

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – *CAMPUS* ARAPIRACA
UNIDADE EDUCACIONAL DE VIÇOSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO E TECNOLOGIA INTEGRADAS
A MEDICINA VETERINÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO REGIONAL

CELSO WESTPHALEN NETO

**AVALIAÇÃO DO PLASMA SANGUÍNEO DE ÉGUAS EM DIFERENTES FASES
REPRODUTIVAS PELA TÉCNICA DE BIOSPECKLE**

VIÇOSA

2019

CELSO WESTPHALEN NETO

**AVALIAÇÃO DO PLASMA SANGUÍNEO DE ÉGUAS EM DIFERENTES FASES
REPRODUTIVAS PELA TÉCNICA DE BIOSPECKLE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação e Tecnologia Integradas para Desenvolvimento Regional da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

VIÇOSA

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Polo Viçosa
Bibliotecária Responsável: Edvânia C. S. Gonçalves

W537d Westphalen Neto, Celso

avaliação do plasma sanguíneo de éguas em diferentes fases reprodutivas pela técnica de biospeckle /Celso Westphalen Neto – 2019.

43 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, Polo Viçosa, 2019

Orientação: Prof. Dr. Tobyas Maia De Albuquerque Mariz

Inclui bibliografia

1. Equinos 2. Hematologia I. Título

CDU:636.1

Folha de Aprovação

AUTOR: CELSO WESTPHALEN NETO

Avaliação do plasma sanguíneo de éguas em diferentes fases reprodutivas pela técnica de biospeckle/ Dissertação de Mestrado em Inovação e Tecnologia Integradas à Medicina Veterinária para o Desenvolvimento Regional, Universidade Federal de Alagoas, na forma normalizada e de uso obrigatório.

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Inovação e Tecnologia Integradas à Medicina Veterinária para o Desenvolvimento Regional, Unidade Educacional Viçosa, Universidade Federal de Alagoas e aprovada no dia 31 de Julho de 2019.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Tobyas Maia de Albuquerque Mariz (Orientador)

Prof. Dr. Pierre Barnabé Escodro (Avaliador Interno)

Prof. Dr. Emerson de Lima (Avaliador Externo)

AGRADECIMENTOS

Inicio esta seção agradecendo em primeiro lugar a Deus, por sempre me guiar pelo melhor caminho, me dando sabedoria, paciência e muita força para encarar novos desafios. A Ele o meu muito Obrigado!

Agradeço à minha família, meu pai Fernando Câmara, minha mãe Helena Westphalen, minha irmã Heloisa Westphalen e minha namorada Maria Eugênia que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e oferecendo todo o suporte necessário para que eu pudesse concluir com êxito todos os desafios encarados para minha formação!

Aos professores, Tobyas Mariz, Emerson de Lima, Pierre Barnabé e a todos colaboradores e amigos que conheci e me ajudaram de alguma forma durante essa jornada, os meus sinceros agradecimentos!

Não posso deixar de citar e agradecer todo o apoio que a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) nos deu para que pudéssemos realizar todo o experimento inovador proposto.

Por ultimo e não menos importante, deixo registrado aqui o meu agradecimento a Universidade Federal de Alagoas pela disponibilidade de suas instalações, em especial o Laboratório de Biospeckle, que foram fundamentais para realização e conclusão da pesquisa realizada.

Mais uma vez **OBRIGADO A TODOS!**

RESUMO

Objetivou-se como esse estudo, avaliar a aplicabilidade da técnica de biospeckle Laser como ferramenta para análise da atividade biológica do plasma sanguíneo de éguas em diferentes estágios reprodutivos. Foram utilizadas amostras de 40 éguas da raça Mangalarga Marchador pertencentes ao Haras Formoso 2S localizado na cidade de Cajueiro – AL. As éguas foram divididas em 4 grupos de 10 animais cada, classificados de acordo com a fase de gestação, sendo 10 éguas vazias (não prenhes), 10 éguas prenhas no terço inicial de gestação entre 1 e 4 meses, 10 éguas em terço final de gestação entre 7 e 11 meses e 10 éguas em fase de lactação (até o segundo mês pós-parto). A obtenção dos padrões de biospeckle foi feita através da captura de imagens refletidas pelo laser através de uma câmera CCD (*charge coupled device*) em amostras de soro sanguíneo de éguas em diferentes estágios reprodutivos. Esses padrões foram analisados através de técnicas de processamento de imagens pelo aplicativo computacional STMD, empregando-se o método de THSP (*time history speckle pattern*), que avalia a evolução temporal da figura de interferência gerada na superfície da amostra ao longo do tempo. A partir do THSP foi gerada uma matriz de co-ocorrência, matriz essa usada para apresentar o MDI (módulo de dispersão de intensidades), que forneceu os dados da bioatividade das amostras. Os dados obtidos foram processados no programa OriginPro 8.Ink, para geração de gráficos e comparação dos resultados entre os grupos estudados. Observou-se que, independente do estágio reprodutivo das éguas considerado nesse estudo, existe uma assinatura geral de atividade captada pelo biospeckle. Ocorreu um pico curto de movimentação das amostras, associado a acomodação da gota na lâmina, seguido de uma curva ascendente iniciada entre o minuto 5 e 10 de avaliação, que alcança seu pico em uma faixa de tempo que fica entre o minuto 15 e 25, e decai de maneira uniforme até praticamente se anular quando passados 45 minutos de análise. O grupo de éguas em terço final de gestação apresentaram uma bioatividade das amostras superior, quando comparadas as éguas que estão em terço inicial. A curva observada no grupo de éguas em lactação se assemelha um pouco a curva do grupo de terço inicial. As variabilidades em elementos dispersivos nas diferentes fases avaliadas aparentemente influenciam no padrão de biospeckle detectado em cada uma delas. Conclui-se que as amostras provenientes de estágios reprodutivos com menor variação/concentração de substâncias bioativas apresentaram um maior espalhamento, o que gera uma maior mobilidade e dispersão no plasma captada na análise por speckle dinâmico.

Palavras-chave: Biospeckle. Equino. Sangue.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the applicability of the biospeckle laser techniques as a tool to analyze the biological activity in blood plasma samples from mares in different reproductive stages. For this purpose, samples were collected from 40 pregnant Mangalarga Machador mares from the Formoso 2S horse farm in Cajueiro – AL. The mares were classified into 4 groups of 10 animals each according to the pregnancy stage: 10 empty mares (not pregnant), 10 pregnant mares in the early third of pregnancy between 1 and 4 months, 10 pregnant mares in the final third of the pregnancy between 7 and 11 months, and 10 lactating mares (within the two months post-partum). The biospeckle patterns were obtained using a CCD camera to capture images of the reflection of a laser shone into blood serum samples from mares in different reproductive stages. These patterns were analysed using image processing techniques through the computational application STMD, applying THSP (time history speckle pattern) methodology which evaluates the temporal evolution of the interference image generated on the surface of the sample over time. A coherence matrix generated from the THSP was used to present the intensity dispersion module which provided the bioactivity data. This data was then processed using the program OriginPro 8.Ink, generating graphs and comparing the results from the different groups under study. A general biospeckle signature was observed regardless of the mares' reproductive stage considered in this study. A short peak of movement of the samples associated to the placement of the drop on the slide was observed. It was followed by an ascending curve starting between 5 and 10 minutes of observation and reaching a peak within 15 and 25 minutes and finally decayed uniformly until almost zero after 45 minutes. The group of pregnant mares in the final third of pregnancy presented superior bioactivity when compared to pregnant mares in the early third of pregnancy. The curve observed for the group of lactating mares is similar to the curve obtained for the group of pregnant mares in the early third of pregnancy. Bioactive molecules act as dispersion elements of coherent light incident on a sample. The variability in dispersive elements in the different reproductive stages influenced the biospeckle pattern detected for each stage. It was concluded that samples from reproductive stages with lower variation/concentration of bioactive substance presented larger scattering, which generates more mobility and dispersion in the blood plasma detected in the dynamic speckle analysis.

Key words: Biospeckle. Equine. Blood

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1 PRINCÍPIOS ÓPTICOS	10
2.2 INTERFEROMETRIA DE SPECKLE	13
2.3 SPECKLE	14
2.4 SPECKLE ESTÁTICO	15
2.5 SPECKLE DINÂMICO	15
2.6 BIOSPECKLE	16
3. MÉTODO DE AVALIAÇÃO DO SPECKLE	16
4. COMPONENTES PLASMÁTICOS E AVALIAÇÃO.....	20
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas uma técnica que vem ganhando destaque como alternativa de análise de atividade biológicas de amostras é a técnica de biospeckle laser. Tal motivo reside no fato de esta fornecer um ensaio rápido e confiável, permitindo ao usuário uma gama de possibilidades no que se refere ao estudo de sistemas biológicos que vão desde caracterização de bioatividades de sementes até sangue de animais (BRIERS, 1993; OULAMARA, 1989).

O princípio do Biospeckle está fundamentado no fenômeno físico de interferência de luz (CHANG, 2005), que ocorre quando duas ou mais ondas se superpõem gerando um padrão que pode ser classificado como destrutivo ou construtivo. No caso da análise de amostras de diferentes fluídos corporais, esse padrão de superposição observado é devido a interação da onda eletromagnética (luz laser) com a superfície da amostra. Nesse caso, quando se incide a luz laser na amostra avaliada, surge em sua superfície um padrão de interferência que recebe o nome de speckle (BRIERS, 1974).

O padrão de speckle é uma figura de interferência gerada pelo espalhamento da luz após interagir com um meio físico, e quando captado por câmera adequada, mostra-se como um conjunto de grãos claros e escuros, num fenômeno óptico que somente ocorre com a incidência de luz coerente em meio físico. Como esta medida é fortemente influenciada pelos parâmetros do material analisado, o speckle pode ser classificado em estático ou dinâmico. O speckle estático surge quando a amostra analisada não apresenta movimentação, padrão observado em materiais não biológicos e inertes como o vidro, concreto e os metais. Já o speckle dinâmico ocorre quando a amostra apresenta movimentação, como observa-se em tecidos biológicos diversos de vegetais e animais, bem como fluídos corporais tais como sangue, saliva e outros.

Uma nova nomenclatura surge para o speckle dinâmico quando se trabalha com materiais a análise desses materiais biológicos, passando este a ser chamado de biospeckle (BRIERS, 1974). O padrão de biospeckle é formado através de múltiplas reflexões difusas da luz laser incidida sobre a amostra, ao sofrer uma interferência com o elemento analisado que acarretará seu espalhamento. Sabe-se que a amostra está em atividade ao longo do tempo e seus constituintes biológicos são responsáveis pelo espalhamento da luz laser, formando um padrão de interferência que gerará como resultado uma espécie de fervilhamento ou granulado óptico. Na literatura uma das primeiras citações encontradas sobre biospeckle foi relatada por Abramson, pouco tempo após o surgimento do laser (BRIERS, 1974).

Em relação à aplicação da técnica apresentada, fica claro que todo e qualquer elemento capaz de alterar o padrão de resposta à aplicação do laser em uma amostra biológica, é passível de ser considerado como um fator de indução da resposta encontrada. Portanto, variações metabólicas e hormonais referentes ao estágio reprodutivo de éguas podem provocar uma alteração sérica. Para a avaliação do estágio reprodutivo em éguas, um dos métodos menos invasivos e conclusivos por avaliação de amostras sanguíneas é o da dosagem hormonal, mensurando-se a quantidade de progesterona, sulfato de estroma e demais hormônios no plasma sanguíneo circulante, responsáveis pelas variações no ciclo reprodutivo bem como pela manutenção da gestação (HAFEZ, 2004).

Objetivou-se como esse estudo, avaliar a aplicabilidade da técnica de Biospeckle Laser como ferramenta para análise da atividade biológica do plasma sanguíneo de éguas em diferentes estágios reprodutivas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

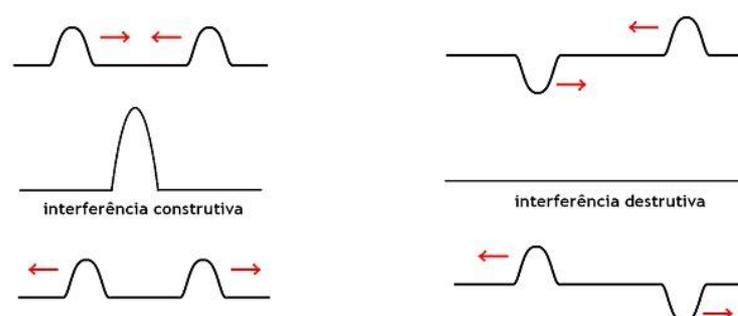
2.1 PRINCÍPIOS ÓPTICOS

2.1.1 INTERFERÊNCIA

A interferência ondulatória é um fenômeno que ocorre na natureza, onde nele ondas podem coabitar durante o mesmo tempo no mesmo local, ocasionando um efeito conhecido como superposição ou interferência de ondas. Com isso, o processo de interferência pode ser classificado em construtiva ou destrutiva (SILVA T.M, 2011).

Quando duas ondas se encontram em um mesmo local as amplitudes individuais serão somadas, caracterizando assim a interferência construtiva. Porém na destrutiva as ondas percorrem o mesmo sentido, mas oscilam em sentidos contrários fazendo com que a soma das suas amplitudes seja igual a zero (SILVA T.M, 2011).

Figura 1: Exemplificando o processo de interferência de ondas construtivas e destrutivas.



Fonte: Disponível em: <<http://pir2.forumeiros.com/t118663-interferencia#414134>> Acesso em 25 junho 2019.

2.1.2 ESPALHAMENTO DE LUZ

Absorção, transmissão, dispersão, reflexão e espalhamento, esses são os eventos envolvidos no processo de interação da luz com o elemento analisado. É a partir do espalhamento da luz que surge o granulado óptico.

Este espalhamento pode ser classificado em elástico, inelástico e quasi-elástico, onde a principal diferença entre eles está no comprimento de onda da luz espalhada. Quando se trata de um espalhamento elástico sua principal característica é que o comprimento das ondas de luz espalhadas é maior do que a incidente. Pois a interação de elétrons excitados diminui para níveis intermediários e assim emitem fótons com energias menores (WILLEMSE, 1998.).

No espalhamento inelástico o comprimento de onda não é alterado, isso por que os centros espalhadores são estáticos, apenas alteram a direção das ondas incidentes, espalhamento característico de materiais inertes. E o espalhamento quasi-elástico ocorre quando a frequência da onda espalhada é um pouco diferente da incidente, pelo fato de existir centros espalhadores ativos que provocam o deslocamento de ondas espalhadas (RUSU, 1999.).

2.1.3 REFLEXÃO

A reflexão ocorre quando um feixe de luz atinge a interface entre dois meios, onde toda ou pelo menos uma parte dessa luz será refletida, retornando ao meio de onde se originou. Podemos citar como exemplo o reflexo provocado pela água de uma piscina ou de um lago. Parte do raio incidente que não é refletido, entra no segundo meio passando a ser chamado de raio refratado, como podemos ver na imagem a seguir (ZILIO, 2000).

A reflexão de luz pode ser classificada como especular ou difusa, onde a reflexão especular ocorre apenas em superfícies polidas e lisas, onde o ângulo do raio refletido será igual ao ângulo do raio incidente (ALBREGTSEN, 2008).

Figura 2: Ilustrando o tipo de reflexão especular, onde o ângulo do raio refletido é igual ao do raio incidente.

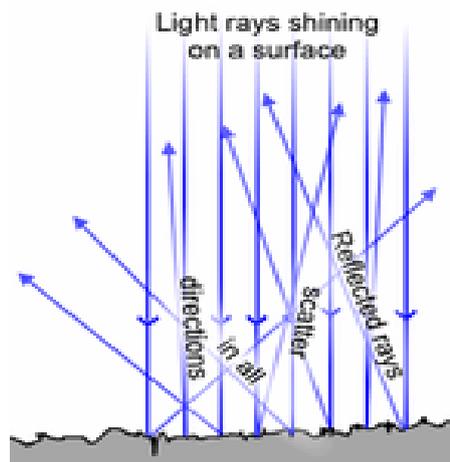


Fonte: PAIVA, 2014.

2.1.4 REFLEXÃO DIFUSA

Já a reflexão difusa ocorre em superfícies mais ásperas ou rugosas, onde a luz é refletida em todas as direções por conta da irregularidade microscópica da amostra, tendo uma aparência granular, que segundo Nobre (2008), esse efeito ocorre com a incidência de luz coerente (ZILIO, 2000). É através da reflexão difusa que conseguimos enxergar objetos que não possuem luz própria.

Figura 3: Ilustrando a dispersão dos raios ao atingirem uma superfície rugosa.



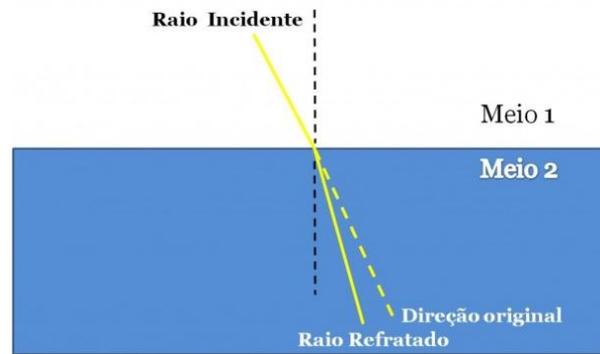
Fonte: ALBREGTSEN, 2008.

2.1.5 REFRAÇÃO

Como citado anteriormente, a refração é parte do raio luminoso que não foi refletido e que conseguiu passar de um meio para outro e é na superfície deste meio que a onda de luz

muda de direção. Basicamente esse efeito ocorre devido a mudança de velocidade que a luz sofre ao passar de um meio para o outro (ALBREGTSEN, 2008).

Figura 4: Exemplificando a trajetória feita pelo raio refratado ao ultrapassar os meios.



Fonte:AZEHEB Laboratório de Física. Disponível em <<https://azeheb.com.br/blog/entenda-a-refracao-da-luz/>> Acesso em 25 junho 2019.

2.2 INTERFEROMETRIA DE SPECKLE

Para medir pequenas mudanças nos caminhos ópticos em superfícies polidas ou observadas por reflexões especulares, são utilizados interferômetros clássicos. Além disso, a holografia tornou possível a medição interferométrica de objetos difusos e tridimensionais de geometrias variadas (SANTOS, 2003).

As técnicas interferométricas, Holográfica e de Speckle vem sendo utilizadas amplamente nas áreas de mecânica experimental ao longo dos últimos vinte anos e mais recente no âmbito de análises de matérias biológicas (SANTOS, 2003), essas técnicas têm como principal benefício, o fato de não serem destrutivas e não precisam de contato para analisar as amostras, além disso, apresentam uma alta sensibilidade em comparação a processos de análises mecânicas. Dentre elas, se destaca a técnica de speckle, pois apresenta grande faixa de sensibilidade e não necessita de meios de gravação de alta resolução (PIRES, 2006).

O efeito speckle pode ser utilizado para determinar diferentes parâmetros, sendo capaz de qualificar ou assinalar a deformação de uma amostra ou material em estudo. Isso porque o padrão de speckle resultante tem a capacidade de ser uma soma de dois ou mais campos de speckle. Sendo assim, existem duas maneiras de se obter esta superposição de campos de speckle (PIRES, 2006).

Uma delas baseia-se na superposição coerente de ondas de luz existentes simultaneamente. E a segunda é alcançada através da superposição de campos de speckle resultantes das ondas de luz espalhadas que são gravadas em instantes diferentes (PIRES, 2006).

Powell e Stetson observaram que se no decorrer de uma gravação do holograma o objeto analisado vibrasse harmonicamente em uma de suas frequências naturais de vibração se obtinha um conjunto de franjas correspondente ao modo natural de vibração. Essa gravação permitiu mapear a amplitude de vibração espacial (SANTOS, 2003).

2.3 SPECKLE

Com a invenção do laser em 1960, no que pode ser chamada de revolução científica e tecnológica, o mesmo revelou-se bastante versátil nas diversas aplicações que geraram novos impulsos as pesquisas de campo. Sua utilização tem aumentado rapidamente e a aplicação em maior destaque se da no âmbito de caracterização de materiais através da técnica de speckle, onde por meio da análise das imagens geradas pela incidência da luz laser no elemento estudado consegue-se obter características que quantificam e definem o speckle (MAFRA, 2008; BRAGA JÚNIOR, 2000). É, portanto, um método de análise rápido, não invasivo e não destrutivo.

A palavra LASER é uma abreviatura da expressão em inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que em português significa amplificação de luz por emissão estimulada. É uma forma de radiação não ionizante, bastante concentrada que quando em contato com os tecidos vai resultar em efeitos fotoquímicos, térmicos e não lineares, a depender do tipo de laser (PINHEIRO, 2017).

Ao incidir uma luz laser sobre uma superfície áspera, é provocada uma interferência nessa superfície onde se originará uma imagem chuviscada pelo feixe de luz refletido, corroborando com o princípio de Huygens, que afirma que quando um raio de luz incide sobre uma superfície, cada partícula atuará como um emissor de minúsculas ondas secundárias (SILVA, 2007). Esse é o efeito speckle, porém quando o laser atua sobre um material no qual esta ocorrendo um processo dinâmico esse efeito passa a ser chamado de speckle dinâmico, e ainda, quando laser incide sobre materiais biológicos esse fenômeno passa a ser chamado de biospeckle (RABAL et al., 1998).

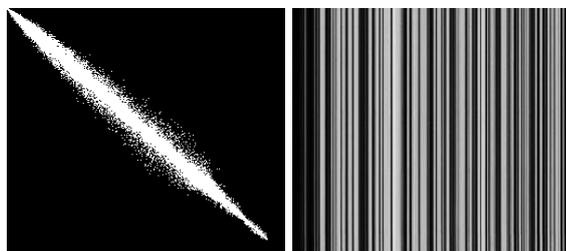
Ao incidir um feixe de luz coerente em uma amostra de superfície rugosa ou irregular, o comprimento de onda espalhado ou transmitido será diferente do comprimento da onda da fonte emissora, com isso dar-se origem a uma estrutura granular no espaço livre, que passa a ser chamado de speckle. Que é considerado um fenômeno de interferência, do tipo ondulatório, que pode ser observado tanto visualmente, quanto em partes do espectro eletromagnético e na acústica. A rugosidade microscópica de diversos materiais faz com que esses ou objetos iluminados pela luz laser apresentem-se cobertos pela estrutura granular do speckle (SILVA, 2007).

O padrão de speckle é uma figura de interferência gerada pelo espalhamento da luz após interagir com um meio físico, e quando captado por câmera adequada, mostra-se como um conjunto de grãos claros e escuros, num fenômeno óptico que somente ocorre com a incidência de luz coerente em meio físico. Como esta medida é fortemente influenciada pelos parâmetros do material analisado, o speckle pode ser classificado em estático ou dinâmico (SILVA, 2007).

2.4 SPECKLE ESTÁTICO

O speckle estático surge quando a amostra analisada não apresenta movimentação, logo esse padrão de speckle não evolui com o passar do tempo, sua variação é mínima ou quase zero, como podemos observar na figura X. Este padrão é observado em materiais não biológicos e inertes como o vidro, concreto e os metais (SILVA, 2007).

Figura 5: Representando MCO e THSP de uma amostra estática.



Fonte: O Autor.

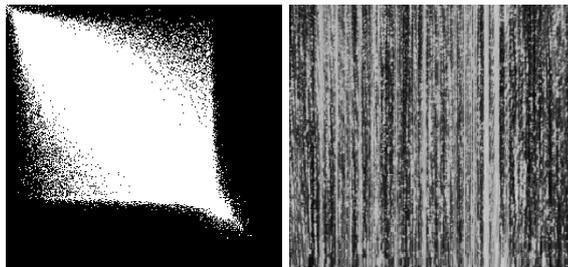
2.5 SPECKLE DINÂMICO

Nessa categoria o speckle tem como principal característica a evolução temporal do seu padrão, ou seja, esse padrão muda com o passar do tempo, pois a superfície da amostra iluminada com o laser esta em atividade, onde os centros espalhadores dessa amostra vão

atuar em difração e cada um deles será responsável por espalhar a luz incidida, fazendo com que a imagem captada pela câmera seja semelhante à de uma televisão fora de sintonia (SILVA, 2007).

Segundo Rabelo (2000), quando a luz laser atinge o material biológico, ela tende a sofrer diversos espalhamentos provocados pelas estruturas microscópicas ali inseridas, provocando uma variação na tonicidade dos pixels da imagem. Isso gera um padrão complexo de imagem que muda ao longo do tempo, pois a atividade biológica que gera este espalhamento está em constante movimento (NASCIMENTO et al., 2007). Assim o aumento da movimentação do material esta diretamente proporcional à modificação do padrão speckle em um espaço de tempo (LIMA et al., 2012).

Figura 6: Representando MCO e THSP de uma amostra bioativa.



Fonte: O Autor.

2.6 BIOSPECKLE

Esta categoria é uma variação do Speckle Dinâmico que recebe essa definição quando falamos de análises de materiais biológicos, onde os centros espalhadores serão responsáveis pela variação do speckle no decorrer do tempo, como citado no tópico anterior. Neste caso estamos falando de centros espalhadores com atividade biológica, como exemplo as células. Sendo assim o Biospeckle se mostra uma ferramenta inovadora e promissora a ser explorada para análise de tecidos animais e vegetais, bem como fluidos corporais tais como sangue, saliva e outros (BRIERS, 1974).

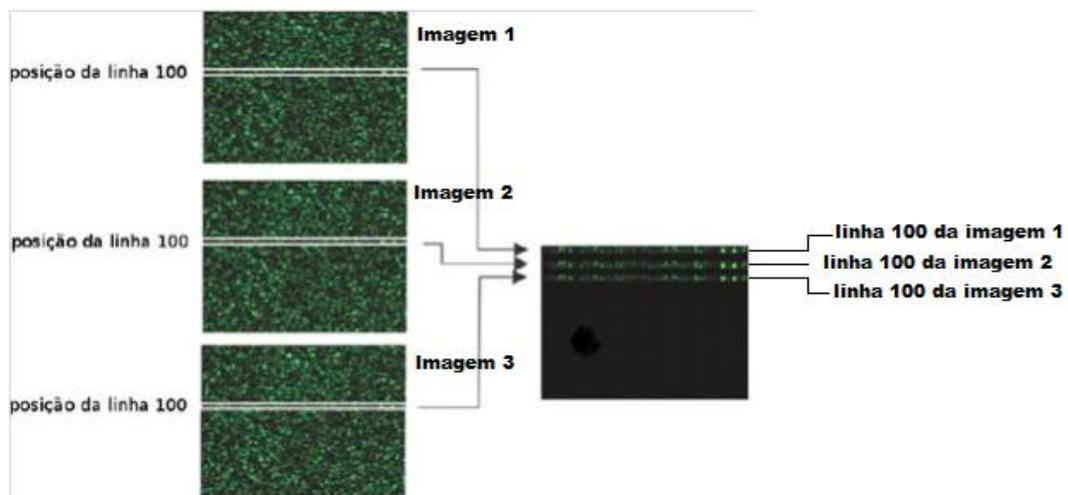
3. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO SPECKLE

Então algumas técnicas e métodos são utilizados para avaliar essa movimentação e variação ao longo do tempo. Uma delas é a técnica chamada de THSP (Time History Speckle Pattern), que pode avaliar a variação dos pixels, ou seja, da movimentação da amostra, gerando uma imagem contendo informações temporais e espaciais da intensidade desses

pixels. Essa imagem é construída através da gravação de pixels em momentos contínuos e posteriormente aglomerados em apenas uma imagem. Sendo assim, a primeira fileira do THSP representará a linha apontada no instante 1 (um). A segunda fileira corresponde à mesma linha de pixels apontada no segundo momento e dessa forma continuamente até gerar uma nova figura onde ficará registrada a mudança temporal de uma linha do padrão (EXNER, 1877).

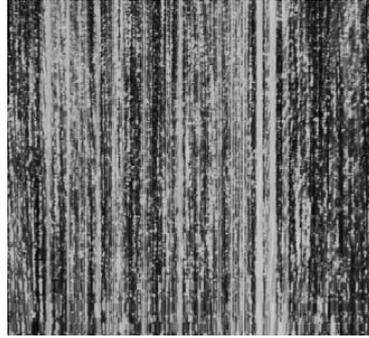
Para se calcular a THSP é necessária a utilização de ferramentas estatísticas que visam mensurar e analisar a evolução e as mudanças da intensidade dos pixels na imagem no decorrer do tempo. Essa imagem é originada após o corte de um vídeo em um determinado número de frames por segundo, que vai gerar um determinado número de imagens. Em seguida se escolhe a mesma linha em todas as imagens para se montar uma nova THSP. Exemplificando, a primeira linha da THSP corresponde a linha A da primeira imagem, a segunda linha da THSP corresponde a linha A da segunda imagem e assim sucessivamente formando uma figura bidimensional onde é possível verificar mudanças na coloração e intensidade dos pixels de uma imagem para outra, como podemos ver nas Figuras 1 e 2 a seguir (SILVA, 2017).

Figura 7: Exemplo da formação de uma THSP a partir de uma linha selecionada de cada imagem.



Fonte: O Autor.

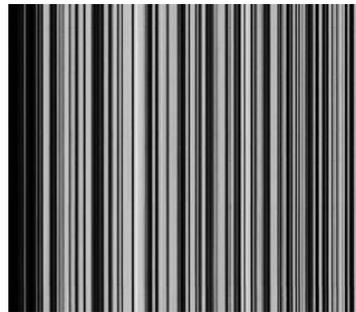
Figura 8: Representação de uma THSP totalmente formada a partir de uma mesma linha selecionada de várias imagens. Mostrando a evolução e mudança da intensidade dos pixels de uma amostra com alta bioatividade.



Fonte: O Autor.

Com isso, visualmente pode-se interpretar resultado da THSP que será formada, detectando-se o nível de bioatividade da amostra analisada. Quando esta se assemelha ao padrão verificado na Figura 7, com características de fervilhamento, indica que a amostra analisada apresenta superfície dinâmica, onde muita movimentação dos speckles está ocorrendo. Caso o padrão da THSP seja semelhante ao um código de barras (Figura 3), significa que a amostra analisada possui pouca ou nula movimentação (SILVA, 2017).

Figura 9: Representando uma THSP de uma amostra com pouca movimentação, semelhante ao código de barras.



Fonte: O Autor.

Outro método bastante utilizado para análise de texturas através do processamento de imagens digitais é o das Matrizes de Co-Ocorrências (MCO), criado por Arizaga et al (SILVA, 2007). A MCO é estimada sobre os resultados da THSP, sendo determinada pela equação:

$$MCO = [N_{ij}]$$

Para finalidade de cálculos, via de regra, se torna mais apropriado à utilização da equação modificada 3.1⁵:

$$M_{ij} = \frac{N_{ij}}{\sum_j N_{ij}}$$

Onde o valor de N_{ij} é equivalente à quantidade de vezes que o valor de intensidade i é instantaneamente seguido pelo valor de intensidade j na direção e sentido da evolução temporal. Em superfícies estáticas a variação da intensidade do THSP é quase nula no decorrer de todo o tempo, de forma que apenas a diagonal principal possui valor diferente de zero de ocorrências. Entretanto, ao THSP apresentar atividade elevada, os elementos não nulos se espalham ao redor da diagonal principal. Portanto, quanto maior atividade biológica da amostra, mais dispersos os pontos estarão da diagonal principal (SILVA 2007).

Quando a matriz apresenta um espalhamento intenso, indica que ocorreram variações na intensidade dos níveis de cinza, ficando a matriz representada no gráfico como elementos que se assemelham a um ‘feixe de luz’ que se espalha em volta da diagonal principal. Quanto maior for a atividade da amostra analisada maior será o espalhamento desse ‘feixe’ em relação a diagonal principal (SILVA, 2017).

Porém se o feixe representado graficamente não tiver um espalhamento significativo em relação a diagonal principal, esse fato indica que a amostra obteve baixa ou nenhuma bioatividade, fazendo com que não ocorresse variações entre as intensidades de cinza (SILVA, 2017).

O módulo de dispersão de imagens (MDI) também foi utilizado neste estudo, com ele analisamos as frequências das mudanças entre as tonalidades de cinza na matriz, ou para caracterização do padrão de speckle, com isso, o MDI é diretamente proporcional a atividade da amostra, e caso ocorra diminuição da atividade durante a evolução temporal, o MDI também tende a diminuir.

De acordo com Nobre (2008), o MDI traduz em números a atividade biológica e o estado que esta imagem se encontra. Sendo assim, a equação que corresponde ao MDI é utilizada através da soma dos valores MOC multiplicado pelo quadrado da distância entre o pixel ‘ i ’ de uma linha ate a diagonal principal.

$$MDI = \sum_{ij} N_{(ij)}(i - j)^2$$

Esta equação quantifica a atividade na superfície da amostra, onde MI (MI=MDI) é o momento de inércia, N_{ij} é matriz de probabilidade, onde existe a probabilidade de cada

elemento mudar de intensidade, ou seja, 'i' mudar de intensidade para 'j' na THSP (SILVA, 2017).

4. COMPONENTES PLASMÁTICOS E AVALIAÇÃO DE ESTÁGIO REPRODUTIVO

Quanto mais rápida for diagnosticada a gestação da égua melhor será seu manejo reprodutivo, e isso só é possível graças aos vários métodos utilizados por Médicos Veterinários para este fim, como por exemplo, a palpação transretal, não retorno do cio, ultrassonografia e dosagens hormonais, através do plasma sanguíneo (RICKETTS, 2008). Todo estudo que busque um entendimento mais acurado sobre as mudanças que ocorrem em éguas nos períodos de reprodução e lactação, tem importância e impacto na atividade.

O plasma sanguíneo é constituído na sua grande maioria por água (90%), mas possui outros elementos de extrema importância são as proteínas como, albumina, globulina e fibrinogênio que representam cerca de 7 a 8% dos constituintes plasmáticos (GONZÁLEZ, 2003). Como se trata de material biológico e especificamente o plasma, sabe-se que cada indivíduo possui características próprias no que diz respeito às concentrações desses elementos que o compõem, uma vez que mesmo sendo animais da mesma raça e em estágio reprodutivo semelhante.

Dentre esses vários elementos constituintes, destaca-se a albumina, que é responsável por 80% da osmolaridade do plasma sanguíneo e atua como a principal proteína carreadora de ácidos graxos livres, aminoácidos, cálcio e hormônios (GONZÁLEZ, 2003). Este poderia ser, portanto, um fator gerador de variações perceptíveis pela atividade de speckle em éguas em diferentes estágios reprodutivos, mas em estudo realizado por Andreazzi et al (2015), observou-se que não houve diferença significativa dos níveis séricos de albumina entre os grupos de éguas vazias e prenhe. O mesmo ocorreu em pesquisa realizado por Penteado et al. (1999) e Harvey et al. (2005) onde ambos relataram que os níveis de albumina permaneceram constantes durante a gestação. Campelo (2008) encontrou em seu trabalho de pesquisa com éguas da raça BH e Bretão índices menores de albumina durante o período final de gestação em ambas as raças, mas atribuiu o resultado ao status nutricional das fêmeas distintos no período gestacional e lactacional durante o período experimental.

Além dos elementos citados anteriormente, também se encontra no plasma sanguíneo diversos íons, glicose, lipídeos, aminoácidos, vitaminas, gases e hormônios que representam

de 1 a 2% de sua composição. Variações bioquímicas do plasma são reflexo da situação metabólica dos tecidos animais, podendo revelar e avaliar lesões teciduais, adaptação do animal em situações de desequilíbrios metabólicos específicos e ainda de origem nutricional (GONZÁLEZ, 2003). Outro constituinte bioquímico também presente de forma marcante é a glicose. Mas estudos apontam que em se tratando de éguas gestantes ou vazias, não se observa alterações nos níveis séricos deste elemento (UNANIAN et al, 1998; ANDREAZZI et al. 2015).

Assim, a mensuração da dosagem hormonal é a maneira mais fidedigna para classificarmos as éguas em diferentes estágios reprodutivos, destacando-se análise de estrógenos, progesterona e prostaglandinas, entre outros (HAFEZ, 2004).

Um dos métodos menos invasivos para diagnóstico de gestação em éguas é através da dosagem hormonal pela mensuração da quantidade de progesterona e sulfato de estroma. Em éguas o sulfato de estroma pode ser identificado aos 40 dias de gestação, quando o potro começa a produzi-lo e libera-lo na circulação da mãe aumentando ainda mais por volta dos 75 e 100 dias de gestação. Este hormônio poderá ser identificado e mensurado na urina, no leite ou ainda no plasma materno, tanto das éguas como nos demais animais domésticos (HAFEZ, 2004).

Já para mensuração da progesterona os testes mais utilizados são radioimunoensaio, ELISA ou quimiluminescência que devem ser coletados entre o 16º ao 22º dia depois da ovulação. A taxa de progesterona deverá ser superior a 2ng/ml nas éguas identificadas como prenhes, porém esse método não se mostra confiável, pois em éguas vazias que apresentem uma fase luteínica mais extensa, poderá gerar um resultado falso positivo (HAFEZ, 2004).

Segundo DAWSON (1977), a taxa plasmática de progesterona alcança um nível de 8 a 15 ng/ml entre o 6º e o 14º dia depois da ovulação e por volta do 30º ao 35º dia ocorre uma queda na concentração de progesterona, ficando em torno de 4 a 6ng/ml. Ela só voltará a aumentar a partir do 40º dia de gestação, devido a ação da gonadotrofina (eCG) secretada pelos cálices endometriais em desenvolvimento (ALLEN, 2001 e GINTHER, 1992).

O surgimento do primeiro corpo lúteo provoca um aumento de progesterona, chegando a níveis de 8 a 25ng/ml, entre o 40º e o 60º dia, se mantendo elevada até os primeiros 150 dias. Após isso acontece uma regressão dos corpos lúteos primários e acessórios, (<4ng/ml)

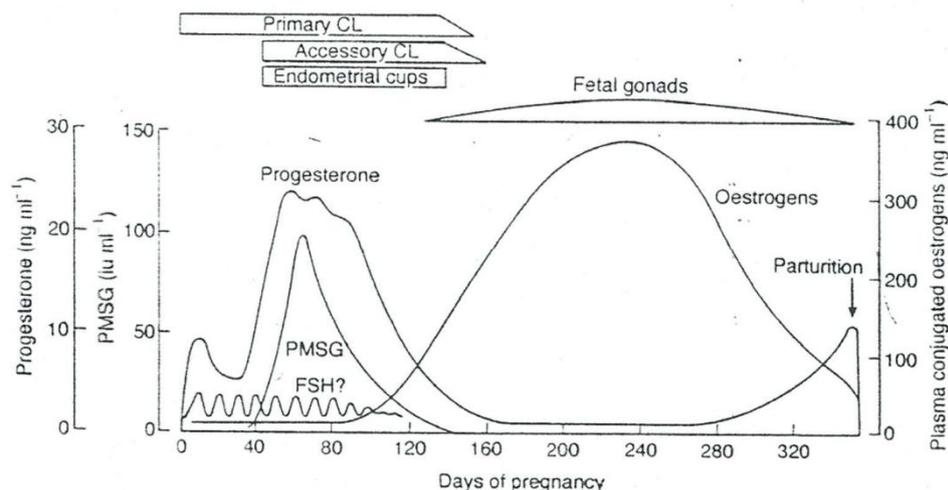
até os últimos 30 dias de gestação, que é quando esses níveis voltam a ficar elevados. (MATTA, 2013)

Um aumento das concentrações de progesterona pode ser notado no segundo e terceiro trimestre da fase gestacional das éguas, quando precursores de esteroides transportados para o útero são metabolizados dentro do tecido feto placentário (OUSEY et al, 2003). Quando a égua entra nas suas últimas semanas de gestação os níveis de progesterona apresentam um aumento rápido, chegando a picos 2 a 3 dias antes do parto, diminuindo nas últimas horas antes do parto (Mc KINNON, 2011).

Após o 8º dia de gestação os estrógenos podem ser identificados no concepto equino e o aumento da concentração sérica se dá de acordo com o seu desenvolvimento (ZAVY et al, 1979; CHOI et al, 1997). Ainda assim, nas primeiras semanas de gestação o nível de estrogênio apresenta-se baixo no soro materno, mostrando que o útero absorve esse hormônio produzido pelo concepto (TERQUI & PALMER, 1979).

No período inicial da gestação os níveis de estrógenos apresentam-se baixos, cerca de (25+)-16pg/ml), e em seguida o aumento da atividade ovariana provoca uma subida desses níveis entre os primeiros 35 e 60 dias. Por volta do 80º dia nota-se uma elevação dos níveis de estrógenos, e que aos 210 dias de gestação atingem picos (130/400 pg/ml) resultantes da hipertrofia das gônadas fetais (TSUMAGARI et al, 1991).

Figura 10: Variações hormonais em éguas gestantes.



Fonte: MATTA, 2013.

A grande quantidade de estrogênio produzido pelas éguas prenhes tem como principal função a promoção do desenvolvimento fetal, agindo ativamente sobre o fluxo sanguíneo do útero e também da placenta (PASHEN, 1979). O mesmo relata BOLLWEIN et al. (2002; 2004), ao afirmar que este hormônio tem função uterotônica e que tem ação oposta à

progesterona. Eles também associam o aumento do fluxo sanguíneo ao aumento das concentrações de estrogênios no ciclo estral e principalmente no decorrer da gestação.

As prostaglandinas (PGs) não ficam armazenadas nas células, sua produção é realizada pelas enzimas de acordo com a necessidade do organismo. Por este motivo são de difícil mensuração no plasma periférico (OUSYE, 2004). As PGs mais influentes no decorrer da gestação e do parto são a prostaglandina F2 α (PGF2 α) e a prostaglandina E2 (PGE2). O tecido uteroplacentário é responsável pela produção e liberação dessas PGs no líquido amniótico, alantoideano, circulação umbilical e circulação uterina durante o terço médio e final da gestação, mas ainda assim as concentrações permanecem baixas no plasma (1-2 ng/ml) (OUSEY, 2004).

A placenta, mais precisamente os trofoblastos, também produzem outro hormônio chamado de relaxina (KLONISH & HOMBACH, 2000). Aumentos na concentração da relaxina ocorrem depois dos 80 dias de gestação e permanece aumentada com o crescimento da placenta. Outra situação que pode promover uma elevação da concentração é o período do parto provocado pelo aumento da ocitocina, visto que em administrações exógenas de ocitocina as concentrações de relaxina acompanham esse aumento (STEWART et al, 2004; THORBURN, 1993).

A ocitocina também é um hormônio da fase gestacional da égua podendo ser produzido por tecidos como, corpo lúteo e córion, onde atuará de forma parácrina, mas sempre será secretado pela neuro-hipófise (MITCHELL et al, 1998). A ocitocina é uma das principais responsáveis pelas contrações uterinas no decorrer do parto, gerando picos no momento de contrações extremas e expulsão do feto (VIVRETTE et al, 2000). Além desse, durante a lactação, atuam diretamente sobre o tecido secretor da glândula mamária o hormônio do crescimento (GH) e a prolactina.

Como citado anteriormente o hormônio eCG, gonadotrofina coriônica equina é secretado pelos cálices endometriais em desenvolvimento. Esses cálices têm sua origem de formação nas células trofoblásticas binucleadas que ocupam a base do corno gravídico. Este hormônio é de exclusividade da gestação de equinos (MEIRELES, 2017), e entre o 37º e o 41º dia após a ovulação já pode ser identificado na corrente sanguínea e que rapidamente atingem picos de 40 a 180 UI/ml por volta dos 55 a 75 dias. Porém, a degeneração dos cálices e ausência de eCG ocorrem entre 100 e 140 dias de gestação, gerando níveis desse hormônio indetectáveis na circulação (ALLEN et al, 2002; EVANS, IRVAINE, 1975).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica que utiliza luz coerente (LASER) para analisar superfícies inertes, tais como, vidro e metal e também compostos biológicos vem se desenvolvendo e ganhando destaque desde a invenção do laser no ano de 1960, pois ela permite que esses materiais sejam avaliados de maneira rápida, segura e sem provocar danos ao elemento estudado.

Essa técnica, chamada de speckle, vem sendo utilizadas para diversos fins e em diversas áreas do conhecimento, tais como a Física, Agronomia e Medicina Veterinária, como mais uma ferramenta auxiliar de análises para obtenção de informações referente a qualquer elemento que se deseja estudar. Isso só é possível graças a sua fácil aplicabilidade e ao fato de não causar danos aos elementos analisados, como citado anteriormente.

Existem duas formas de classificarmos a técnica de speckle, a primeira delas é o speckle estático, recebe esse nome, pois não ocorrem mudanças no padrão de speckle durante o passar do tempo, característicos de elementos inertes. A segunda forma é o speckle dinâmico (biospeckle), que vem atraindo cada vez mais novos pesquisadores, pois neste conseguimos acompanhar toda a mudança que o elemento estudado irá sofrer com o passar do tempo, através de uma evolução temporal do speckle.

Avaliação e o diagnóstico reprodutivo em éguas se da por vários mecanismos, entre eles podemos destacar o não retorno do cio, palpação retal, ultrassonografia e a mensuração hormonal no plasma sanguíneo. E o surgimento de técnicas inovadoras e menos invasivas e que possam gerar resultados rápidos e precisos, como a de biospeckle, trazendo para os animais um bem-estar melhor, essa disponibilidade de novas tecnologias acabam acarretando um maior desenvolvimento nas atividades as quais ela estão sendo inseridas.

Portanto, em teoria é possível fazer o uso da técnica de biospeckle para avaliação e identificação de variações plasmáticas ao longo dos diversos estágios reprodutivos de fêmeas.

Atividade Biológica por Speckle Dinâmico em Soro Sanguíneo de Éguas em Diferentes Estágios Reprodutivos

Biological Activity Using Dynamic Speckle in Blood Serum of Mares in Different Reproductive Stages

Celso Westphalen Neto²; Tobyas Maia de Albuquerque Mariz¹; Emerson de Lima¹; Pierre Barnabé Escodro¹; Carolyny Batista Lima¹; João Paulo Santos de Oliveira³; Arthur Roosevelt Bispo da Silva³

RESUMO

Objetivou-se com esse estudo, avaliar os picos de atividade biológica de amostras de plasma sanguíneo de éguas em diferentes estágios reprodutivos, por análise de speckle dinâmico. Foram utilizadas amostras de 40 éguas da raça Mangalarga Marchador pertencentes ao Haras Formoso 2S localizado na cidade de Cajueiro – AL. As éguas foram divididas em 4 grupos de 10 animais cada, classificados de acordo com a fase de gestação, sendo 10 éguas vazias (não prenhes), 10 éguas prenhas no terço inicial de gestação entre 1 e 4 meses, 10 éguas em terço final de gestação entre 7 e 11 meses e 10 éguas em fase de lactação (até o segundo mês pós-parto). A obtenção da leitura de atividade biológica por speckle dinâmico (biospeckle) foi feita através da captura de imagens refletidas pelo laser por meio de uma câmera CCD (*charge coupled device*) nas amostras de soro sanguíneo. Esses dados foram analisados através de técnicas de processamento de imagens pelo aplicativo computacional STMD, empregando-se o método de THSP (*time history speckle pattern*), que avalia a evolução temporal da figura de interferência gerada na superfície da amostra ao longo do tempo. A partir do THSP foi gerada uma matriz de co-ocorrência, usada para apresentar o MDI (módulo de dispersão de intensidades), que forneceu os dados da bioatividade das amostras. Os dados obtidos foram então tratados pelo programa OriginPro 8.Ink, para geração de gráficos e comparação dos mesmos entre os grupos estudados. Observou-se que, independente do estágio reprodutivo das éguas considerado nesse estudo, existe uma assinatura geral de atividade captada pelo biospeckle. Ocorreu uma curta fase de movimentação das amostras, provavelmente associada à acomodação da gota na lâmina, seguida de uma curva ascendente iniciada entre o minuto 5 e 10 de avaliação, que alcança seu pico em uma faixa de tempo entre o minuto 15 e 25, decaindo de maneira uniforme até praticamente se anular quando passados 45 minutos de análise. O grupo de éguas em terço final de gestação apresentou bioatividade

das amostras superior, quando comparadas às éguas que estão em terço inicial. A curva observada no grupo de éguas em lactação se assemelha um pouco à curva do grupo de terço inicial. A variação inerente à presença de moléculas bioativas nas diferentes fases avaliadas, que atuam como elementos dispersores da luz coerente incidida nas amostras, aparentemente influenciam no padrão de biospeckle detectado em cada uma delas. Conclui-se que os picos de atividade biológica de amostras de plasma sanguíneo de éguas avaliadas pela técnica de análise de speckle dinâmico, mostram-se distintos tanto em amplitude quanto em tempo de ocorrência, de acordo com os estágios reprodutivos das fêmeas.

Palavras-chave: biospeckle, equino, sangue

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the biological activity in blood serum plasma samples from mares in different reproductive stages using dynamic speckle analysis. For this purpose, samples were collected from 40 Mangalarga Machador mares from the Formoso 2S horse farm in Cajueiro – AL. The mares were classified into 4 groups of 10 animals each according to the pregnancy stage: 10 empty mares (not pregnant), 10 pregnant mares in the early third of pregnancy between 1 and 4 months, 10 pregnant mares in the final third of the pregnancy between 7 and 11 months, and 10 lactating mares (within the two months post-partum). The biological activity response using dynamic speckle (biospeckle) was obtained through the capture of images reflected by a laser on a sample using a CCD camera. This data was analysed using image processing techniques through the computational application STMD, applying THSP (time history speckle pattern) methodology which evaluates the temporal evolution of the interference image generated on the surface of the sample over time. A coherence matrix generated from the THSP was used to present the intensity module dispersion which provided the bioactivity data. This data was then processed using the program OriginPro 8.Ink, generating graphs and comparing the results from the different groups under study. A general biospeckle signature was observed regardless of the mares' reproductive stage considered in this study. A short phase of movement of the samples associated to the accommodation of the drop on the slide was observed. It was followed by an ascending curve starting between 5 and 10 minutes of observation and reaching a peak within 15 and 25 minutes and finally decayed uniformly until almost zero after 45 minutes. The group of pregnant mares in the final third of pregnancy presented superior bioactivity when

compared to pregnant mares in the early third of pregnancy. The curve observed for the group of lactating mares is similar to the curve obtained for the group of pregnant mares in the early third of pregnancy. Bioactive molecules act as dispersion elements of coherent light incident on a sample. The variation inherent to the presence of bioactive molecules in the different stages evaluated apparently influence the biospeckle pattern detected in each sample. It was concluded that the biological activity peaks of the blood plasma samples from the mares evaluated in this study using the dynamic speckle analysis technique were different on both amplitude and time of occurrence, according to the different reproductive stages.

Key words: biospeckle, equine, blood

1 Introdução

O padrão de speckle é uma figura de interferência gerada pelo espalhamento da luz após interagir com um meio físico. Como esta medida é fortemente influenciada pelos parâmetros do material analisado, o speckle pode ser classificado em estático ou dinâmico. Nas últimas décadas, o uso da avaliação de speckle dinâmico ou biospeckle vem ganhando destaque como alternativa de análise de atividade biológica de amostras biológicas. Tal motivo reside no fato de esta fornecer um ensaio rápido e confiável, permitindo uma gama de possibilidades no que se refere ao estudo de sistemas biológicos que vão desde caracterização de bioatividades de sementes até sangue de animais (Bries, 1993; Oulamara & Trinillon, 1989).

O princípio do biospeckle está fundamentado no fenômeno físico de interferência de luz (Chang, 2005), que ocorre quando duas ou mais ondas se superpõem gerando um padrão que pode ser classificado como destrutivo ou construtivo. No caso da análise de amostras de diferentes fluídos corporais, esse padrão de superposição observado é devido a interação da onda eletromagnética (luz laser) com a superfície da amostra. Assim, quando se incide a luz laser na amostra avaliada, surge em sua superfície um padrão de interferência que recebe o nome de speckle dinâmico ou biospeckle (Bries, 1975).

Sabe-se que a amostra está em atividade ao longo do tempo e seus constituintes biológicos são responsáveis pelo espalhamento da luz laser, formando um padrão de interferência que gerará como resultado uma espécie de ferverilhamento ou granulado óptico. Na literatura uma das primeiras citações encontradas sobre biospeckle foi relatada por Abramson, pouco tempo após o surgimento do laser (Bries, 1975).

Em relação à aplicação da técnica apresentada, fica claro que todo e qualquer elemento capaz de alterar o padrão de resposta à aplicação do laser em uma amostra biológica é passível de ser considerado como um elemento dispersor capaz de interferir na resposta encontrada. Portanto, é possível considerar que variações metabólicas e hormonais referentes ao estágio reprodutivo de éguas podem ser fatores provocadores de uma alteração na atividade sérica capaz de ser captada por speckle dinâmico. Essa variação hormonal citada já é utilizada para este fim, dosando-se progesterona, sulfato de estroma e demais hormônios no plasma sanguíneo circulante, como forma de identificar variações no ciclo reprodutivo e gestacional desses animais (E. Hafez & B. Hafez 2004).

Objetivou-se como esse estudo, avaliar os picos de atividade biológica de amostras de plasma sanguíneo de éguas em diferentes estágios reprodutivos, por análise de speckle dinâmico.

2 Metodologia

Foram utilizadas amostras de soro sanguíneo de 40 éguas da raça Mangalarga Marchador pertencentes ao Haras Formoso 2S localizado na cidade de Cajueiro – AL. As éguas foram divididas em 4 grupos de 10 animais cada, classificados de acordo com a fase de gestação, sendo 10 éguas vazias (não prenhas), 10 éguas prenhas no terço inicial de gestação entre 1 e 4 meses, 10 éguas em terço final de gestação entre 7 e 11 meses e 10 éguas em fase de lactação (até o segundo mês pós-parto). As amostras foram coletadas sequencialmente por grupo experimental, começando pelas fêmeas vazias, passando pelas em estágio de 1/3 inicial de gestação, 1/3 final de gestação e finalmente as que estavam em lactação. O sangue foi obtido por venopulsão na veia jugular esquerda através do uso do sistema de coleta em tubos à vácuo sem anticoagulante (Vacutainer[®]), com encaminhamento conseguinte das amostras para o Laboratório de Fisiologia e Parasitologia Animal da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) - Campus Arapiraca, em caixa térmica hermeticamente fechada com temperatura em torno de 5°C. Todas as 10 amostras de cada grupo eram centrifugadas ao mesmo tempo durante 10 minutos, sendo 40 segundos de aceleração e 60 segundos de frenagem automática, a 3600RPM, gerando uma força de 2561g, separando-se o plasma para posterior análise.

As amostras foram transferidas para micro tubos tipo Eppendorf de 1 ml, e levadas nas mesmas condições de armazenamento em caixa térmica citadas anteriormente para o laboratório de Biospeckle do Núcleo de Ciências Exatas (NCEX) da UFAL - Campus Arapiraca. Com o uso de um pipetador automático de volume fixo de 10µl com ponteiros descartáveis, despejava-se o conteúdo aspirado da amostra em uma lâmina, que era

cuidadosamente posicionada no sistema de análise montado (Figura 1) para início da análise, com um laser tipo diodo operando em modo CW com comprimento de onda 532 nm e potência fixa de 3mW. Em testes preliminares, foi verificado que as amostras não apresentavam atividade significativa após os 45 minutos sob incidência do laser, sendo definido esse tempo como limite de coleta de dados para todas as 40 amostras.

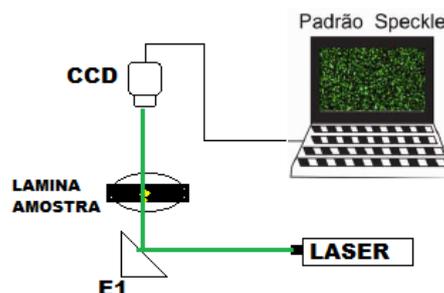


Figura 1. Aparato montado para obtenção dos speckles das diferentes amostras experimentais.

O sistema de captação de imagens (speckles), foi composto por uma câmera CCD (*charge coupled device*) acoplada a um computador, além de uma luz laser e um espelho (E1) para reflexão (Figura 1). Foi previamente testado em diversas configurações para se obter um melhor desempenho e criar um padrão a ser seguido durante todo o experimento, já que não há na literatura nenhum estudo feito com o mesmo propósito.

A obtenção dos picos de speckle dinâmico das amostras foi feita através da captura das imagens refletidas pelo laser, por meio da câmera CCD. Para um monitoramento mais eficiente da bioatividade foram gravados vídeos de 1 minuto cada, gerando 45 vídeos por amostra, 450 por grupo experimental, e 1800 no total. Cada um dos 1800 vídeos foi posteriormente avaliado e fragmentado em frames, utilizando-se o prompt de comando da ferramenta FFMPEG (`ffmpeg -i "video1" -r 7 "pastal"\%d.png`), gerando-se em torno de 400 a 420 imagens para cada um.

As análises dos padrões das imagens captadas foram realizadas por meio de um aplicativo computacional STMD desenvolvido pelo Laboratório de Biospeckle do NCEx/UFAL - Campus Arapiraca (Lucena, 2012), empregando-se o método de THSP (*time history speckle pattern*), que avalia a evolução temporal do speckle dinâmico na superfície da amostra ao longo do tempo. Por meio dele, foi montada a matriz de co-ocorrência (MCO), determinando-se assim o módulo de dispersão de intensidades (MDI) e de entropia.

Os dados foram por fim, processados no programa OriginPro 8.Ink, para geração de gráficos e comparação dos resultados entre os grupos estudados.

3 Resultados e discussões

As figuras 2 e 3 trazem as médias dos dados normalizados do módulo de dispersão de intensidades (MDI) de amostras de plasma sanguíneo de éguas Mangalarga Marchador em diferentes estágios reprodutivos, apresentados em separado e de forma conjunta, respectivamente.

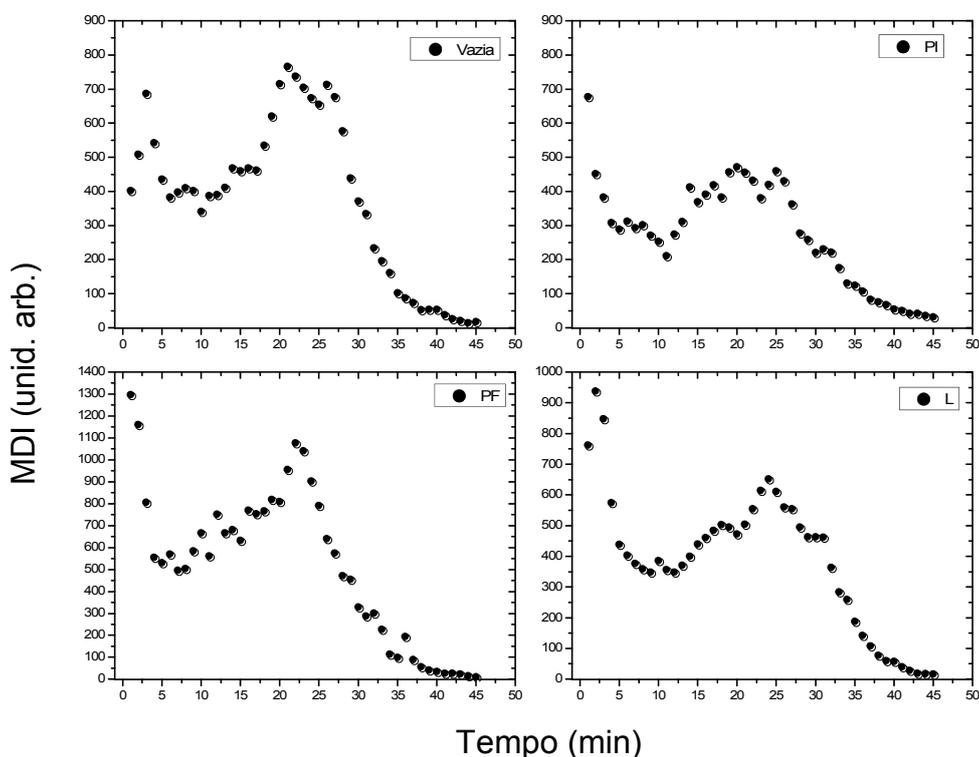


Figura 2. Gráficos isolados de MDI em função do tempo (45 min) com valores médios de speckle dinâmico de amostras de plasma sanguíneo de éguas Mangalarga Marchador em diferentes estágios reprodutivos quer sejam não prenhes (VAZIA), em terço inicial de gestação (PI), terço final de gestação (PF) e em lactação (L).

Percebe-se nas Figuras 2 e 3 que, independente do estágio reprodutivo das éguas considerado nesse estudo, existe uma assinatura geral de atividade captada no sistema de avaliação de speckle dinâmico montado para o experimento. Observa-se que no início da avaliação ocorre um pico curto de movimentação das amostras, associado a acomodação da gota na lâmina, seguido de uma curva ascendente iniciada entre o minuto 5 e 10, que alcança seu pico máximo em uma faixa de tempo entre o minuto 15 e 25, decaindo de maneira

uniforme até praticamente se anular quando passados 45 minutos de análise. O plasma sanguíneo é constituído na sua grande maioria por água (90%), mas possui outros elementos bioativos de extrema importância representando cerca de 7 a 8% dos constituintes plasmáticos (González & Scheffer, 2003).

Embora a incidência do laser não tenha gerado aumento de temperatura nas amostras, é normal que ocorra um processo de desidratação natural da gota com o passar do tempo, o que elevaria momentaneamente a concentração de substâncias bioativas presentes, resultando no aumento da atividade observado devido a concentração destes elementos dispersores da luz, em todos os grupos. Após o aumento da movimentação molecular presente, segue-se um estágio de diminuição da atividade, pela degradação destes constituintes inerente aos processos metabólicos que estão ocorrendo e com os quais estão envolvidos. Isso explica esse padrão de resposta encontrado no estudo.

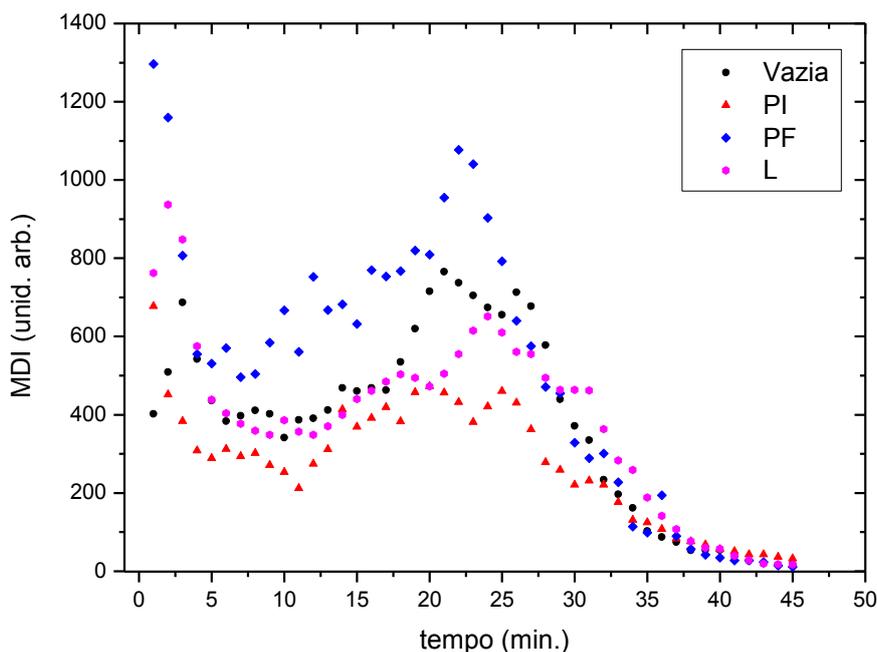


Figura 3. Gráfico conjunto de MDI em função do tempo (45 min) com valores médios de speckle dinâmico de amostras de plasma sanguíneo de éguas Mangalarga Marchador em diferentes estágios reprodutivos quer sejam não prenhes (VAZIA), em terço inicial de gestação (PI), terço final de gestação (PF) e em lactação (L).

Dentre os elementos bioativos capazes de gerar dispersão da luz coerente, encontram-se as proteínas plasmáticas, diversos íons, glicose, lipídeos, aminoácidos, vitaminas, gases e

hormônios. Variações bioquímicas do plasma são reflexo da situação metabólica dos tecidos animais, podendo servir para revelar e avaliar estágios fisiológicos, lesões teciduais, além de adaptações dos animais a situações de desequilíbrios metabólicos específicos e de origem nutricional (González & Scheffer 2003).

A albumina destaca-se dentre esses constituintes, sendo responsável por 80% da osmolaridade do plasma sanguíneo e atua como a principal proteína carreadora de ácidos graxos livres, aminoácidos, cálcio e hormônios (González & Scheffer 2003). Este poderia ser, portanto, um fator gerador de variações perceptíveis pela atividade de speckle dinâmico em éguas em diferentes estágios reprodutivos, mas em estudo realizado por Andreazzi et al (2015), observou-se que não houve diferença significativa dos níveis séricos desta proteína entre os grupos de éguas vazias e prenhes.

O mesmo ocorreu em pesquisa realizada por Penteado, Vaz e Lacerda Neto (1999) e Harvey, Pate e Kivipelto (2005) que relataram que seus níveis séricos permaneceram constantes durante a gestação. Campelo (2008) encontrou em seu trabalho de pesquisa com éguas da raça BH e Bretão índices menores de albumina durante o período final de gestação em ambas as raças, mas atribuiu o resultado ao status nutricional das fêmeas distintos ao longo do período experimental.

Outro constituinte bioquímico também presente de forma marcante e que poderia influenciar nos resultados obtidos entre os grupos é a glicose. Mas estudos também apontam que em se tratando de éguas gestantes ou vazias, não se observa alterações nos níveis séricos deste elemento (Unanian, Silva & Manzano, 1998; Andreazzi et al. 2015).

Assim, a mensuração da dosagem hormonal é a maneira mais fidedigna para classificarmos as éguas em diferentes estágios reprodutivos, destacando-se análise de estrógenos, progesterona e prostaglandinas, entre outros. O teste de técnicas alternativas com a do biospeckle aqui utilizada, contudo, mostra-se necessário uma vez que a oscilação desses hormônios ao longo do período gestacional e lactacional são grandes, conforme vê-se em literaturas da área. Em éguas, o sulfato de estroma, por exemplo, pode ser identificado aos 40 dias de gestação, quando o potro começa a produzi-lo e libera-lo na circulação da mãe aumentando ainda mais por volta dos 75 e 100 dias de gestação. Este hormônio poderá ser identificado e mensurado na urina, no leite ou ainda no plasma materno, tanto das éguas como nos demais animais domésticos (E. Hafez & B. Hafez, 2004).

Já para mensuração da progesterona os testes mais utilizados são radioimunoensaio, ELISA ou quimiluminescência, em amostras coletadas entre o 16º ao 22º dia depois da ovulação, onde a taxa desse hormônio apresenta-se superior a 2ng/ml nas éguas prenhes. Esse

método não se mostra plenamente confiável para alguns autores, pois em éguas vazias que apresentem uma fase luteínica mais extensa, poderá ocorrer um resultado falso positivo (E. Hafez & B. Hafez, 2004). Segundo Dawson (1977), a taxa plasmática de progesterona alcança um nível de 8 a 15 ng/ml entre o 6º e o 14º dia depois da ovulação e por volta do 30º ao 35º dia ocorre uma queda em sua concentração, ficando em torno de 4 a 6ng/ml, só voltando a aumentar a partir do 40º dia de gestação, provocado pela ação da gonadotrofina (eCG) secretada pelos cálices endometriais em desenvolvimento (Allen, 2001; Ginther, 1992).

As prostaglandinas (PGs) não ficam armazenadas nas células, e sua produção é realizada pelas enzimas de acordo com a necessidade do organismo. Por este motivo são de difícil mensuração no plasma periférico (Ousey, 2004). As PGs mais influentes no decorrer da gestação e do parto são a prostaglandina F2 α (PGF2 α) e a E2 (PGE2). O tecido uteroplacentário é responsável pela produção e liberação dessas PGs no líquido amniótico, alantoideano e circulação umbilical e uterina durante o terço médio e final da gestação, mas ainda assim as concentrações permanecem baixas no plasma (1-2 ng/ml) (Ousey, 2004).

O hormônio eCG, gonadotrofina coriônica equina, é secretado pelos cálices endometriais em desenvolvimento. Esses cálices têm sua origem de formação nas células trofoblásticas binucleadas que ocupam a base do corno gravídico. Além disso, este hormônio é de exclusividade da gestação de equinos (Meireles, Alonso & Affonso, 2017). Entre o 37º e ao 41º dia após a ovulação já pode ser identificado na corrente sanguínea, e rapidamente atingem picos de 40 a 180 UI/ml por volta dos 55 a 75 dias. Contudo, uma degeneração dos cálices e ausência de eCG ocorrem entre 100 e 140 dias de gestação, onde seus níveis já não são mais detectáveis na circulação (Allen, Wilsher, Stewart, Ousey & Fowden, 2002; Evans & Irvine, 1975).

Nos resultados do grupo de animais em terço inicial pode-se notar que em relação ao grupo de éguas vazias o pico máximo de atividade ocorre mais cedo. Por haver aqui uma maior concentração de hormônios gestacionais como por exemplo o sulfato de estroma (E. Hafez & B. Hafez, 2004), substâncias que podem estar aumentando o padrão de espalhamento do speckle, por mostrarem-se mais ativas. A partir do 8º dia de gestação os estrógenos podem ser identificados no concepto equino e o aumento da concentração sérica se dá de acordo com o tamanho do diâmetro deste feto (Zavy, Mayer, Vernon, Bazer & Sharp, 1979; Choi, Anderson & Roser, 1997). Ainda assim, nas primeiras semanas de gestação o nível de estrogênio apresenta-se baixo no soro materno, mostrando que o útero absorve esse estrogênio produzido pelo feto (Terqui & Palmer, 1979).

No período inicial da gestação os níveis de estrógenos apresentam-se baixos, cerca de (25+/-16pg/ml), e em seguida o aumento da atividade ovariana provoca uma subida desses níveis no período entre os primeiros 35 e 60 dias. Por volta do 80º dia nota-se uma elevação dos níveis de estrógenos, que aos 210 dias de gestação atingem picos (130/400 pg/ml) resultantes da hipertrofia das gônadas fetais (Tsumagri et al, 1991).

A grande quantidade de estrogênio produzido pelas éguas prenhes tem como principal função a promoção do desenvolvimento fetal, agindo ativamente sobre o fluxo sanguíneo do útero e também da placenta (Pasehn & Allen, 1979). O mesmo relataram Bollwein, Mayer, Weber e Stollar (2002) e Bollwein, Weber, Woschee e Stolla (2004), ao afirmarem que este hormônio tem função uterotônica e que tem ação oposta à progesterona. Esses autores associam também o aumento do fluxo sanguíneo ao aumento das concentrações de estrogênios no ciclo estral e principalmente no decorrer da gestação.

A progesterona é outro hormônio que pode estar envolvido nessa diminuição mais lenta da atividade da amostra no decorrer do tempo identificada pelo biospeckle. Ela sofre diversas variações nos períodos iniciais, e segundo Matta (2013) o primeiro corpo lúteo ativo causa um aumento desse hormônio no período entre os primeiros 40 e 60 dias de gestação, mantendo-se elevada até os 150 dias de gestação.

Se comparamos este grupo de éguas em terço final de gestação com as do grupo de terço inicial de gestação, nota-se que na média estes indivíduos apresentaram uma atividade registrada superior ao anterior. Um aumento das concentrações de progesterona pode ser notado no segundo e terceiro trimestre da fase gestacional das éguas, quando precursores de esteroides transportados para o útero são metabolizados dentro do tecido feto placentário (Ousey et al., 2003). Quando a égua entra nas suas últimas semanas de gestação os níveis de progesterona apresentam um aumento rápido, chegando a picos 2 a 3 dias pré-parto e diminuindo nas últimas horas antes do nascimento (Mc Kinnon & Voss 2011).

As prostaglandinas (PGs) que mais influenciam no decorrer da gestação e do parto são as PGF2 α e PGE2, elas não permanecem armazenadas nas células, pois sua produção é realizada por enzimas de acordo com a demanda do organismo. Portanto são de difícil mensuração no plasma periférico. O tecido uteroplacentário é responsável pela produção e liberação dessas PGs na circulação umbilical e uterina durante o terço médio e final da gestação, mesmo assim as concentrações permanecem baixas no plasma (Ousey, 2004), sendo assim, um hormônio que pode não influenciar tanto na atividade biológica da amostra.

Já os resultados das éguas em fase de lactação, apresentaram seu pico de forma mais tardia em relação aos demais grupos. A ocitocina é um hormônio da fase gestacional da égua,

mas também muito presente na fase de lactação, por promover a atividade de ejeção do leite materno, sendo produzido pela de forma primordial pela neurohipófise (Mitchell, Fang & Wong, 1998). Também é uma das principais substâncias responsáveis pelas contrações uterinas no decorrer do parto, gerando picos de contrações extremas e expulsão no momento de expulsão do feto (Vivrette, Kindahl, Munro, Roser & Stabenfeldt, 2000). Além desse, durante a lactação, atuam diretamente sobre o tecido secretor da glândula mamária o hormônio do crescimento (GH) e a prolactina.

O grupo de éguas em terço final de gestação apresentaram uma bioatividade das amostras superior, quando comparadas as éguas que estão em terço inicial. Este fato pode estar relacionado uma menor variedade de hormônios realmente perceptíveis e bioativos presentes no período final da gestação, o que pode tornar seu plasma mais ativo em elementos dispersivos perceptíveis por speckle, devido a um maior espaço disponível na amostra para a agitação entre as moléculas, fato ocorrido de forma inversa com as amostras de plasma das éguas em terço inicial de prenhes.

A curva observada no grupo de éguas em lactação se assemelha um pouco a curva do grupo de terço inicial, sendo que nesta fase o principal hormônio presente é a prolactina, tendo ação direta sobre a produção e secreção do leite. Mas, de forma concomitante, existe também a presença marcante de outros hormônios como a progesterona e estrogênio, ambos presentes no período inicial de gestação. Já o grupo de éguas vazias apresenta uma curva de declínio muito próxima a curva do grupo em terço final de gestação.

4 Conclusão

Conclui-se que os picos de atividade biológica de amostras de plasma sanguíneo de éguas avaliadas pela técnica de análise de speckle dinâmico, mostram-se distintos tanto em amplitude quanto em tempo de ocorrência, de acordo com os estágios reprodutivos das fêmeas.

5 Agradecimentos

Os autores são gratos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo apoio financeiro, através de bolsa de estudo, para o desenvolvimento e conclusão desta pesquisa, bem como a Universidade Federal de Alagoas (UFAL) por disponibilizar toda sua estrutura.

Referências bibliográficas

- Allen, W. R. (2001). Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction*, 121(4), 513-527.
- Allen, W. R., Wilsher, S., Stewart, F., Ousey, J., & Fowden, A. (2002). The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. *Journal of endocrinology*, 172(2), 237-246.
- Bollwein, H., Mayer, R., Weber, F., & Stolla, R. (2002). Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*, 57(8), 2043-2051.
- Briers, J. D. (1993). Speckle fluctuations and biomedical optics: implications and applications. *Optical Engineering*, 32(2), 277-284.
- Briers, J. D. (1975). Wavelength dependence of intensity fluctuations in laser speckle patterns from biological specimens. *Optics Communications*, 13(3), 324-326.
- Campelo, J. A. D. S. (2008). Perfil bioquímico sérico de éguas gestantes e não gestantes das raças brasileiro de hipismo e bretão.
- Chang, W. S. (2005). *Principles of lasers and optics*. Cambridge University Press. ISBN 0-978-0-521-64229-3.
- Choi, S. J., Anderson, G. B., & Roser, J. F. (1997). Production of free estrogens and estrogen conjugates by the preimplantation equine embryo. *Theriogenology*, 47(2), 457-466.
- Evans, M. J., & Irvine, C. H. (1975). Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (23), 193-200.
- Ginther, O. J. (1991) *Reproductive Biology of the Mare*, 2nd edn. Cross Plains, WI: Equiservices.
- Diaz Gonzalez, F. H., & Scheffer, J. L. (2003). Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. *Simpósio de Patologia Clínica Veterinária (1.; 2003, Porto Alegre)*.
- González, F. H. D. (2006). Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária. 2aed. *Porto Alegre: UFRGS, 360p.*
- Hafez, E. S. E. (2004). Anatomia da reprodução masculina. *HAFEZ, ESE; HAFEZ, B. Reprodução animal. 7ª ed. Barueri: Manole, 3-12.*
- Harvey, J. W., Pate, M. G., Kivipelto, J., & Asquith, R. L. (2005). Clinical biochemistry of pregnant and nursing mares. *Veterinary clinical pathology*, 34(3), 248-254.
- Júnior, R. A. B., Souza, A., Vieira, M. G. G. C., Pinho, E. V. R. V., Rabal, J. H., & Fabbro, I. M. D. Potencial do Biospeckle Laser para Avaliação da Viabilidade de Sementes, (25),645-649.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L. (1997). Clinical biochemistry of domestic animals. San Diego Academic Press. *San Diego, CA, USA.*

- Klonisch, T., & Hombach-Klonisch, S. (2000). Relaxin Expressed at the Feto–Maternal Interface. *Reproduction in Domestic Animals*, 35(3-4), 149-152.
- Lucena, D. J. F. de (2012), Ferramenta para Cálculo de Descritores de Textura a partir de um volume de Speckle.
- DA MATTA, M. P. (2013). *AValiação dos Parâmetros de Gestação de Éguas da Raça Mangalarga Marchador* (Doctoral dissertation, Universidade Federal de Viçosa).
- Mc kinnon, A. O., & Voss, J. L. Equine Reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, 2011.
- Meirelles M. G., Alonso M. A., & Affonso F. J (2017). Endocrinologia reprodutiva da égua gestante. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte, 1(41), 316-325.
- Mitchell, B. F., Fang, X., & Wong, S. (1998). Oxytocin: a paracrine hormone in the regulation of parturition?. *Reviews of reproduction*, 3(2), 113-122.
- Motta, V. T. (2003). Bioquímica clinica para o laboratório: princípios e interpretações.
- Oulamara, A., Tribillon, G., & Duvernoy, J. (1989). Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle. *Journal of Modern Optics*, 36(2), 165-179.
- Ousey, J. C. (2004). Peripartal endocrinology in the mare and foetus. *Reproduction in domestic animals*, 39(4), 222-231.
- Ousey, J. C., Forhead, A. J., Rosedale, P. D., Grainger, L., Houghton, E., & Fowden, A. L. (2003). Ontogeny of uteroplacental progesterone production in pregnant mares during the second half of gestation. *Biology of reproduction*, 69(2), 540-548.
- Pashen, R. L., & Allen, W. R. (1979). The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (27), 499-509.
- Penteado, C., Vaz, B. B. D., Lacerda Neto, J. C., Santana, A. E., & Summa, R. P. (1999). Perfil de alguns constituintes bioquímicos do sangue de éguas gestantes da raça Árabe. *Veterinária Notícias, Uberlândia*, 5(2), 83-88.
- Terqui, M., & Palmer, E. (1979). Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (27), 441-446.
- Thorburn, G. D. (1993). A speculative review of parturition in the mare. *Equine Veterinary Journal*, 25(S14), 41-49.
- Unanian, M. M., Silva, A. E. D. F., & Manzano, A. (1999). Estudo de parâmetros bioquímicos de éguas gestantes, Puro Sangue Árabe. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42(1), 0-0.
- Vivrette, S. L., Kindahl, H., Munro, C. J., Roser, J. F., & Stabenfeldt, G. H. (2000). Oxytocin release and its relationship to dihydro-15-keto PGF. *Journal of reproduction and fertility*, 119, 347-357.

Zavy, J. T., Mayer, R., Vernon, M. W., Bazer, F. W., & Sharp, D. C. (1979). An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (27), 403-411.

REFERÊNCIAS

- ALLEN W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 121, p. 513-527. 2001.
- ALLEN W. R. et al. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. **Journal of Endocrinology**. v.172, p. 237-283. 2002.
- ALBREGTSEN, F. **Reflection, refraction, diffraction, and scattering**. 2008.
- BOLLWEIN H. et al. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**. v. 57, p. 2043–2094. 2002.
- BOLLWEIN H. et al. Transrectal Doppler sonography of uterine and umbilical blood flow during pregnancy in mares. **Theriogenology**. v. 61, p. 499-509. 2004.
- BRAGA JUNIOR, R. A. **Bio-speckle**: Desenvolvimento de uma tecnologia aplicada a análise de sementes. Ph.D. dissertation, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- BRIERS, J. D. Wavelength dependence of intensity fluctuations in laser speckle patterns from biological specimens. **Optics Communications**, v. 13, n. 3, p. 324-326, 1975.
- BRIERS, J. D. Speckle fluctuations and biomedical optics: implications and applications. **Optical Engineering**, v. 32, n. 2, p. 277-284, 1993.
- CAMPELO, S.C.A.J. **Perfil Bioquímico Sérico de Éguas Gestantes e Não Gestantes das Raças Brasileiro de Hipismo e Bretão**. Jaboticabal. 2008.
- CHANG, W. S. C. **Principles of lasers and optics**. Cambridge University Press, 2005.
- CHOI S. J.; ANDERSON G. B.; ROSER J. F. Production of free estrogens and estrogen conjugates by the preimplantation equine embryo. **Theriogenology**. v. 47, p. 457-523. 1997.
- DE PAIVA, Rodrigo. Reflexão da luz. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, n. 1, 2014.
- DE TRANSIÇÃO, MARCHADOR DURANTE O PERÍODO. **MICHELINE OZANA DA SILVA**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.
- DIAZ GONZALEZ, F. H.; SCHEFFER, J. L. F. S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. **Simpósio de Patologia Clínica Veterinária** (1.; 2003, Porto Alegre), 2003.
- EVANS M. J.; IRVINE C. H. G. Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. **J Repord Fertil Suppl**, v. 23, p. 193-200, 1975.
- EXNER, K. Sitzungsbericht Kaiserl. **Acad. Wiss.(Wien)**, v. 76, p. 522, 1877.
- GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare**, 2nd edn. Cross Plains, WI: Equiservices, 1992.

GONZALES, D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p. 37. 2006.

GONZÁLEZ, F.H.D., SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: Gonzáles, F.H.D., Campos R. (eds.): **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.73-89. 2003.

HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução masculina. **B. Reprodução animal**. 7ª ed. Barueri: Manole, p. 3-12, 2004.

HARVEY, J.W.; PATE, M.G.; KIVIPELTO, J. et al. Clinical biochemistry of pregnant and nursing mares. **Veterinary Clinical Patholog**, v. 34, n. 3, p.248-254, 2005.

KANECO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. **San Diego: Academic Press**, p. 932, 1997.

KLONISH T.; HOMBACH-KLONISCH S. Review: relaxin expression at the feto-maternal interface. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 35, p. 149-201. 2000.

LUCENA, D. J. F. de, **Fermenta para Cálculo de Descritores de Textura a partir de um volume de Speckle**. 2012.

LUCENA, D. J. F. de et al. Caracterização da atividade biológica usando análise de textura em speckles (2012).

MAFRA, R. F.; PORTO, I. C. C. M. Uso do laser de baixa intensidade na hipersensibilidade dentária. **Odontol. clín.-cient**, v. 7, n. 1, p. 25-28, 2008.

MATTA, M. P. **Avaliação dos Parâmetros de Gestação de Éguas da Raça Mangalarga Marchador**. Viçosa. 2013.

McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 2011.

MEIRELLES M. G.; ALONSO M. A.; AFFONSO F. J. Endocrinologia reprodutiva da égua gestante. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 316-325. 2017.

MITCHELL B. F.; FANG X.; WONG S. Oxytocin: a paracrine hormone in the regulation of parturition? **Rev Reprod**, v. 3, p. 113-122, 1998.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o laboratório: Princípios e interpretação**. 4. ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau. p. 419. 2003.

NASCIMENTO, A. L. do et al. Desenvolvimento de um modelo para o biospeckle na análise de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciênc. Agrotec**, v. 31, n. 2, p. 456-61, 2007.

OULAMARA, A.; TRIBILLON, G.; DUVERNOY, J. Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle. **Journal of Modern Optics**, v. 36, n. 2, p. 165-179, 1989.

OUSEY, J. C. et al. Ontogeny of uteroplacental progesterone production in pregnant mares during the second half of gestation. **Biology Reproduction**, 2003.

OUSEY, J. C. Peripartal Endocrinology in the Mare and Foetus. **Reprod Domest Anim**, v. 39, p. 222-231, 2004.

PASEHN R. L.; ALLEN W. R. The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. **Journal Reproduction and Fertility Suppl.** v. 27, p. 499-509.1979.

PIRES, G. P.; TAGIAFERRI, A. A.; THAUMATURGO, C. Interferometria Óptica Para Ensaaios Não Destrutivos. **Revista Matéria, Rio de Janeiro**, v. 7, n. 1, p. 21, 2006.

PINHEIRO, A. L. B.; ALMEIDA, P. F.; SOARES, L. G. P. Princípios fundamentais dos lasers e suas aplicações. **Biotecnologia Aplicada à Agro & Indústria**, v. 4, p. 815-894, 2017.

PENTEADO, C.; VAZ, B. B. D.; LACERDA NETO, J. C. et al. Perfil de alguns constituintes bioquímicos do sangue de éguas gestantes da raça árabe. **Veterinária Notícias**. Uberlândia. v. 5, n. 2, p. 83-88, 1999.

RUSU, D. et al. Dynamic light scattering during shear: measurements of diffusion coefficients. **Polymer**, v. 40, n. 6, p. 1353-1357, 1999.

RABAL, H. J. et al. Laser na Agricultura, Automação e Instrumentação In: Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, 27, 1998, Poços de Caldas. **Anais... Lavras: SBEA**, p. 151-83, 1998.

SANTOS, F. M. F. D. Novos métodos de interferometria de speckle com lasers de impulso: aplicação ao estudo do comportamento dinâmico de estruturas. 2003.

SILVA, E. R. da. **Estudo das Propriedades do Biospeckle e suas Aplicações**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SILVA, F. F. R. Aplicabilidade da Técnica do Biospeckle Laser na Avaliação do Sangue Equino. 2017.

TERQUI M.; PALMER E. Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.** v. 27, p. 441-447. 1979.

THORBURN G. D. A speculative review of parturition in the mare. **Equine Veterinary Journal Suppl.** v. 14, p. 41-50. 1993.

UNANIAN, M. M.; SILVA, A. E. D. F.; MANZANO, A. Estudo de parâmetros bioquímicos de éguas gestantes Puro Sangue Arabe. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.42, n.1, 1999.

VIVRETTE S. L. et al. Oxytocin release and its relationship to dihydro-15-keto-PGF_{2a} and arginine vasopressin release during parturition and to suckling in postpartum mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 119, p. 347-357, 2000.

WILLEMSE, A. W.; MERKUS, H. G.; SCARLETT, B. Development of a heterodyne photon correlation spectroscopy measuring probe for highly concentrated dispersions. **Journal of colloid and interface science**, v. 204, n. 2, p. 247-255, 1998.

ZAVY, J. T. et al. An investigation of the uterine luminal environment of nonpregnant and pregnant pony mares. **Journal Reproduction and Fertility Suppl.** v. 27, p. 403-414. 1979.

ZILIO, S. C. **Optica moderna**. Instituto de Física de São Carlos. Universidade Federal de São Paulo. p. 320. 2009.

ANEXO

Sr. Westphalen Celso Westphalen Neto:

Thank you for submitting the manuscript, "BIOLOGICAL ACTIVITY USING DYNAMIC SPACKLE IN BLOOD SERUM OF MARES IN DIFFERENT REPRODUCTIVE STAGES" to Semina: Ciências Agrárias. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL:

<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/author/submission/37311>

Username: 06053169455

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

João Luis Garcia

Semina: Ciências Agrárias

Editor Chefe