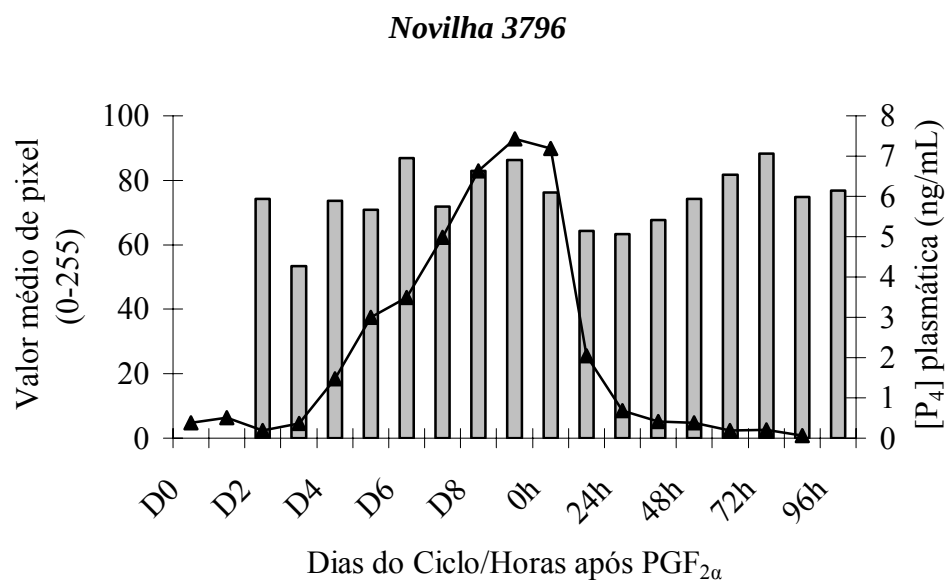


Figura 15. Distribuição dos valores médios de pixel (colunas) e da [P₄] plasmática (▲) ao longo do ciclo estral bovino, de um animal experimental.

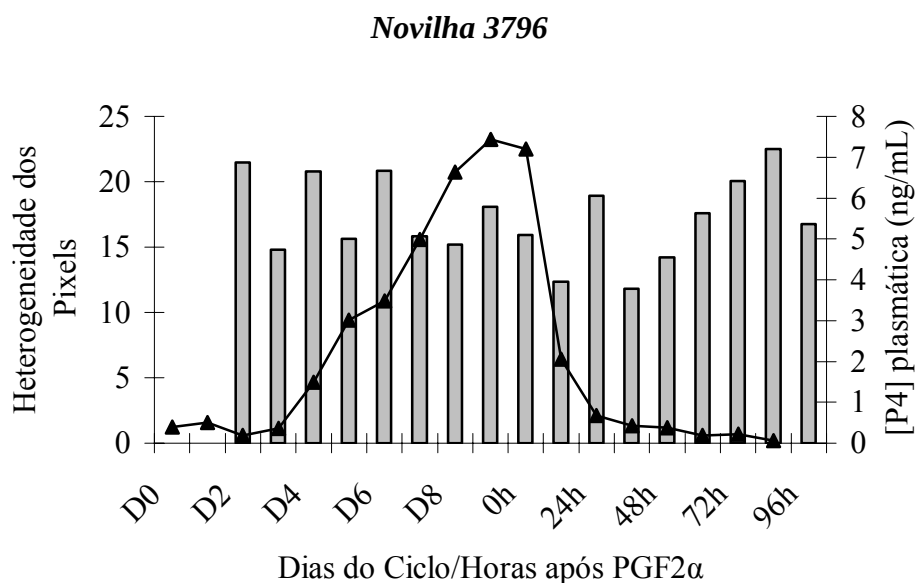


Figura 16. Distribuição da heterogeneidade dos pixels (colunas) e da [P₄] plasmática (▲) ao longo do ciclo estral bovino, de um animal experimental.

4. DISCUSSÃO

De acordo com Wiltbank et al. (2002), o tamanho do folículo ovulatório é altamente variável em bovinos. Sartori et al. (2000) observaram folículos ovulatórios com diâmetro de $14,8 \pm 0,2$ mm em novilhas holandesas, e $17,4 \pm 0,5$ mm em vacas lactantes. E, Ginther et al. (1989a) demonstraram haver diferença no tamanho do folículo pré-ovulatório entre novilhas com ciclos estrais de duas ou três ondas foliculares ($16,5 \pm 0,4$ e $13,9 \pm 0,4$; respectivamente). No presente estudo, os valores médios de diâmetro dos folículos ovulatórios registrados nos dois experimentos ($12,3 \pm 1,8$ mm e $12,4 \pm 1,4$ mm nos experimentos 1 e 2, respectivamente) são coerentes com a categoria estudada (novilhas) e o grau de sangue dos animais (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*).

No entanto, a variação observada no diâmetro folicular foi considerada alta em ambos os experimentos, em relação às variações registradas em estudos anteriores (2,0 % SARTORI et al., 2000 e 2,5%, GINTHER et al., 1989a). Esta alta variação se deve, possivelmente, à diferença de grau de sangue entre os animais experimentais, que, embora fossem todos mestiços, possuíam graus de sangue variando de 1/2 até 7/8 *Bos taurus taurus*. Animais zebuínos ovulam folículos menores, em relação a taurinos (FIGUEIREDO et al., 1997; VIANA et al., 2000). Quando os objetos de estudo são animais mestiços, há uma grande dificuldade em predizer o tamanho do folículo ovulatório esperado, devido à própria variabilidade genética inerente ao cruzamento entre raças.

A correlação entre o diâmetro folicular e o corpo lúteo formado após a ovulação, no experimento 1, era esperada. Estudos anteriores demonstraram que a ovulação de folículos menores leva à formação de corpos lúteos de menor área (VASCONCELOS, et al., 2001), sugerindo alta correlação entre estas duas medidas. Parece ser coerente ainda, haver relação ($r = 0,66$; $P < 0,01$; Tabela 1) entre o diâmetro folicular e a área do CL, mas não haver quando a área do CL foi corrigida para a presença de cavidades ($r = 0,48$; $P > 0,05$; Tabela 1), observadas no experimento 1. A luteinização das células foliculares tem início na parede externa. Mesmo se a luteinização não for completa, o que origina cavidades luteais, esta cavidade é parte intrínseca do CL formado. Se for descontada a área da cavidade, mesmo não se tratando de tecido luteal, a área total do CL será subestimada, refletindo assim na correlação com o diâmetro do folículo que se luteinizou e deu origem ao CL.

No experimento 2 não foram observadas correlações do diâmetro do folículo pré-ovulatório tanto com a área do corpo lúteo quanto com a área de tecido luteal no D10 ($r = 0,37$; $r = 0,60$, respectivamente; $P > 0,05$). Estes resultados, contudo, devem ser analisados considerando-se o menor número de animais avaliados (6 vs 12), o dia da avaliação da área do corpo lúteo (D10 vs D14, respectivamente) e as variações no número de corpos lúteos cavitários e tamanho das cavidades entre os animais de cada experimento. Baseado nos resultados de ambos os experimentos e de estudos anteriores, pode-se afirmar que o diâmetro do folículo no dia anterior à ovulação é um parâmetro que, de forma geral, tem potencial para predizer a área do corpo lúteo a se formar após a ovulação, mas está sujeito às variações individuais.

Kastelic et al. (1990a) detectaram a presença do CL pela primeira vez no dia $0,5 \pm 0,1$ após a ovulação, variando dos dias 0 a 4. Considerando que os animais dos experimentos 1 e 2 ovularam entre o 1º e o 2º dia após o estro (58,3% e 41,7%, no experimento 1; 50% e 50% no experimento 2, para ovulações no 1º e 2º dias respectivamente), os resultados de primeira detecção do CL na imagem ultrasonográfica, em ambos os experimentos, são similares aos observados no estudo anterior.

A cavidade central do corpo lúteo é preenchida por um transudato seroso límpido (SINGH et al., 1997). A presença de cavidades centrais anecóicas em corpos lúteos já foi descrita em estudos anteriores e a porcentagem de corpos lúteos cavitários varia entre os estudos. Kastelic et al. (1990a) observaram cavidades de diferentes tamanhos em 79% dos corpos lúteos estudados. Ainda, segundo estes autores, não há indícios de que a presença de cavidades luteais seja importante do ponto de vista funcional. Singh et al. (1997) estudaram 58 corpos lúteos e visualizaram uma cavidade central de pelo menos três milímetros em 42 deles (72,4%). E Tom et al. (1998) registraram 40% de corpos lúteos cavitários (6/9). Os resultados do presente estudo (66% no experimento 1, e 50% no experimento 2) corroboram resultados anteriores e estão dentro da expectativa em relação à proporção de corpos lúteos cavitários. A duração do ciclo estral com luteólise natural (experimento 1), que foi de 17 a 22 dias, está dentro dos padrões descritos para novilhas (HAFEZ, 1995).

No experimento 1 foi verificada alta porcentagem de ovulações no ovário direito (75%). A ocorrência de um leve desvio na proporção do local das ovulações, tendendo para maior número no ovário direito em relação ao esquerdo, é um fenômeno conhecido em bovinos, embora ainda não tenha sido completamente elucidada a causa deste

desvio. Em avaliações de receptoras de embriões, Viana (1996) registrou 64,35% de ovulações no ovário direito e outros 35,64% no ovário esquerdo.

O efeito de tempo (dias do ciclo) sobre as medidas da área de tecido luteal ($P < 0,0001$), observado nos dois experimentos já foi descrito em estudos anteriores (KASTELIC et al., 1990a; SINGH et al., 1997). No presente estudo, foi observado aumento da área luteal, com valores diferentes, em relação aos do metaestro, a partir do 5º do ciclo (Figura 1). No experimento 1, a área máxima foi atingida no 10º dia do ciclo. A partir daí, houve um platô e, posteriormente, uma queda iniciada no 14º dia. Este aumento progressivo, característico do período de luteogênese, até uma área máxima, com posterior queda na área de tecido luteal é semelhante ao observado por Kastelic et al. (1990a).

Os resultados do experimento 1, quando as avaliações ultra-sonográficas foram realizadas durante todo o ciclo estral natural, mostraram correlação da área de tecido luteal com a $[P_4]$ plasmática ($r = 0,69$; $P < 0,0001$; Tabela 1). Altos coeficientes de correlação entre a área seccional ou o diâmetro do corpo lúteo e a $[P_4]$ plasmática já foram reportados em estudos anteriores, tanto em bovinos ($r = 0,68$; SPRECHER et al., 1989; $r = 0,76$; KASTELIC et al., 1990c; $r = 0,73$; WILTBANK et al., 1995) quanto em ovinos ($r = 0,59$ e $r = 0,36$; $P < 0,05$; DAVIES et al., 2006). Observando a área do CL e a concentração de progesterona no 7º dia do ciclo estral de receptoras de embrião, Viana (1996) não verificou correlação entre estas variáveis ($r = 0,1579$; $P > 0,05$). Ainda, as concentrações do hormônio em um determinado dia do ciclo refletem uma combinação entre as taxas de síntese, liberação e metabolismo sistêmico (VIANA, 1996). Os resultados do presente estudo demonstram que o aumento na área de tecido luteal, histologicamente caracterizado por uma hiperplasia e hipertrofia das células esteroidogênicas (NISWENDER et al., 1994), reflete positivamente na produção de progesterona pela glândula luteal, aumentando os valores sistêmicos de concentração deste hormônio. Esta variação pôde ser observada em ambos os experimentos, nos quais houve aumento na $[P_4]$ plasmática nos dias iniciais do ciclo estral, com diferença, em relação aos valores no estro, a partir do quinto dia (Figuras 2 e 9). Este aumento na $[P_4]$ a partir do 4º dia do ciclo estral já foi observado em bovinos (SPANO e ROSA e SILVA, 1992; CHAGAS E SILVA et al., 2002) e acompanhou o aumento da área de tecido luteal nos dois experimentos.

Em relação ao experimento 1, as variações observadas na $[P_4]$ plasmática (aumento em função dos dias do ciclo estral atingindo valor máximo por volta do 14º dia, com posterior declínio até valores basais após a luteólise; Figura 5) estão de acordo

com os registrados por Spano e Rosa e Silva (1992). As variações observadas nas concentrações sanguíneas de progesterona ao longo da fase luteal do ciclo estral refletem os sucessivos estágios de crescimento, manutenção e regressão do corpo lúteo (THIBAUT, 1993).

Há diferenças de tempo, em horas, entre a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a manifestação do estro, quando a aplicação é realizada em diferentes dias do ciclo estral. A fase do diestro na qual é realizada a aplicação do luteolítico pode ser uma importante fonte de variação na resposta à sincronização (VIANA, 1996). A injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no 7º dia do ciclo permitiu uma rápida maturação e ovulação do folículo dominante viável da primeira onda de crescimento folicular. Quando foram feitas aplicações de 0,5 mg de cloprostenol sódico (análogo sintético da $\text{PGF}_{2\alpha}$) entre os dias 6 e 17 do ciclo, foi observada uma eficiência de sincronização de 82,5% e um tempo médio até o estro de $57,06 \pm 16,5$ horas (FERNANDES et al., 1993).

Considerando somente os resultados do experimento 2, no qual a luteólise foi induzida artificialmente, a eficiência de sincronização do presente estudo (83,33%) foi semelhante à observada em estudos anteriores (COLAZO et al., 2002; GIOSO et al., 2005). Porém o intervalo da aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ à manifestação de estro ($86,9 \pm 13,2$) foi superior aos observados em estudos anteriores (VIANA, 1996; GIOSO et al., 2005), nos quais a aplicação foi feita sem o prévio conhecimento da fase do ciclo estral.

Os resultados observados de redução da $[\text{P}_4]$ plasmática, após luteólise natural ou induzida pela aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, corroboram dados de estudos anteriores. Segundo Viana et al. (1999) durante o processo de luteólise, a redução na concentração plasmática de progesterona resulta em valores basais em apenas 24 horas, enquanto a regressão do tecido luteal ocorre mais lentamente. A queda inicial da concentração de P_4 no sangue, observada no presente estudo, possivelmente não ocorreu devido à perda de células esteroideogênicas, visto que, o número de células luteais (área de tecido luteal) não diminui antes da concentração de P_4 . A diminuição da secreção de P_4 ocorre devido ao decréscimo no fluxo sanguíneo com conseqüente diminuição da capacidade esteroideogênica de cada célula luteal individualmente (NISWENDER et al., 2000). Ainda, a regressão funcional do corpo lúteo é caracterizada pelo decréscimo na produção de progesterona, e a regressão estrutural se manifesta, histologicamente, como uma degradação do tecido luteal (PATE, 1994) por meio de um complexo processo de morte celular e remodelamento tecidual (JUENGEL et al., 1994).

Considerando os resultados da análise computacional de imagens dos experimentos 1 e 2, verifica-se que em ambos não foi observada correlação dos valores

médios de pixel com a $[P_4]$ plasmática ($r = -0,006$ e $r = -0,28$ para os experimentos 1 e 2, respectivamente; $P > 0,10$; Tabelas 1 e 2).

Quando foi levado em consideração que as novilhas do experimento 1 iniciaram o processo de luteólise natural em dias distintos do ciclo estral, refletindo na duração do ciclo, a correção dos valores de progesterona plasmática (ng/mL) e da intensidade dos pixels se mostrou valiosa, pois ilustra de forma realista os eventos fisiológicos que aconteceram durante o ciclo estral de cada animal individualmente. Após este ajuste dos valores para os dias em relação ao momento da luteólise, continuou não havendo correlação entre a $[P_4]$ plasmática e os valores médios de pixel (Figura 6; $r = -0,39$; $P = 0,11$).

Esta baixa e não significativa correlação, observada no presente estudo, difere dos resultados de estudos anteriores, onde foram observadas correlações negativas em bovinos ($r = -0,71$; $P < 0,03$; SINGH et al., 1997) e positivas em ovinos ($r = 0,48$ e $r = 0,26$; $P < 0,05$; DAVIES et al., 2006) entre o valor médio dos pixels na região de amostragem do corpo lúteo e a $[P_4]$ plasmática.

Após análise de correlação da heterogeneidade dos pixels nas imagens com a $[P_4]$ plasmática, foi observada relação entre estas características mesmo antes da correção para o momento da luteólise no experimento 1 (Figuras 4 e 14; $r = -0,18$ e $r = -0,48$ para os experimentos 1 e 2, respectivamente; $P < 0,05$). No experimento 1, assim como ocorreu no valor médio de pixels, a relação entre heterogeneidade e $[P_4]$ plasmática aumentou após a correção para o momento da luteólise natural, atingindo alto coeficiente de correlação (Figura 7; $r = -0,69$; $P < 0,01$). Esta alta correlação deve ser levada em consideração quando se deseja interligar eventos histológicos e fisiológicos às características da imagem ultra-sonográfica.

Nos dois experimentos, foi verificada correlação negativa entre a heterogeneidade da região analisada na imagem do corpo lúteo e a $[P_4]$ plasmática, ou seja, nos dias do ciclo em que o corpo lúteo apresentou maior heterogeneidade, a $[P_4]$ plasmática estava menor em relação aos dias em que havia maior homogeneidade na imagem (Figuras 7 e 14). Os resultados diferem dos registrados em ovinos, onde houve correlação da $[P_4]$ plasmática com os valores médios de pixel, mas não com a heterogeneidade (DAVIES et al, 2006).

Em ambos os experimentos, não houve correlação entre $[P_4]$ plasmática e os valores médios de pixel, que também não variaram em função dos dias do ciclo estral, permanecendo semelhantes nas fases de desenvolvimento, maturidade e regressão luteal, ou seja, não indicaram as mudanças teciduais e funcionais que ocorrem no CL ao

longo do ciclo. Estes resultados diferem de estudos anteriores que avaliaram quantitativamente a ecotextura de corpos lúteos bovinos (SINGH et al., 1997; TOM et al., 1998) e ovinos (DAVIES et al., 2006). Tanto em bovinos quanto em ovinos, foram verificadas correlações entre as medidas de ecogenicidade da imagem (valor de pixel e heterogeneidade) e a concentração plasmática de progesterona, progesterona luteal e área do corpo lúteo. Ainda, os valores médios de pixel variaram nas diferentes fases do ciclo estral, o que não aconteceu no presente estudo. As variações dos atributos de imagens ultra-sonográficas em diferentes fases do ciclo estral, levaram os autores a concluir que a análise computacional de imagens ultra-sonográficas é um potencial indicador do status fisiológico e endócrino do corpo lúteo. No presente estudo, com a metodologia de captura, processamento e análise de imagens utilizada, não foi possível verificar potencialidade dos valores médios dos pixels em prever funcionalidade do CL.

No presente estudo, a heterogeneidade variou em função dos dias do ciclo e mostrou alta correlação negativa com a $[P_4]$ plasmática, nos dois experimentos conduzidos. Interligando eventos histológicos e características de ecotextura, verifica-se que nas fases iniciais do ciclo estral (baixa progesterona), quando o corpo lúteo passa por intenso remodelamento tecidual, alta atividade angiogênica e luteinização de células anteriormente foliculares, a imagem ultra-sonográfica é mais heterogênea, refletindo o processo de desenvolvimento e formação de uma glândula. Na medida em que se estabelecem e se organizam as células luteais produtoras de hormônio, há aumento na concentração de progesterona circulante e diminuição na heterogeneidade da ecotextura do CL. Este momento do ciclo é caracterizado, sistemicamente, por altos valores de progesterona plasmática e, localmente, por grande proporção de células luteais em relação a outros tipos celulares, tornando a estrutura histológica do corpo lúteo mais uniforme. Do ponto de vista ultra-sonográfico, esta fase do ciclo apresenta um CL com máxima área de tecido luteal e menor heterogeneidade nos valores dos pixel que compõem a imagem (Figuras 1 e 7).

Após o início dos sinais de luteólise (natural ou induzida), que começam a ocorrer a partir do terço final do ciclo estral natural, a estrutura histológica do corpo lúteo tende a se desorganizar pelo processo natural de morte celular e degradação tecidual, devido à interrupção na vascularização luteal, mediada pela $PGF_{2\alpha}$. Há uma queda na produção hormonal e diminuição da massa luteal. Nesta fase final do ciclo, o exame ultra-sonográfico mostrou um CL com redução constante na sua área e uma maior heterogeneidade nos valores de pixel representados na imagem (Figuras 1 e 7).

A natureza dos exames e os equipamentos utilizados na geração, captura e processamento das imagens devem ser considerados quando forem avaliados os atributos de imagens ultra-sonográficas. Os métodos divergiram entre os estudos anteriores e o presente. Há diferenças metodológicas desde o momento do exame ultra-sonográfico (*in vitro* ou *in vivo*) até o software utilizado na análise computacional das imagens. Ainda, as conclusões dos estudos anteriores não foram definitivas. Apenas afirmam que os atributos de imagens ultra-sonográficas estão relacionados com os eventos fisiológicos que acontecem no ciclo estral, indicando alterações no status funcional do CL.

A análise computacional de imagens tem potencial para ser utilizada na avaliação da função/disfunção do órgão ou tecido em exame. No entanto, somente a mensuração dos valores médios de pixel não é um indicador confiável da funcionalidade da glândula e da produção de progesterona luteal (PIERSON e ADAMS, 1995; SINGH et al., 1997; TOM et al., 1998; DAVIES et al., 2006).

Os exames realizados em recipientes com água (*in vitro*) são importantes para que se tenha uma idéia inicial da potencialidade da técnica. Contudo, após ter sua eficiência comprovada *in vitro*, é necessário adaptar a tecnologia para a real situação dos exames feitos a campo. Um dos principais objetivos deste estudo foi verificar a eficácia da análise computacional de imagens como ferramenta auxiliar na avaliação da função luteal em bovinos. Os exames de ultra-som que foram realizados (via transretal) estiveram sujeitos a diferentes interferências na qualidade da imagem e a artefatos gerados por estruturas ou órgãos adjacentes ao ovário, semelhante ao que se encontra na rotina de exames ginecológicos. A presença de fezes, gases ou qualquer conteúdo intestinal, além da presença ou não de urina na bexiga, levam a distorções na imagem gerada, podendo comprometer a qualidade do exame.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a heterogeneidade dos valores de pixel observada em imagens ultra-sonográficas de corpos lúteos bovinos é um forte indicador de funcionalidade e capacidade esteroidogênica da glândula luteal, visto que esteve correlacionada com a $[P_4]$ plasmática e com a área de tecido luteal. Já os valores médios dos pixels que compõem as imagens não refletem as mudanças morfológicas e funcionais do corpo lúteo ao longo de um ciclo estral.

Ainda é necessário um aperfeiçoamento nos métodos de captura e análise de imagens obtidas em situações rotineiras no campo e uma melhor definição dos parâmetros e características desejáveis nestas imagens. Não se deve considerar somente a média da tonalidade dos pixels, mas outras características da imagem, como por

exemplo, o padrão de distribuição dos pixels de diferentes tonalidades (heterogeneidade).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARLIN, S.K., GARST, A.S., TARRAF, C.G., BAILEY, T.L., MCGILLIARD, M.L., GIBBONS, J.R. Effects of ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on oocyte recovery and hormonal profile before and after GnRH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 1489-1503, 1999.
- 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.
- COLAZO, M.G., MARTINEZ, M.F., KASTELIC, J.P., MAPLETOFT, R.J. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 2225, p. 1-16, 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.
- EDMONSON, A. J., LEAN, I. J., WEAVER, L. D., FARVER, T., WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 68-78, 1989.
- FERNANDES, C.A.C., TORRES, C.A.A., GERBERS, A.M., COELHO, A.A. Comparação entre duas doses e vias de aplicação de um produto luteolítico para sincronização de estro em bovinos. **Anais do X Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, v. 2, 1993.
- FIELDS, M. J., FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, p. 1295-1325, 1996.

- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M. Ovarian follicular dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p. 1489-1505, 1997.
- FORTUNE, J.E., SIROIS, J., QUIRK, S.M. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. **Theriogenology**, v. 29, p. 95, 1988.
- FORTUNE, J.E. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility? **Animal Reproduction Science**, v. 33, p. 11-125, 1993.
- GIOSO, M.M., COSTA, E.P., FERNANDES, C.A.C., TORRES, C.A.A., CARVALHO, G.R. Perfil de progesterona e intervalo ao estro de receptoras bovinas sincronizadas com doses reduzidas de cloprostenol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1181-1187, 2005.
- GINTHER, O.J., KNOFF, L., KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989 (a).
- GINTHER, O.J., KNOFF, L., KASTELIC, J.P. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 247-254, 1989 (b).
- GOODHAND, K.L., WATT, R.G., STAINES, M.E., HUTCHINSON, J.S.M., BROADBENT, P.J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 951-961, 1999.
- HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6ª edição. Editora Manole, São Paulo, 1995.
- JUENGEL, J.L., SMITH, G.W., SMITH, M.F. YOUNGQUIST, R.S., GARVERICK, H.A. Pattern of protein production by bovine corpora lutea during luteolysis and characterization of expression of two major secretory products of regressing corpora lutea. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, n. 2, p. 515-520, 1994.

- KASTELIC, J. P., GINTHER, O. J. Fate of conceptus and corpus luteum after induced embryonic loss in heifers. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 194, p. 922-928, 1989
- 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, no 3, p. 487-498, 1990 (a).
- KASTELIC, J.P., KNOPF, L., GINTHER, O.J. Effect of day of prostaglandin F2 α treatment on selection and development of ovulatory follicles in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, p. 169, 1990 (b).
- KASTELIC, J.P., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1269-1278, 1990 (c).
- NISWENDER, G.D., JUENGEL, J.L., MCGUIRE, W.J., BELFIORE, C.J., WILTBANK, M.C. Luteal Function: The estrous cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, 50, p. 239-247, 1994.
- NISWENDER, G.D., JUENGEL, J.L., SILVA, P.J., ROLLYSON, M.K, MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, 80, p. 1-29, 2000.
- PATE, J.L. Cellular components involved in luteolysis. **Journal of Animal Science**, 72, p. 1884-1890, 1994.
- PIERSON, R. A., GINTHER, O. J. Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**, v. 28, p. 929-936, 1987.
- PIERSON, R. A., ADAMS, G. P. Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. **Theriogenology**, v. 43, p. 105-112, 1995.

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.

SARTORI, R., HAUGHIAN, J., ROSA, G.J.M., SHAVER, R.D., WILTBANK, M.C. Differences between lactating cows and nulliparous heifers in follicular dynamics, luteal growth, and serum steroid concentrations. **Journal of Dairy Science**, v. 83 (Suppl. 1), p. 212 (Abstract), 2000.

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.

SPANNO, A.A., ROSA e SILVA, A.A.M. Níveis plasmáticos de progesterona durante o ciclo estral e na fase inicial da gestação em bovinos da raça holandesa (*Bos taurus taurus*). **ARS Veterinária**, v. 8, p. 428-451, 1986.

SPRECHER, D.J., NEBEL, R.L., WHITMAN, S.S. The predictive value, sensitivity and specificity of palpation per rectum and transrectal ultrasonography for the determination of bovine luteal status. **Theriogenology**, v. 31, n. 6, p. 1165-1172, 1989.

THIBAUT, C., LEVASSEUR, M. C., HUNTER, R. H. F. **Reproduction in mammals and man**. 5th ed. Editora Ellipses, 1993.

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

UFV. SAEG versão 9.0. Universidade Federal de Viçosa, 2005.

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. **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.

VIANA, J. H. M., FERREIRA, A. M., SÁ, W. F., CAMARGO, L. S. A. Características da dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida em vacas da raça Gir. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 251-256, 1999.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SA, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2501-2509, 2000.

WILTBANK, M.C., SHIAO. T.F., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Prostaglandin F_{2α} receptors in the early bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 74-78, 1995.

WILTBANK, M.C., GÜMEN, A., SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21-52, 2002.

CAPÍTULO 3

POTENCIALIDADE DO USO DA ANÁLISE COMPUTACIONAL DA ECOTEXTURA DE CORPOS LÚTEOS BOVINOS COMO FERRAMENTA PARA TRIAGEM E SELEÇÃO DE RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS

RESUMO

A análise computacional para a quantificação da ecotextura de corpos lúteos (CL) tem potencial para indicar o status fisiológico e funcional da glândula luteal. O objetivo deste estudo foi verificar a eficiência do uso da análise computacional de imagens na seleção e triagem de receptoras de embrião, relacionando valores de ecotextura, concentração de progesterona [P₄] plasmática e taxa de gestação. Novilhas e vacas não-lactantes (n=259) tiveram o estro sincronizado com dispositivo intravaginal impregnado com progesterona, eCG, agente luteolítico e benzoato de estradiol. Foram realizados exames de ultra-som no dia da transferência de embriões (TE). A área do CL foi mensurada e foram gravadas (fitas VHS) imagens do CL de cada animal. Após a digitalização, foi feita análise computacional dos atributos das imagens com o auxílio de um software específico. As receptoras selecionadas (182) receberam embriões de boa qualidade (1 e 2) produzidos por métodos convencionais (TE; n=94) ou produzidos *in vitro* (PIV; n=88). Amostras de sangue foram coletadas no momento do exame. As taxas de gestação foram de 56,4% e 30,2% para embriões TE e PIV, respectivamente. Os valores de [P₄] plasmática foram maiores nas receptoras posteriormente diagnosticadas como gestantes que nas não gestantes (5,25±0,56 vs 3,71±0,24 ng/mL, respectivamente; P<0,05). No entanto, nas receptoras PIV, não houve diferenças entre gestantes ou não gestantes (P>0,05). Não houve diferença nas taxas de gestação entre os animais que apresentaram concentrações mais baixas (0,8 a 1,99 ng/mL), medianas (2,0 a 5,99 ng/mL) ou mais elevadas (>6,0 ng/mL) de P₄. Não houve diferença na área do CL e área de tecido luteal entre gestantes e não gestantes, apesar de haver correlação entre estas medidas e a [P₄] plasmática (0,60 e 0,61; respectivamente; P<0,0001). Após a análise computacional dos atributos das imagens, não foram observadas diferenças nos valores médios (71,80±1,29 vs 71,19±1,14; P>0,10) e na heterogeneidade (14,80 vs 14,52; P>0,10) dos pixels, em receptoras gestantes ou não gestantes, que receberam embriões TE ou PIV. Os parâmetros de ecotextura (média dos pixels e heterogeneidade) apresentaram correlações com a [P₄] plasmática (0,17 e 0,18; respectivamente; P<0,01). Com base nestes resultados, não foi possível verificar um padrão objetivo que auxiliasse na seleção e triagem de receptoras de embriões bovinos, possivelmente pela forte influência que outras variáveis (embrião, método, progesterona plasmática, etc.) exercem nos resultados.

Palavras-chave: receptoras, ultra-sonografia, pixel, embriões, progesterona, gestação

ABSTRACT

Computer-assisted quantitative echotexture analysis of ultrasound images has the potential to indicate physiological and functional status of the luteal gland. The aims of this study were to investigate the efficiency of computer-assisted image analysis on embryo recipient selection. The estrus of heifers and non-lactating cows (n=259) were synchronized with an intravaginal progesterone releasing device, eCG, a luteolytic agent and estradiol benzoate. Ultrasound examinations were performed on the day of embryo transfer (ET). Corpus luteum area was measured and CL images of each animal were videotaped (VHS). After digitized, computer-assisted analysis of image attributes was performed using a custom-developed software. Grades 1 and 2 embryos, recovered by superovulatory treatment (MOET; n=94) or produced *in vitro* (IVP; n=88) were transferred to the recipients selected previously (n=182). Blood samples were collected before ultrasound scanning. Pregnancy rates were 56.4 and 30.2% for MOET and IVP embryos, respectively. Plasma progesterone concentrations were greater in recipients lately diagnosed as pregnant than in non pregnant recipients (5.25 ± 5.00 vs 3.71 ± 2.44 ng/mL, respectively; $P < 0.05$). However, in IVP recipients there was no difference among animals lately diagnosed as pregnant or not ($P > 0.05$). Pregnancy rate did not differ among animals showing low (0.8 to 1.99 ng/mL), mid (2.0 to 5.99 ng/mL) or high (> 6.0 ng/mL) plasma progesterone concentration. There was no difference in the CL or tissue area between pregnant and non pregnant animals, even though there was significant correlation between these parameters and plasma P_4 (0.60 and 0.61, respectively; $P < 0.0001$). After the computer analysis of image attributes, differences were not observed in mean pixel value (71.80 ± 11.47 vs 71.19 ± 11.55 ; $P > 0.10$) and pixel heterogeneity (14.80 vs 14.52; $P > 0.10$) between MOET and IVP recipients pregnant or non pregnant. Echotexture parameters (mean pixel value and heterogeneity) showed significant correlations with plasma P_4 (0.17 and 0.18, respectively; $P < 0.01$). Based on the data, it was not possible to find a reliable standard value to select the bovine embryo recipients, probably due to the great influence of the other variables (embryo, method, plasma progesterone, etc.) might exert on the results.

Key-words: recipients, ultrasound, pixel, embryo, progesterone, pregnancy

1. INTRODUÇÃO

Desde meados da década de 80, no século passado, avanços em diagnóstico por imagem vêm revolucionando e aprimorando o uso de biotécnicas em reprodução animal. O uso inicial da ultra-sonografia bidimensional em tempo real (B-mode) e, mais recentemente, de recursos como a análise computacional de imagens ultra-sonográficas, têm permitido o conhecimento e entendimento dos processos básicos da reprodução de fêmeas. Essas novas tecnologias de análise de imagem se mostram promissoras na avaliação da função ovariana e permitem a abertura de novas vias para pesquisas (SINGH et al., 2003).

Em um programa de transferência de embriões (TE), grande parte dos custos está relacionada à aquisição e manutenção do plantel de receptoras. Neste aspecto, o cuidado na seleção dos animais utilizados como receptoras de embrião pode ser decisivo. A obtenção de uma alta taxa de gestação reduz os custos de manutenção do plantel, pela redução no número de dias que cada animal permanece vazio (VIANA, 1996). A seleção e o bom manejo de receptoras são os principais fatores que contribuem para alta taxa de gestação após a TE (STROUD e HASLER, 2006). Diversos estudos têm buscado a melhoria do processo de seleção por meio do aprimoramento dos protocolos de sincronização do estro (NASSER et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2004). No entanto, a seleção de receptoras de embrião engloba vários outros fatores além da sincronização de estros.

A análise computacional para a quantificação da ecotextura de corpos lúteos tem sido extensivamente estudada, e parece ser um indicador do status fisiológico e funcional da glândula luteal (SINGH et al., 1997; TOM et al., 1998; DAVIES et al., 2006). As possíveis aplicações práticas desse tipo de tecnologia são evidentes, como no caso da avaliação da qualidade da função luteal em bovinos utilizando-se o exame de ultra-som em receptoras no dia da transferência de embriões. A concentração de progesterona plasmática até o dia da TE (dia 7) pode ser utilizada para a rejeição de receptoras com função luteal anormal (CHAGAS e SILVA et al., 2002). Se for possível estimar a produção de progesterona por meio da análise de uma imagem ultra-sonográfica do corpo lúteo, a seleção e a triagem de receptoras podem se tornar muito mais eficientes.

Os objetivos deste estudo foram verificar a eficiência do uso da análise computacional de imagens ultra-sonográficas de corpos lúteos na seleção e triagem de receptoras de embrião, assim como correlacionar os valores médios de pixel e de

heterogeneidade com a concentração de progesterona plasmática [P_4] no dia da TE e as taxas de gestação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Período experimental, local de realização e animais

O período de exames ultra-sonográficos de receptoras foi de fevereiro a junho de 2006, e foi realizado na região da Zona da Mata de Minas Gerais e interior do estado do Rio de Janeiro, em cinco fazendas localizadas nos municípios de Bicas, Chácara, Coronel Pacheco (MG), Levy Gasparian e Três Rios (RJ). Duzentos e cinquenta e nove vacas não lactantes e novilhas receptoras de embrião, mestiças *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*, com peso vivo de $407,4 \pm 67,9$ e escore de condição corporal entre 2,5 e 3,5 (escala 0-5, EDMONSON et al., 1989) foram examinadas no dia da transferência de embriões.

Para sincronização do estro das receptoras foi utilizado um dispositivo intravaginal impregnado com progesterona¹⁹ (CIDR®), aplicação intramuscular de 400 UI de gonadotrofina coriônica equina²⁰ (eCG; Novormon®), aplicação i.m. de 0,5 mg de um análogo sintético da PGF_{2α}²¹ (Ciosin®) e aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol²² (Ric-BE®). As aplicações obedeceram ao protocolo esquematizado na Figura 1.

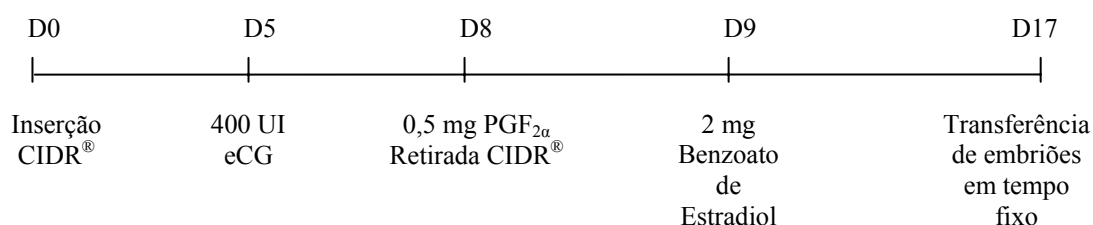


Figura 1. Protocolo hormonal utilizado em receptoras para transferências de embriões em tempo fixo (Adaptado de NASSER et al., 2004).

2.2. Exame ultra-sonográficos e transferência de embriões

Os exames de ultra-som foram realizados no dia da transferência dos embriões (TE), ou seja, no dia 17 (D0 = início do protocolo hormonal), com um máximo de 12 horas antes da TE. Os procedimentos para captura e análise computacional das imagens

¹⁹ 1,9 g de Progesterona, CIDR®, Pfizer Saúde Animal, Brasil.

²⁰ Novormon® 5.000 UI, Syntex S.A., Indústria Bioquímica e Farmacêutica, Buenos Aires, Argentina.

²¹ 0,25 mg/mL Cloprostenol Sódico, Ciosin®, Shering-Plough Coopers, Brasil.

²² 1 mg/mL Benzoato de Estradiol, Ric-BE®, Syntex S.A., Argentina.

ultra-sonográficas foram os mesmos descritos previamente nos capítulos 1 e 2, sendo capturadas e analisadas imagens feitas por exame transretal. Utilizou-se o mesmo aparelho de ultra-som (Aloka SSD 500), a mesma forma de captura (fitas VHS) e de digitalização e arquivamento das imagens (placa de captura de vídeo, arquivos extensão TIFF, 1500x1125 pixels de definição), o mesmo software de análise de imagens (Quantporo[®]) e a área representativa mínima estabelecida no capítulo 1 (0,25 cm²/5.184 pixels).

No momento da avaliação, foram medidas e anotadas as áreas do corpo lúteo de cada receptora e amostras de sangue foram coletadas e processadas (separação do plasma e congelação) para análises da concentração de progesterona plasmática [P₄] por radioimunoensaio em fase sólida, utilizando os procedimentos descritos no capítulo 2.

Após a avaliação ultra-sonográfica, as receptoras consideradas aptas a receber embriões (presença de CL) foram submetidas à TE. A transferência foi precedida de anestesia epidural, pela aplicação de 3 a 5 mL de cloridrato de lidocaína a 2%²³ (Lidovet[®]) no 1º ou 2º espaços das vértebras coccígeas. Com o auxílio de um inovulador de embriões, foram transferidos embriões a fresco, colocados no terço final do corno uterino ipsilateral ao ovário com o corpo lúteo identificado por ultra-som. Este procedimento foi feito por um Médico Veterinário experiente e treinado. Utilizaram-se embriões produzidos após indução de superovulação (transferência de embriões convencional) ou produzidos *in vitro* (PIV).

No caso da TE convencional, a indução da superovulação, coleta, manipulação e transferência dos embriões seguiram os padrões e métodos comumente utilizados a campo. Para a produção *in vitro* dos embriões foram utilizados complexos cumulus-oócito recuperados por aspiração folicular orientada por ultra-som e maturados em meio TCM 199 em estufa de CO₂. A fecundação foi realizada em meio FERT-TALP, utilizando-se sêmen de touros da mesma raça, e os embriões gerados cultivados em meio CR2 até o estágio de mórula ou blastocisto (CAMARGO et al., 2002). Os embriões transferidos estavam em estádios de desenvolvimento esperado para o dia 7 do ciclo estral (mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido) e foram classificados como viáveis, por um técnico treinado, com qualidade códigos 1 e 2 (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998).

O diagnóstico de gestação foi realizado por volta do 30º dia após o estro, e confirmado entre o 55 e o 75º dia, na ocasião da sexagem fetal. Receptoras gestantes no

²³ 20 mg/mL, Cloridrato de Lidocaína, Lidovet[®], Laboratório Bravet Ltda, Brasil.

30º dia, e que apresentaram perda de gestação no segundo exame, foram consideradas como “positivas” na análise dos dados experimentais.

2.3. Análises estatísticas

As variáveis peso corporal, área do corpo lúteo, área de tecido luteal (corrigida para a presença de cavidades no CL), [P₄] plasmática, valores médios de pixel e heterogeneidade dos pixels foram testadas para normalidade (Teste Lilliefors) e homogeneidade das variâncias (Teste Cochran e Bartlett). Estas variáveis tiveram as médias comparadas pelo teste t de Student em função do método (TE vs FIV), diagnóstico de gestação (positivas vs negativas) e ainda do estágio de desenvolvimento embrionário, qualidade dos embriões e categoria (vacas ou novilhas). Para comparação de diferentes concentrações de P₄ plasmática (baixa, média e alta) entre gestantes e não gestantes foi utilizado o teste do Qui-quadrado, a 5% de significância. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software para análises estatísticas SAEG 9.0 (UFV, 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de animais avaliados (259), em 182 (70,27%) foi identificada a presença de pelo menos um corpo lúteo (CL) e realizada a transferência de embriões (TE). Em 58 animais (22,39%) não foi identificado CL e em 19 animais (7,34%) não foi feita a transferência de embriões por diferença entre o número de embriões transferíveis e o de receptoras disponíveis. Estes resultados do protocolo para TE em tempo fixo, considerando o número de receptoras aptas a serem submetidas à TE (201/259; 77,61%) estão dentro das expectativas de eficiência de sincronização. As porcentagens de receptoras selecionadas para TE após protocolos que utilizaram progesterona exógena, benzoato de estradiol e eCG variaram entre 56,65% (NOGUEIRA et al., 2004) e 87,05% (NASSER et al., 2004) em estudos anteriores.

Os valores de $[P_4]$ plasmática, área do CL e área de tecido luteal não apresentaram distribuição normal (teste Lilliefors). Além disso, a $[P_4]$ plasmática não apresentou variâncias homogêneas (teste Cochran e Bartlett). Com base nestes resultados, para comparação de médias foi adotado o teste t de Student, para variâncias não homogêneas, ou homogêneas, dependendo da variável em análise.

Entre as receptoras que apresentavam corpo lúteo no momento da TE, 65 possuíam corpos lúteos cavitários (35,7%) e 117 possuíam CL sem cavidade central (64,3%). Não houve efeito de presença ou não de cavidades na $[P_4]$ plasmática entre animais gestantes ou não, tanto para embriões PIV quanto TE (Tabela 1).

Tabela 1. Média±EPM da $[P_4]$ plasmática no 7º dia do ciclo estral de fêmeas bovinas que possuíam corpo lúteo cavitário ou sem cavidade.

Natureza do CL	TE		TE		PIV		PIV		Geral	
	Gestantes		não gestantes		gestantes		não gestantes		(TE e PIV)	
	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média
Cavitário	18	6,17±1,44a	14	3,68±0,70a	14	4,34±0,96a	19	4,09±0,50a	65	4,63±0,50a
Sem cavidade	35	5,73±0,92a	27	4,13±0,65a	13	3,51±0,54a	42	3,23±0,24a	117	4,22±0,34a

* Médias na mesma coluna, seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste t de Student ($P>0,05$).

As taxas de gestação em cada método (TE ou PIV) não foram diferentes em animais com CL cavitário ou sem cavidade ($P>0,10$). Na TE convencional, a taxa de

gestação foi de 56,2% (18/32) em animais com CL cavitário e 56,4% (35/62) em animais com CL sem cavidade. Após a transferência de embriões PIV, a taxa de gestação foi de 42,4% (14/33) nos animais que apresentaram cavidade no CL e 23,6% (13/55) em animais com CL sem cavidade.

No presente estudo, a porcentagem de corpos lúteos que apresentavam uma cavidade central no momento da TE (35,7%), foi mais baixa que a observada nos experimentos do capítulo 2, porém semelhante à registrada por Viana (1996), que foi de 37,25%. São grandes as variações na porcentagem de corpos lúteos cavitários observadas em estudos anteriores, desde 40% (TOM et al., 1998) até 79% (KASTELIC et al., 1990a). Existem resultados contraditórios em relação à importância da presença de cavidades nos corpos lúteos. Grygar et al. (1997) verificaram valores de concentração de progesterona mais altos em vacas que apresentavam corpo lúteo cavitário que em vacas com corpos lúteos homogêneos (sem cavidade). No entanto, levando em consideração a maioria dos estudos de morfologia luteal, não há indícios de que a presença de cavidades seja importante do ponto de vista funcional (KASTELIC et al., 1990a; SINGH et al., 2003), o que pôde ser comprovado pela similaridade na concentração de progesterona plasmática entre animais com corpos lúteos cavitários ou sem cavidade observada no presente estudo.

A $[P_4]$ plasmática verificada no 7º dia do ciclo estral de receptoras foi maior nos animais que posteriormente foram diagnosticados como gestantes que nos não gestantes ($P < 0,05$). Quando os animais foram separados pelo tipo de embrião que receberam (TE ou PIV), nas receptoras que receberam embrião TE foi observada uma diferença na $[P_4]$ plasmática ($P < 0,05$), contudo em receptoras de embrião PIV não houve diferença na $[P_4]$ plasmática entre os animais gestantes e não gestantes ($P > 0,10$). Os valores de $[P_4]$ plasmática para gestantes e não gestantes, de TE e PIV e os valores totais dos dois métodos estão na tabela 2.

Tabela 2. Média±EPM da concentração de progesterona plasmática no 7º dia do ciclo estral de receptoras de embrião bovino, diagnosticadas posteriormente como gestantes ou não gestantes, e que receberam embriões TE ou PIV.

	TE		PIV		Geral	
	n	Média	n	Média	n	Média
Gestantes	53	5,88±0,77aA	26	3,97±0,57aB	79	5,25±0,56a
Não gestantes	41	3,98±0,48bA	60	3,52±0,23aA	101	3,71±0,24b

* Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si; e médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste t de Student para variáveis não homogêneas (P<0,05).

Não foi verificado efeito de categoria (vaca ou novilha; P>0,05) sobre a [P₄] plasmática, área do corpo lúteo ou taxa de gestação. Também não foi verificado efeito do estágio de desenvolvimento ou da qualidade embrionária (1 e 2) nas taxas de gestações de embriões PIV e TE.

A mensuração da [P₄] plasmática até o dia da TE pode ser usada para a rejeição de receptoras com função luteal anormal (CHAGAS E SILVA et al., 2002). No presente estudo, considerando a média geral de [P₄] plasmática no momento da avaliação ultrassonográfica (D7), foi verificado que as receptoras (TE e PIV) diagnosticadas como gestantes após a transferência dos embriões apresentavam maior [P₄] plasmática no D7 (tabela 2), o que indica que há a necessidade de concentrações plasmáticas adequadas de progesterona nos dias iniciais do ciclo (até o D7) para o estabelecimento da gestação, corroborando informações de estudos anteriores (NISWENDER et al., 1994).

No entanto, concentrações de progesterona plasmáticas adequadas parecem não ter sido o fator limitante ao estabelecimento da gestação entre os animais que receberam embriões PIV, visto que o valor da [P₄] plasmática não diferiu entre gestantes e não gestantes (tabela 2). A qualidade dos embriões produzidos em laboratório, após maturação oocitária, fecundação e cultivo *in vitro*, é afetada pelos procedimentos e meios de cultivo utilizados, levando a taxas de gestação inferiores em relação aos embriões produzidos por TE convencional (GALLI et al., 2003). Quanto mais artificial é o processo, maior é a interferência no desenvolvimento embrionário. Ainda, a avaliação morfológica em estereomicroscópio (aumento de 40 a 80 vezes) feita durante a seleção dos embriões a serem transferidos é subjetiva e parcial, e as diferenças de

qualidade observadas nos dois tipos de embrião (PIV vs TE) estão além de características morfológicas. Fatores metabólicos e outros relacionados à expressão gênica podem diferir entre embriões de origens distintas, causando impacto (positivo ou negativo) nas taxas de gestação (GALLI et al., 2003).

O resultado das variações qualitativas nos embriões leva a taxas de gestação menores na PIV em relação à TE convencional. No presente estudo, mesmo em receptoras que tinham função luteal normal (concentrações de progesterona plasmática adequadas), o estabelecimento da gestação foi dificultado, provavelmente pelas características qualitativas inerentes ao embrião PIV, o que resultou em valores semelhantes de progesterona plasmática entre os animais gestantes e os não gestantes que receberam estes embriões.

Nos animais que receberam embriões produzidos por TE convencional, o papel da função luteal normal (concentração de P₄ plasmática adequada) no estabelecimento da gestação ficou mais evidente, o que pôde ser comprovado pela diferença nos valores de P₄ plasmática em animais gestantes e não gestantes; e ainda pelos valores mais altos nos animais gestantes de TE em relação às gestantes de embriões PIV (Tabela 2).

A taxa de gestação obtida em receptoras de embriões produzidos após superovulação convencional (TE) foi de 56,4% (53/94) e em receptoras de embriões produzidos *in vitro* foi de 30,2% (26/86). Havia a expectativa de menor taxa de gestação em receptoras PIV devido à própria técnica utilizada. As taxas de gestação, após transferência de embriões, obtidas em estudos anteriores foram bastante variadas. Estas variações são atribuídas a diversos fatores relacionados ao embrião ou às receptoras utilizadas. Entre os fatores relacionados às receptoras, se incluem a categoria animal utilizada (novilhas vs vacas em lactação), raças e aptidão (corte vs leiteira) e os tratamentos utilizados na sincronização de estro. Utilizando vacas de corte como receptoras, Looney et al. (2006) obtiveram taxas de gestação para embriões convencionais (TE) variando de 41 a 53%, dependendo do tratamento de sincronização utilizado. No caso de embriões PIV, Nasser et al. (2004) verificaram variações de 36,1 a 63% de taxa de gestação. McMillan (1998) citou taxas de sobrevivência embrionária/fetal até o parto de 43% (31-60%) para TE e 30% (25-39%) para PIV. Os resultados do presente estudo (56,4 e 30,2%; TE e PIV, respectivamente) estão dentro dos valores comumente observados, tanto para transferências de embriões produzidos por métodos convencionais quanto para embriões produzidos *in vitro*.

Uma função luteal anormal, produzindo quantidades inadequadas de progesterona, seja ela baixa (STUBBINGS e WALTON, 1986) ou muito alta

(NOGUEIRA et al., 2004) pode causar resultados insatisfatórios nas taxas de gestação, em programas de transferência de embriões. A fim de verificar as taxas de gestação em receptoras com diferentes [P₄] plasmáticas, os animais foram divididos em quatro faixas ou intervalos de valores de [P₄] plasmática. Não foi observada diferença nas taxas de gestação entre os animais que apresentaram concentrações mais baixas (0,8 a 1,99 ng/mL), medianas (2,0 a 5,99 ng/mL) ou mais elevadas (>6,0 ng/mL) de progesterona (Tabela 3).

Tabela 3. Taxas de gestação (%) em receptoras de embriões bovinos de acordo com a [P₄] plasmática no dia da transferência dos embriões (D7).

Faixa de [P ₄] (ng/mL)	Taxa de gestação		
	TE	PIV	Total
0,8-1,99	7/14 (50)a	6/17 (35,3)a	13/31 (42)a
2,0-3,99	19/39 (48,7)a	10/40 (25)a	29/79 (36,7)a
4,0-5,99	15/24 (62,5)a	7/19 (36,8)a	22/43 (51,1)a
>6,0	12/17 (70,6)a	3/10 (30,0)a	15/27 (55,5)a
Total geral	53/94 (56,4)	26/86 (30,2)	79/180 (43,9)

* Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado (P>0,05).

A relação exata entre a concentração de progesterona sérica e a taxa de gestação não está bem estabelecida (VIANA, 1996), e há resultados contraditórios nos estudos anteriores. Os resultados do presente estudo não permitiram concluir que valores menores que 2 ng/mL ou maiores que 6 ng/mL exercem influência negativa na taxa de gestação de receptoras de embrião (Tabela 3).

Não foi observada diferença entre a área do corpo lúteo (Tabela 4) e a área de tecido luteal (após correção para a presença de cavidades; tabela 5) nas receptoras gestantes ou não gestantes, nos dois métodos (TE e PIV). Estes resultados divergem dos observados anteriormente por Viana (1996), onde a área de secção transversal do CL foi maior nos animais posteriormente constatados como gestantes que naqueles que permaneceram vazios (3,28 vs 2,56 cm²). Os valores absolutos da área do CL e de

tecido luteal, tanto para gestantes como para não gestantes, foram semelhantes aos registrados por Viana (1996).

Tabela 4. Média±EPM da área do corpo lúteo em receptoras de embriões bovinos, gestantes e não gestantes que receberam embriões TE ou PIV.

	TE		PIV		Geral	
	n	Área (cm ²)	n	Área (cm ²)	n	Área (cm ²)
Gestante	53	3,44±0,21aA	27	3,60±0,29aA	80	3,49±0,17a
Não gestante	41	3,17±0,21aA	60	3,24±0,16aA	101	3,21±0,12a
Total geral	94	3,33±0,15a	87	3,33±0,14a	181	3,33±0,10

* Médias seguidas de letras minúsculas iguais, na mesma coluna, não diferem entre si; e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, na mesma linha, não diferem entre si pelo teste t de Student para variáveis homogêneas (P>0,10).

Tabela 5. Média±EPM da área de tecido luteal em receptoras de embriões bovinos, gestantes e não gestantes que receberam embriões TE ou PIV.

	TE		PIV		Geral	
	n	Área (cm ²)	n	Área (cm ²)	n	Área (cm ²)
Gestante	53	3,29±0,20aA	27	3,24±0,23aA	80	3,27±0,15a
Não gestante	41	2,90±0,20aA	60	3,02±0,14aA	101	2,97±0,11a
Total geral	94	3,12±0,14a	87	3,08±0,12a	181	3,10±0,09

* Médias seguidas de letras minúsculas iguais, na mesma coluna, não diferem entre si; e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, na mesma linha, não diferem entre si pelo teste t de Student para variáveis homogêneas (P>0,10).

Usualmente, na seleção de receptoras por exame de ultra-som, a área do corpo lúteo é um critério importante a ser considerado. Há alta correlação entre a área do CL e a [P₄] plasmática, como foi observada no experimento 1 do capítulo 2, quando as avaliações ultra-sonográficas foram realizadas durante todo o ciclo estral natural (r =

0,6965; $P < 0,0001$). Altas correlações entre a área seccional ou o diâmetro do corpo lúteo e a $[P_4]$ plasmática também foram reportadas em estudos anteriores em bovinos ($r = 0,68$; SPRECHER et al., 1989; $r = 0,76$; KASTELIC et al., 1990b; $r = 0,73$; WILTBANK et al., 1995). No entanto, quando a avaliação é pontual, ou seja, feita somente em um dia do ciclo estral, os resultados de correlação entre a área do CL e a $[P_4]$ plasmática são variados e contraditórios. Avaliando a área do CL e a concentração de progesterona plasmática no 7º dia do ciclo estral, em receptoras de embrião, Viana (1996) não verificou correlação entre estas variáveis ($r = 0,1579$). No presente estudo, as correlações entre a área do CL, área de tecido luteal, estas mesmas áreas corrigidas pelo peso corporal, e a $[P_4]$ plasmática foram altas (Tabela 6).

Tabela 6. Correlações de Pearson entre área do corpo lúteo e área de tecido luteal e a $[P_4]$ plasmática no 7º dia do ciclo estral de receptoras de embriões bovinos.

Parâmetro 1	Parâmetro 2	r	Significância
Área do CL	$[P_4]$ plasmática	0,61	0,0001
Área do CL corrigida pelo peso corporal	$[P_4]$ plasmática	0,62	0,0001
Área de tecido luteal	$[P_4]$ plasmática	0,62	0,0001
Área de tecido luteal corrigida pelo peso corporal	$[P_4]$ plasmática	0,63	0,0001

* r = coeficiente de correlação

Mesmo não havendo diferenças entre a área do CL nas receptoras gestantes e não gestantes, os resultados obtidos sugerem que, quando o tamanho do corpo lúteo (mensurado por ultra-som) é levado em consideração durante a seleção de receptoras de embriões, há uma tendência de serem selecionadas receptoras com $[P_4]$ plasmática maiores, devido à alta correlação entre estes dois parâmetros. Receptoras que posteriormente foram diagnosticadas como gestantes apresentavam, no momento do exame ultra-sonográfico, concentrações de P_4 plasmáticas mais elevadas que as não gestantes (Tabela 2), demonstrando que os parâmetros área do CL e $[P_4]$ plasmática no 7º dia do ciclo estral (dia da transferência de embriões) podem ser utilizados na seleção de receptoras, no entanto a obtenção de taxas de gestação elevadas vai depender de outros fatores além destes.

Após a análise computacional das imagens ultra-sonográficas, foram obtidos valores numéricos da intensidade de pixel (escala 0-255) e heterogeneidade destes valores (desvio padrão) dos corpos lúteos de todos os animais. Após a separação de

receptoras diagnosticadas como gestantes ou não, obteve-se o valor médio de pixels e de heterogeneidade de cada categoria (gestantes vs não gestantes; tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Média±EPM dos valores médios de pixels em imagens de corpos lúteos de receptoras de embrião bovino, gestantes e não gestantes que receberam embriões TE ou PIV.

	TE		PIV		Geral	
	n	Valor	n	Valor	n	Valor
Gestante	51	72,42±1,68aA	27	70,60±2,02aA	78	71,80±1,29A
Não gestante	41	71,51±1,70aA	60	70,97±1,55aA	101	71,19±1,14A
Total geral	92	72,02±1,19a	87	70,66±1,24a	179	71,45±0,85

* Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna, e médias seguidas de letras minúsculas iguais, na mesma linha não diferem entre si pelo teste t de Student ($P>0,05$).

Não houve diferenças nos valores médios de pixels entre os animais gestantes e não gestantes, nos dois métodos (TE e PIV). Apesar de terem sido verificadas correlações significativas destes valores de pixel com a $[P_4]$ plasmática, área do CL e área de tecido luteal, as mesmas foram baixas (tabela 9). De maneira semelhante à verificada nos experimentos do capítulo 2, a mensuração da ecogenicidade e interpretação baseada em valores médios da intensidade de brilho dos pixels que compõem uma determinada imagem de CL não é um indicador confiável para estimativa da funcionalidade do corpo lúteo de bovinos. Estudos anteriores concluíram que o valor médio dos pixels de uma imagem ultra-sonográfica é um potencial indicador de função ou disfunção de um determinado tecido ou órgão, acompanhando mudanças fisiológicas e estruturais no tecido/órgão (PIERSON e ADAMS, 1995; SINGH et al., 1997; TOM et al., 1998; DAVIES et al., 2006). Pela metodologia e equipamentos utilizados no presente estudo, após avaliações ultra-sonográficas em três experimentos, o valor médio de pixels se mostrou insuficiente na estimativa de $[P_4]$ plasmática durante o ciclo estral (capítulo 2) e sem validade na seleção de receptoras de embriões.

Quando foi levada em consideração a heterogeneidade dos pixels, não foram observadas diferenças entre animais gestantes ou não, em ambos os métodos (TE e PIV). No entanto, a heterogeneidade dos corpos lúteos das receptoras não gestantes foi maior nas que receberam embriões TE que nas que receberam embriões PIV ($P<0,0001$; tabela 8), levando a um valor de heterogeneidade maior nas receptoras TE em relação às receptoras PIV, gestantes ou não, o que aconteceu provavelmente ao acaso. Foram

observadas ainda correlações positivas entre a heterogeneidade e a área do CL, área de tecido luteal e a [P₄] plasmática (tabela 9). Contudo, de forma similar à observada nos valores médios de pixel, estas correlações foram baixas.

Tabela 8. Média da heterogeneidade dos pixels em imagens de corpos lúteos de receptoras de embrião bovino, gestantes e não gestantes que receberam embriões TE ou PIV.

	TE		PIV		Geral	
	n	Valor	n	Valor	n	Valor
Gestante	51	15,09aA	27	14,27aA	78	14,80A
Não gestante	41	15,90aA	60	13,57bA	101	14,52A
Total geral	92	15,45a	87	13,76b	179	14,62

* Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste t de Student (P>0,10) e médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma linha diferem entre si pelo teste t de Student (P<0,0001).

Tabela 9. Correlações de Pearson entre parâmetros avaliados por análise computacional de imagens e características do corpo lúteo e [P₄] plasmática, em bovinos.

Parâmetro 1	Parâmetro 2	r	Significância (P)
Valores médios de Pixel	[P ₄] plasmática	0,17	0,0092
Valores médios de pixel	Área do CL	0,26	0,0001
Valores médios de pixel	Área de tecido luteal	0,29	0,0001
Heterogeneidade dos pixels	[P ₄] plasmática	0,18	0,0055
Heterogeneidade dos pixels	Área do CL	0,13	0,0390
Heterogeneidade dos pixels	Área de tecido luteal	0,13	0,0333

* r = coeficiente de correlação

Com base nos resultados de análise computacional, expressos pelos valores médios e heterogeneidade dos pixels, não foi possível determinar um padrão desejável, que auxiliasse na seleção e triagem de receptoras de embriões bovinos. A diferença entre a heterogeneidade dos corpos lúteos de receptoras TE vazias em relação às

receptoras PIV, aparentemente não representa nenhum significado e ocorreu por casualidade. Como a [P₄] plasmática foi semelhante entre animais vazios, tanto para embriões TE quanto PIV, não há uma explicação plausível para a variação de heterogeneidade.

Um estudo anterior realizado em ovelhas sugeriu que a heterogeneidade dos valores de pixel em imagens de corpos lúteos é um fraco indicador da habilidade de secreção de progesterona (DAVIES et al., 2006). Os resultados dos experimentos do capítulo 2 divergem deste estudo e mostram correlações negativas entre heterogeneidade e [P₄] plasmática, sugerindo que um corpo lúteo que apresenta uma ecotextura mais homogênea está produzindo uma maior quantidade de P₄.

No caso específico da seleção e triagem de receptoras de embriões, outros fatores além da habilidade esteroidogênica do CL (p.ex. método de produção do embrião) influenciam nos resultados finais (taxa de gestação) da transferência de embriões. O método utilizado na produção dos embriões (TE ou PIV) interferiu na taxa de gestação e influenciou as relações entre taxa de gestação e [P₄] plasmática. Uma pior qualidade embrionária afeta o estabelecimento da gestação não só por características hormonais e uterinas da receptora, mas também por características indesejáveis inerentes ao próprio embrião.

No presente experimento não foi possível estabelecer características de ecotextura luteal desejáveis no momento da transferência dos embriões. Os valores numéricos dos pixels não diferiram entre os animais posteriormente diagnosticados como gestantes ou não, e outras variáveis (embrião, método, progesterona plasmática, etc.) exerceram grande influência nos resultados.

Estudos anteriores mostraram resultados contraditórios em relação às taxas de gestação, quando são avaliados diferentes fatores que, teoricamente, contribuem no estabelecimento da prenhez. Área do corpo lúteo e [P₄] plasmática no dia da TE não demonstram ser indicadores eficientes da possibilidade de gestação ou não, visto que, há resultados contraditórios relacionados a estes fatores (VIANA, 1996; CHAGAS E SILVA et al., 2002; GALLI et al., 2003; LOONEY et al., 2006; STROUD e HASLER, 2006).

Os resultados dos experimentos realizados durante o ciclo estral de novilhas (capítulo 2) indicam a heterogeneidade como um indicador em potencial da produção de progesterona pelo CL. Contudo, ainda são necessários novos estudos de análise computacional de imagens, envolvendo maior número de receptoras para diminuir as interferências de outras variáveis (embrião, [P₄]). Devem ser avaliadas outras

características das imagens, além dos valores médios de pixel. A variação de intensidade de brilho dos pixels dentro da região analisada (heterogeneidade), o padrão de distribuição dos pixels na imagem e outras características gráficas podem ser potenciais indicadores do status fisiológico e endócrino do corpo lúteo, auxiliando na seleção de receptoras. Provavelmente, há intervalos de valores mínimos e máximos dos pixels, fora dos quais não há estabelecimento de gestação.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMARGO, L.S.A., SÁ, W.F., FERREIRA, A.M., VIANA, J.H.M., ARAÚJO, M.C.C. Taurina no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados in vitro. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 4, p. 396-404, 2002.
- 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.
- 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.
- EDMONSON, A.J., LEAN, I.J., WEAVER, C.O., FARVER, T., WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.1, p.68-78, 1989.
- GALLI, C., DUCHI, R., CROTTI, G., TURINI, P., PONDERATO, N., COLLEONI, S., LAGUTINA, I., LAZZARI, Z. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599-616, 2003.
- GRYGAR, I., KUDLÁČ, E., DOLEZEL, R., NEDBÁLKOVÁ, J. Volume of luteal tissue and concentration of serum progesterone in cows bearing homogeneous corpus luteum or corpus luteum with cavity. **Animal Reproduction Science**, v. 49, p. 77-82, 1997.
- 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, no 3, p. 487-498, 1990 (a).

- KASTELIC, J.P., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1269-1278, 1990 (b).
- LOONEY, C.R., NELSON, J.S., SCHNEIDER, H.J. FORREST, D.W. Improving fertility in beef cows recipients. **Theriogenology**, v. 65, p. 201-209, 2006.
- MACMILLAN, W.H. Statistics models predicting embryo survival to term in cattle after embryo transfer. **Theriogenology**, v.50, p. 1053-1070, 1998.
- NASSER, L.F., REIS, E.L., OLIVEIRA, M.A., BO, G.A., BARUSELLI, P.S. Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in Bos indicus x Bos taurus recipients. **Theriogenology**, v. 62, p. 1577–1584, 2004.
- NISWENDER, G.D., JUENGEL, J.L., MCGUIRE, W.J., BELFIORE, C.J., WILTBANK, M.C. Luteal Function: The estrous cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, 50, p. 239-247, 1994.
- NOGUEIRA, M.F.G., MELO, D.S., CARVALHO, L.M., FUCK, E.J., TRINCA, L.A., BARROS, C.M. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2a and eCG? **Theriogenology**, v. 61, p. 1283–1290, 2004.
- PIERSON, R. A., ADAMS, G. P. Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. **Theriogenology**, v. 43, p. 105-112, 1995.
- 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., ADAMS, G. P., PIERSON, R. A. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 371-399, 2003.

SPRECHER, D.J., NEBEL, R.L., WHITMAN, S.S. The predictive value, sensitivity and specificity of palpation per rectum and transrectal ultrasonography for the determination of bovine luteal status. **Theriogenology**, v. 31, n. 6, p. 1165-1172, 1989.

STRINGFELLOW, D.A., SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**, 3^a ed., 1998.

STROUD, B. HASLER, J.F. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. **Theriogenology**, v. 65, p. 65-76, 2006.

STUBBINGS, R.B., WALTON, J.S. Relationship between plasma progesterone concentrations and pregnancy rates in cattle receiving either fresh or frozen embryos. **Theriogenology**, v. 26, p. 145-155, 1986.

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

UFV. SAEG versão 9.0. Universidade Federal de Viçosa, 2005.

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.

WILTBANK, M.C., SHIAO, T.F., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Prostaglandin F_{2α} receptors in the early bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 74-78, 1995.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os objetivos iniciais deste estudo foram estabelecer metodologias para captura e análise computacional de imagens (Capítulo 1) em situações aplicáveis às atividades práticas de um Médico Veterinário especialista em ultra-sonografia dos órgãos genitais de bovinos e validar o uso da técnica (Capítulo 2), principalmente em algumas situações específicas, como na triagem e seleção de receptoras de embriões (Capítulo 3).

Os métodos (via e transdutor) utilizados no exame, os meios de captura e digitalização das imagens, a área mínima selecionada e o software utilizado na quantificação dos pixels, devem ser considerados na interpretação dos resultados da análise computacional.

A falta de correlação significativa entre a progesterona circulante e os valores médios de pixel, pelos métodos utilizados neste estudo, leva à conclusão de que este parâmetro não é um bom indicativo de funcionalidade do CL. No entanto, a correlação significativa observada entre a heterogeneidade dos pixels e a concentração plasmática de progesterona, observada nos dois experimentos do capítulo 2, leva a conclusão de que a heterogeneidade de uma imagem ultra-sonográfica está relacionada ao status funcional e histológico do corpo lúteo. Mudanças na heterogeneidade refletem as alterações teciduais que ocorrem durante o desenvolvimento, a maturidade e a regressão luteal.

A queda da heterogeneidade dos valores de pixel observada em função do tempo, até o início do processo de luteólise, está relacionada à organização da estrutura histológica do corpo lúteo, representando a reorganização gradual do tecido e a multiplicação das células luteais, que estão formando uma estrutura mais homogênea e com densidade crescente. Maior heterogeneidade no metaestro indica uma estrutura em formação, com regiões que apresentam ecotexturas distintas. Ao longo do ciclo, com a organização histomorfológica do CL, a ecogenicidade passa a ser mais constante em todo o órgão, refletindo em menor heterogeneidade da intensidade dos pixels. Do 3º ao 10º dia do ciclo estral, o corpo lúteo passa de um simples coágulo a uma estrutura glandular com células esteróidogênicas especializadas, e, em geral, após o 14º dia inicia-se a luteólise com conseqüente perda de função e desorganização tecidual.

O experimento do capítulo 3 foi realizado com o objetivo verificar a eficiência da análise computacional de imagens ultra-sonográficas de corpos lúteos na seleção e triagem de receptoras de embrião, correlacionando os valores médios de pixel e de heterogeneidade com a concentração plasmática de progesterona no dia da TE e as taxas

de gestação. Contudo, não foram observadas diferenças nestes valores entre as receptoras nas quais foi estabelecida a gestação ou não. Diversas variáveis (embrião, [P₄] plasmática) estão envolvidas no estabelecimento e manutenção da gestação, além da função luteal. Desta forma, a seleção de receptoras somente por características inerentes ao corpo lúteo não garante altas taxas de gestação.

Devido às inconsistências dos resultados encontrados nos estudos anteriores e no presente estudo, ainda são necessários outros tipos de avaliação da análise computacional de imagens. Devem ser avaliadas outras características das imagens, além dos valores médios de pixel. A variação de intensidade de brilho dos pixels dentro da região analisada (heterogeneidade), o padrão de distribuição dos pixels na imagem e outras características gráficas mais sensíveis podem ser potenciais indicadores do status fisiológico e endócrino do corpo lúteo, auxiliando na seleção de receptoras. Também, provavelmente, há intervalos de valores mínimos e máximos dos pixels, fora dos quais não há estabelecimento de gestação.

As aplicações da técnica de análise computacional de imagens são extensas e evidentes. Existe um grande potencial no uso de análises computacionais para avaliações de características reprodutivas, contudo falta ainda um melhor ajustamento e determinação das características que devem ser consideradas desejáveis nas diferentes estruturas ovarianas (folículos ou corpos lúteos).

APÊNDICES

- Fórmula utilizada na conversão da rotação da centrífuga laboratorial para força *g*:

$$\text{RCF} = 0,00001118 * R * N^2, \text{ onde}$$

RCF = força centrífuga relativa;

R = raio da circunferência descrita pela partícula;

N = rotações por minuto (rpm).

Valores utilizados na conversão:

R = 20 cm

N = 2000

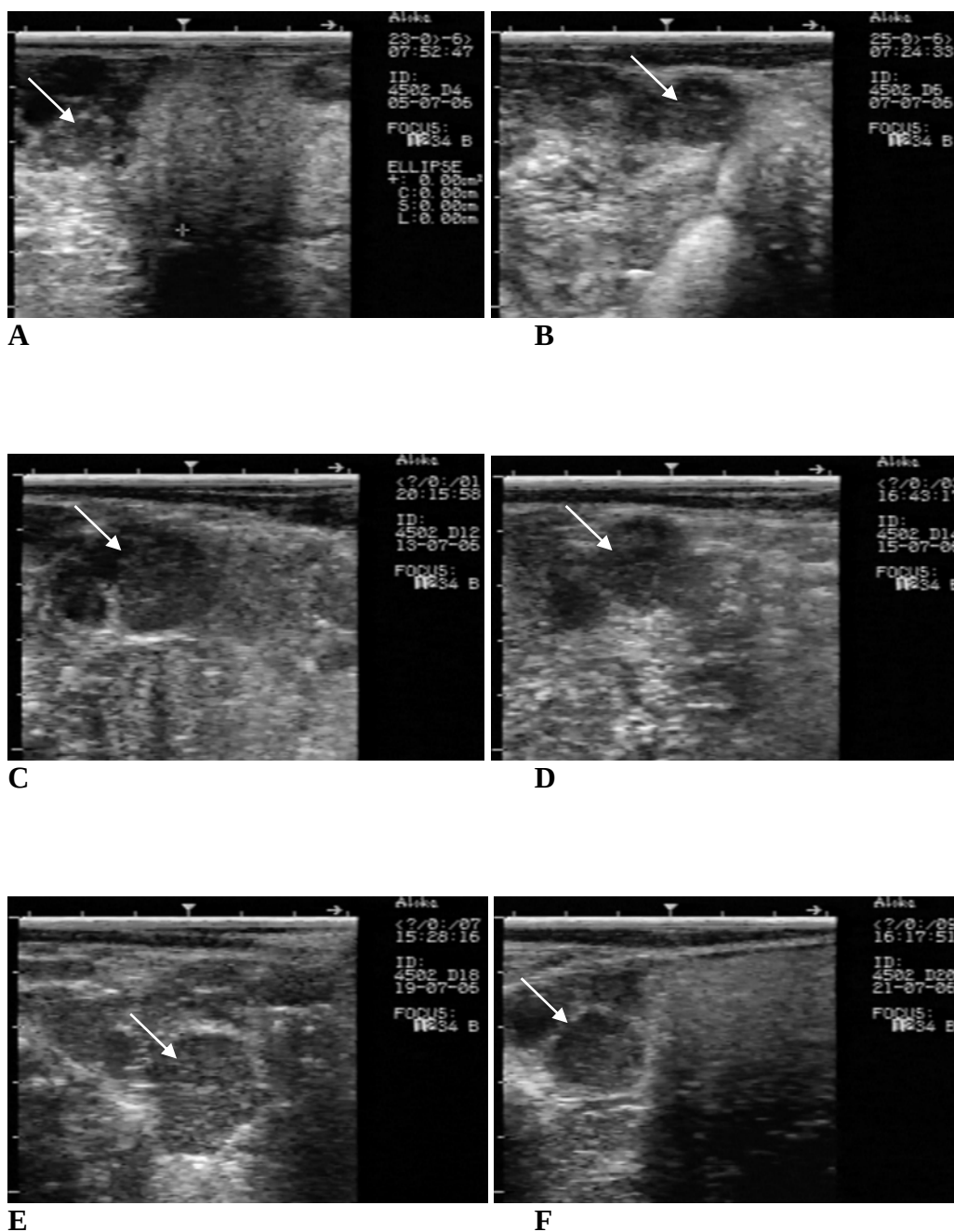
Cálculos:

$$\text{RCF} = 0,00001118 * 20 * 2000^2$$

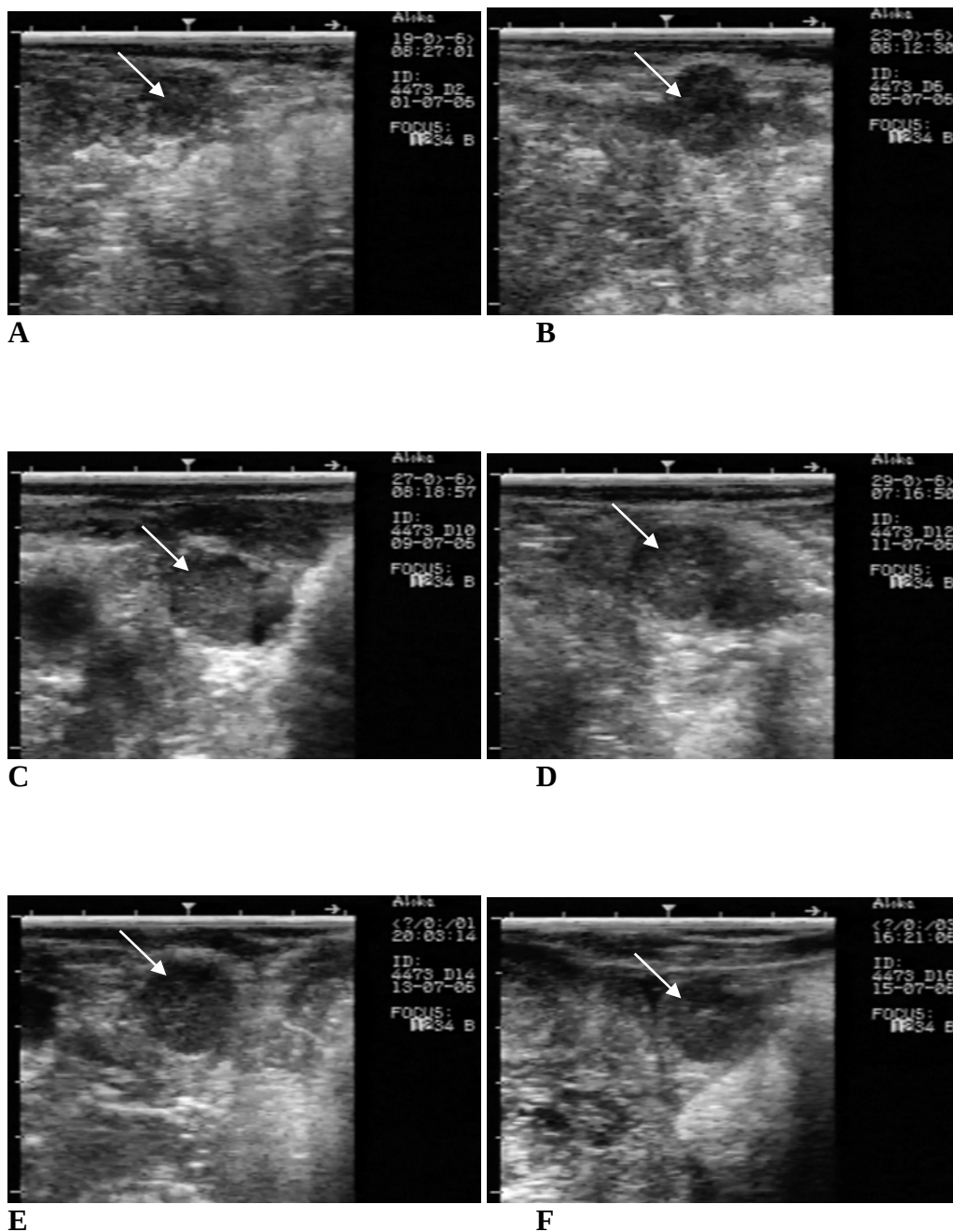
$$\text{RCF} = 0,0002236 * 4000000$$

$$\text{RCF} = 894,4 \text{ G}$$

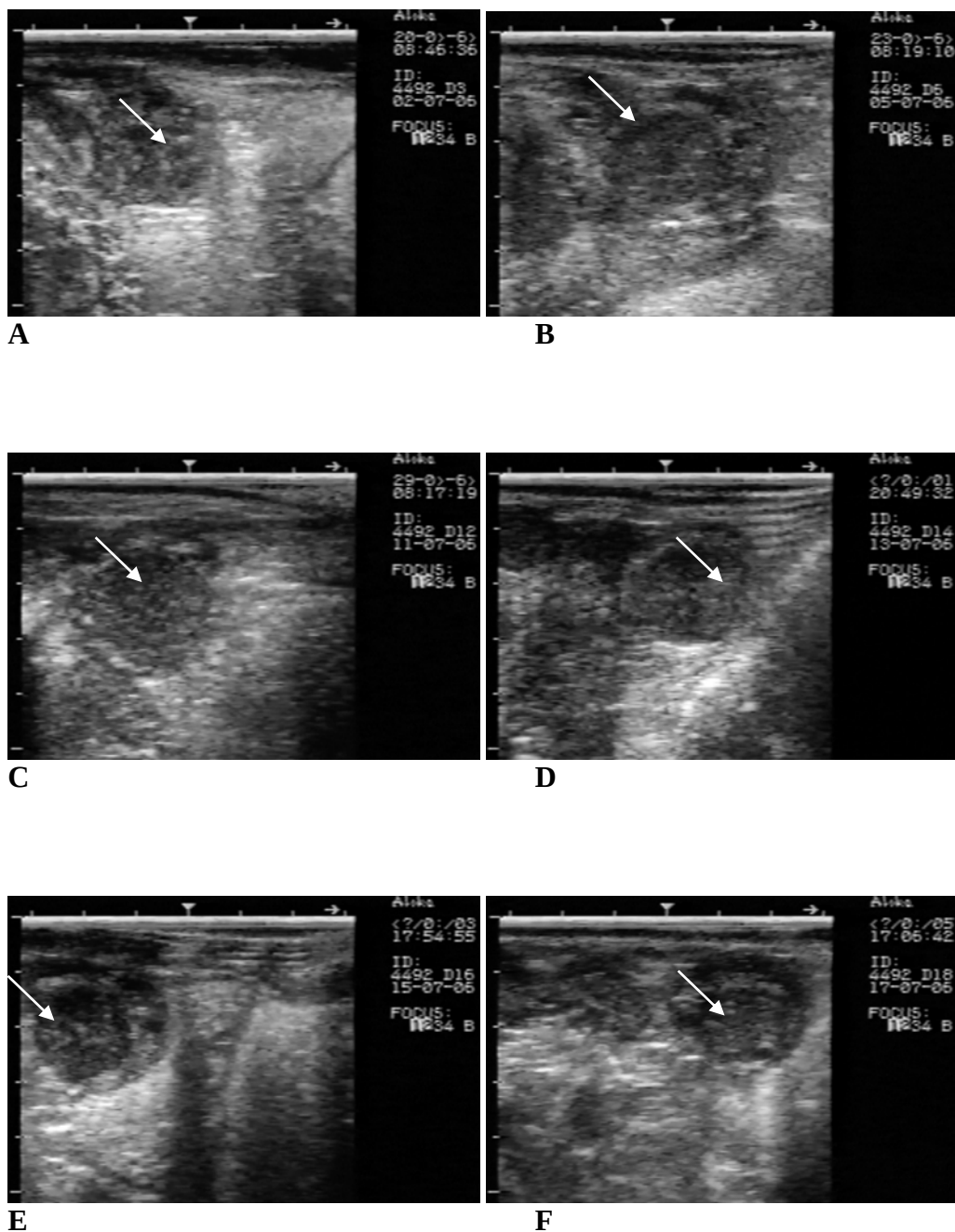
- Pranchas de imagens ultra-sonográficas de corpos lúteos bovinos em diferentes fases do ciclo estral. As imagens são de três animais distintos que tiveram diferentes durações do ciclo estral.



Prancha 1. Amostra de imagens de corpos lúteos bovinos obtidas em um animal experimental com ciclo estral que teve duração de 22 dias (D0 = estro). Imagens ilustram diferentes fases do ciclo estral: metaestro (D4 e D6; A e B, respectivamente), diestro (D12 e D14; C e D, respectivamente) e proestro (D18 e D20; E e F, respectivamente). As setas apontam para o CL.



Prancha 2. Amostra de imagens de corpos lúteos bovinos obtidas em um animal experimental com ciclo estral que teve duração de 17 dias (D0 = estro). Imagens ilustram diferentes fases do ciclo estral: metaestro (D2 e D6; A e B, respectivamente), diestro (D10 e D12; C e D, respectivamente) e proestro (D14 e D16; E e F, respectivamente). As setas apontam para o CL.



Prancha 3. Amostra de imagens de corpos lúteos bovinos obtidas em um animal experimental com ciclo estral que teve duração de 19 dias (D0 = estro). Imagens ilustram diferentes fases do ciclo estral: metaestro (D3 e D6; A e B, respectivamente), diestro (D12 e D14; C e D, respectivamente) e proestro (D16 e D18; E e F, respectivamente). As setas apontam para o CL.