

**TAMANHO DA AMOSTRA PARA ESTUDO DA PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA DOS  
CONSTITUINTES DO CORPO LÚTEO BOVINO**  
**(Soybean oil replaced by acidulated soapstock in broiler diets)**

**NEVES, M.M.; MARQUES JR., A.P.**

Escola de Veterinária – UFMG, e-mail: ampinho@dedalus.lcc.ufmg.br.

**RESUMO** – O objetivo deste estudo foi estabelecer o número de campos histológicos necessários para quantificar os componentes celulares do corpo lúteo bovino. Para os parâmetros citoplasma das células luteínicas, núcleo das células luteínicas e fibroblasto são necessários 30 campos, enquanto que para células endoteliais e pericito são necessários 35, podendo-se padronizar a técnica em 35 campos e 875 pontos por corpo lúteo.

**Palavras chave:** Bovino, corpo lúteo, proporção volumétrica.

**ABSTRACT** – The purpose of this study was to determine the number of fields necessary for the quantification of the cell types of the bovine corpus luteum. A total of 30 fields is necessary for the quantification of the luteal cell cytoplasm, luteal cell nuclei and fibroblast, and 35 fields for the quantification of endothelial cells and pericycles. For the analysis of both parameters is recommended the study of 35 fields and 875 points per corpus luteum.

**Key words:** Bovine, corpus luteum, volumetric proportions.

### **Introdução**

O corpo lúteo, uma glândula endócrina efêmera, é essencial para a manutenção da gestação em bovinos (NISWENDER *et al.*, 1994). A progesterona, seu principal produto de secreção, exerce efeitos biológicos importantes em tecidos-alvo como o hipotálamo, a hipófise, o sistema reprodutor feminino e a glândula mamária, controlando a duração do ciclo estral e propiciando condições uterinas satisfatórias para o desenvolvimento do conceito (SMITH *et al.*, 1994; WILTBANK, 1998).

O corpo lúteo é constituído por células heterogêneas com características bioquímicas e morfológicas distintas, classificados como células esteroideogênicas e não-esteroideogênicas (PARRY *et al.*, 1980; FARIN *et al.*, 1986).

No parênquima luteal bovino foram identificadas duas populações distintas de células esteroideogênicas (WEBER *et al.*, 1987; O'SHEA *et al.*, 1989) denominadas células luteínicas menores e luteínicas maiores, com base na razão citoplasma:núcleo e quantidade de organelas citoplasmáticas (PARRY *et al.*, 1980; SMITH *et al.*, 1994).

Além das células parenquimais, o corpo lúteo possui células que compõem o tecido conjuntivo, como fibroblastos, e tecido vascular, no qual incluem-se células endoteliais e pericito de vasos sanguíneos e linfáticos. Também no corpo lúteo podem ser encontradas células de defesa como macrófagos, linfócitos e eosinófilos (GAYTÁN *et al.*, 1997).

A quantificação dos constituintes celulares do corpo lúteo bovino é de difícil análise, devido sua alta variabilidade individual. É necessário uma avaliação múltipla de resposta, estabelecendo-se a média das repetições obtida no indivíduo. Para isso, técnicas experimentais devem ser utilizadas visando otimizar o número de campos histológicos a serem lidos, que caracterizem bem o indivíduo e tornem mais eficiente a análise dos resultados.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer o número de campos necessários para quantificar os tipos celulares do corpo lúteo bovino.

### **Material e Métodos**

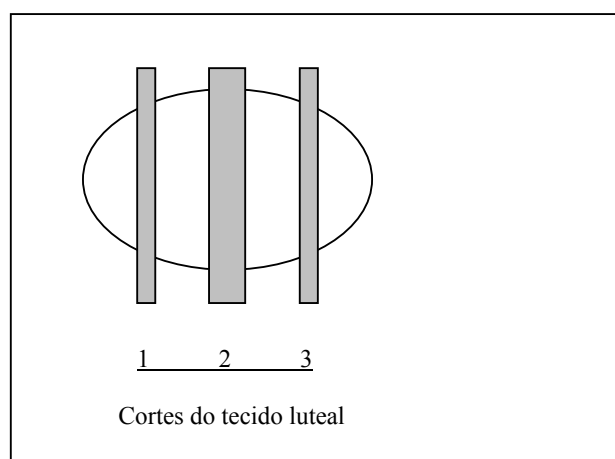
Utilizou-se ovário com corpo lúteo de vaca zebu coletado em frigorífico da

Região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, para determinação do número de campos histológicos no estudo da proporção volumétrica do corpo lúteo.

O corpo lúteo foi reduzido a cortes finos, obtendo-se 3 cortes representativos do órgão (GRÁFICO 1). Os cortes foram fixados em solução

saturada de Bouin, desidratados em passagens sucessivas de soluções de álcool em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e absoluto), diafanizados em xilol e incluídos em parafina, cortados a 5 $\mu$ m de espessura e corados pela hematoxilina-eosina.

GRÁFICO 1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS CORTES DE CORPO LÚTEO BOVINO UTILIZADOS NA PROPORÇÃO VOLUMÉTRICA, 2002.

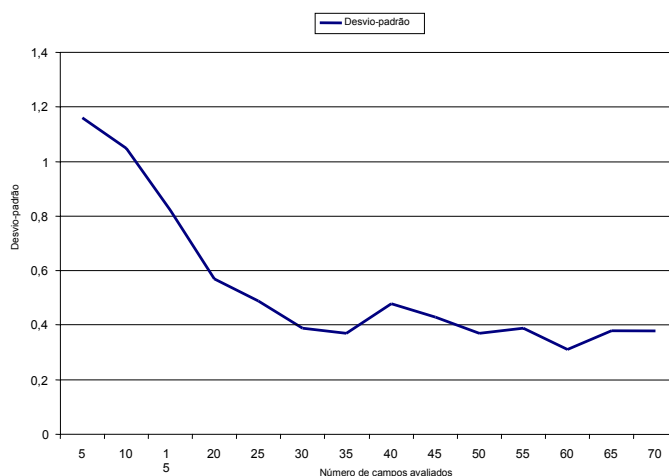


Fonte: *Neves & Marques Jr., 2002*

A proporção volumétrica do corpo lúteo foi obtida pelo método estereométrico, utilizando-se Ocular Integradora Zeiss KPL10X, com retículo de cinco linhas horizontais e 25 pontos equidistantes,

acoplada à uma objetiva de 40X. Foram examinados 3 lâminas e 80 campos por lâmina, escolhidos ao acaso em varredura horizontal, resultando em 240 campos e 6000 pontos avaliados.

GRÁFICO 2 – DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA PARA CONTAGEM DO PARÂMETRO CITOPLAMA DAS CÉLULAS LUTEÍNICAS DO CORPO LÚTEO BOVINO, 2002.



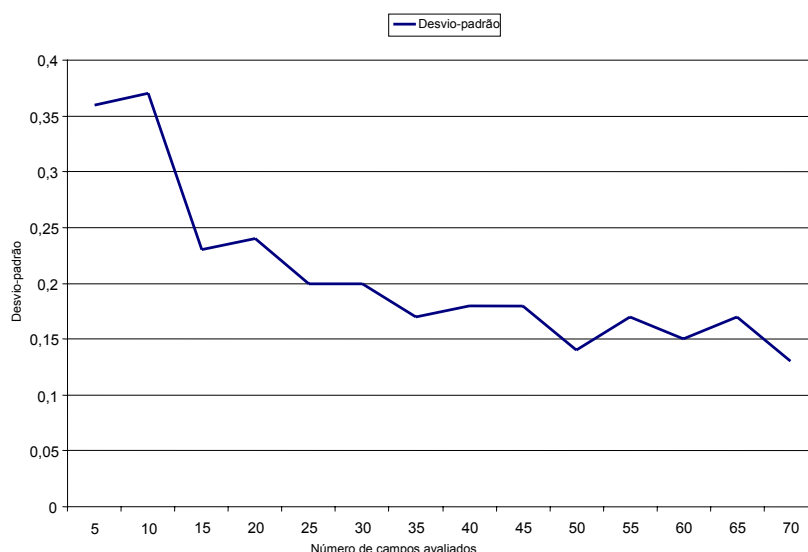
Dos valores obtidos pela contagem, foram calculadas 10 médias para cada número de campos amostrados ao acaso ( $n = 5, 10, 15, 20, \dots, 70$ ) e para cada conjunto de médias por campos amostrados foram calculadas as médias e os desvios-padrões.

Os componentes teciduais analisados foram citoplasma das células luteínicas, núcleo das células luteínicas, fibroblasto e células endoteliais e pericito.

## Resultados e Discussão

A instabilidade dos campos contados para o parâmetro citoplasma das células luteínicas diminui a partir dos 30 campos, como mostra o GRÁFICO 2. A partir deste número, os resultados não se alteraram, dispensando o estudo de um  $n$  maior que 30 campos. Em relação ao núcleo das células luteínicas, o número de campos necessários para se obter uma resposta satisfatória foi de 30 campos (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3 – DETERMINAÇÃO DO TAMANHO AMOSTRAL PARA CONTAGEM DO NÚCLEO DAS CÉLULAS LUTEÍNICAS DO CORPO LÚTEO BOVINO, 2002.



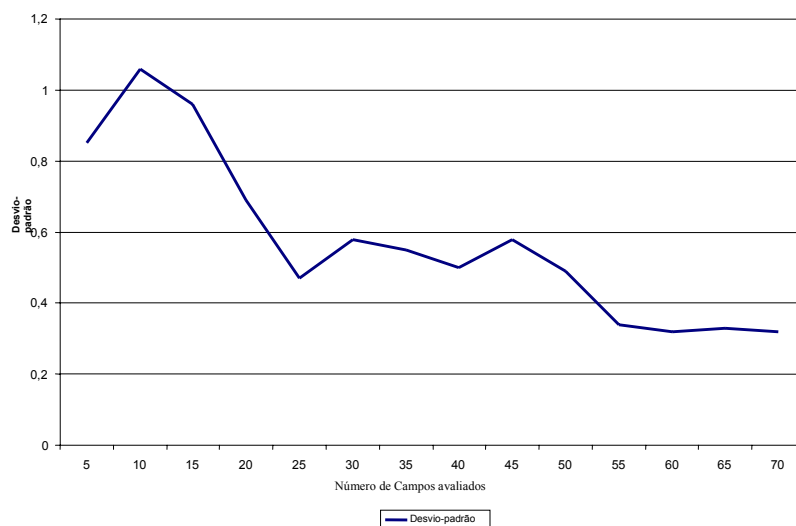
Fibroblasto é o constituinte celular predominante nas avaliações histológicas, apresentando altas médias quando comparado aos outros constituintes histológicos. O número de campos estabelecido para este parâmetro foi de 30 campos (GRÁFICO 4). Células endoteliais e pericito foi o único para o qual necessitou-se de 35 campos histológicos para obtenção do melhor resultado (GRÁFICO 5).

Pontos retratando variação reduzida antes da manifestação da estabilização final, como mostra no Gráfico 3 ( $n=10$ ), podem eventualmente acontecer devido

ao grande número de valores repetidos entre os 6000 pontos, quando o  $n$  for reduzido.

As médias dos tamanhos amostrais não devem sofrer alteração, considerando-se que os campos provêm da mesma população. Os desvios-padrões, entretanto, passam a diminuir à medida que o número de campos aumenta, alcançando a estabilidade gráfica em valores distintos de  $n$ . Quando a estabilidade é alcançada, não há necessidade de acréscimo no tamanho amostral para caracterizar a resposta individual (SAMPAIO, 1998).

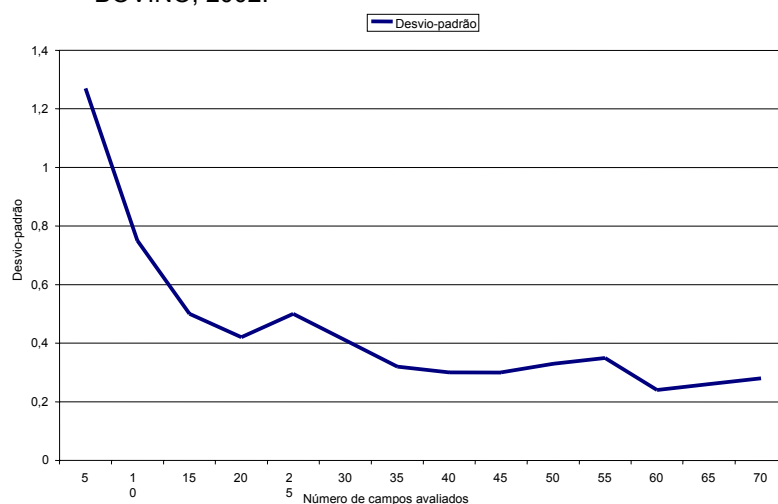
GRÁFICO 4 – DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA PARA CONTAGEM DO PARÂMETRO FIBROBLASTO DO CORPO LÚTEO BOVINO, 2002.



DHARMARAJAN *et al.* (1988), analisando corpos lúteos de coelhas pseudogestantes, verificaram os constituintes luteais avaliando 670 pontos por corpo lúteo. Outras análises morfométricas podem ser empregadas na quantificação dos constituintes do corpo

lúteo (FARIN *et al.*, 1986; SCHWALL *et al.*, 1986; FARIN *et al.*, 1988), porém o uso da Ocular Integradora é o método mais indicado para a microscopia de luz, com cortes do tecido luteal na espessura de 5 $\mu$ m.

GRÁFICO 5 – DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA PARA CONTAGEM DO PARÂMETRO CÉLULAS ENDOTELIAIS E PERICITO DO CORPO LÚTEO BOVINO, 2002.



### Conclusão

No estudo da proporção volumétrica do corpo lúteo bovino são necessários 30 campos histológicos para quantificar

citoplasma das células luteínicas, núcleo das células luteínicas e fibroblasto e 35 campos para células endoteliais e pericito, recomendando-se padronizar a técnica em 35 campos e 875 pontos.

### Referências

- DHARMARAJAN, A.M.; MASTROYANNIS, C.; YOSHIMURA, Y.; ATLAS, S.J.; WALLACH, E.E.; ZIRKIN, B.R. Quantitative light microscopic analysis of corpus luteum growth during pseudopregnancy in the rabbit. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 38, n. 4, p. 863-870, 1988.
- FARIN, C.E.; MOELLER, C.L.; SAWYER, H.R.; GAMBONI, F.; NISWENDER, G.D. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 35, n. 5, p. 1299-1308, 1986.
- FARIN, C.E.; MOELLER, C.L.; MAYAN, H.; GAMBONI, F.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. Effect of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on cell populations in the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 38, n. 3, p. 413-421, 1988.
- GAYTÁN, F.; BELLIDO, C.; MORALES, C.; AGUILAR, E.; SÁNCHEZ-CRIADO, J.E. Evidence for steroidogenic luteal cell hypertrophy and hyperplasia during pregnancy in the rat. **Journal of Endocrinology**, Bristol, UK, v. 154, n. 2, p. 211-217, 1997.
- 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**, Madison, v. 50, n. 2, p. 239-247, 1994.
- O'SHEA, J.D.; RODGERS, R.J.; D'OCCHIO, M.J. Cellular composition of the cyclic luteum of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 85, n. 2, p. 483-487, 1989.
- PARRY, D.M.; WILLCOX, D.L.; THORBURN, G.D. Ultrastructural and cytochemical study of the bovine corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 60, n. 2, p. 349-357, 1980.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SCHWALL, R.H.; GAMBONI, F.; MAYAN, M.H.; NISWENDER, G.D. Changes in the distribution of sizes of ovine luteal cells during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 34, n. 5, p. 911-918, 1986.
- SMITH, M.F.; McINTUSH, E.W.; SMITH, G.W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **Journal Animal Science**, Sofia, v. 72, n. 7, p. 1857-1872, 1994.
- WEBER, D.M.; FIELDS, P.A.; ROMRELL, L.J.; TUMWASORN, S.; BALL, B.A.; DROST, M.; FIELDS, M.J. Functional differences between small and large luteal cells of the late-pregnant vs. nonpregnant cow. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 37, n. 3, p. 685-697, 1987.
- WILTBANK, M.C. Regulation of the ovary in cattle. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2. 1998, Passos. **Anais...** Passos: CONAPEC JR. & CBRA, 1998, p. 1-13.

Recebido para publicar: 09/08/2002

Aprovado: 10/10/2002