

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DE BOTUCATU

**Aspectos morfológicos e funcionais do corpo lúteo bovino durante a
luteólise parcial e total**

Eduardo Trevisol

Botucatu

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DE BOTUCATU

**Aspectos morfológicos e funcionais do corpo lúteo bovino durante a
luteólise parcial e total**

Eduardo Trevisol

Tese apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia Animal da
FMVZ – UNESP, Botucatu, para
a obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Botucatu

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Trevisol, Eduardo.

Aspectos morfológicos e funcionais do corpo lúteo bovino a durante luteólise parcial e total : características da luteólise parcial e total em bovinos / Eduardo Trevisol. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

Capes: 50504002

1. Corpo lúteo. 2. Progesterona. 3. Prostaglandinas. 4. Luteólise. 5. Ciclo estral.

Palavras-chave: Células luteais; Progesterona; Prostaglandina

Nome do Autor: Eduardo Trevisol

Título: Aspectos morfológicas e funcionais do corpo lúteo bovino durante luteólise parcial e total

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. João Carlos Pinheiro Ferreira

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu- SP

Prof^a. Eunice Oba

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu- SP

Prof^a. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu- SP

Prof. Anthony Cesar de Souza Castilho

Membro

Departamento de Farmacologia

IBB-UNESP-Botucatu- SP

Dr. Anibal Ballarotti do Nascimento

Membro

Departamento de Zootecnia

ESALQ – USP – Piracicaba – SP

Data da defesa: 02 de setembro de 2014.

Agradecimentos

A deus, por tudo;

Aos meus pais Antonio do Carmo Trevisol e Arlete Maria Campanha Trevisol, e minha irmã Fernanda Trevisol, pessoas simples que empenharam sua vida na minha formação e deram muita força, apoio e incentivo para realizar este projeto, também pela exaustiva dedicação em minha educação, pelos exemplos que me deram e pelo amor com que sempre contei.

À Camila Ackermann uma pessoa especial que conheci durante o desenvolvimento do mestrado e continuamos juntos por todo o período do doutorado. Companheira que me trouxe muita paz e alegria durante esse período

Agradeço ao Prof. João C.P. Ferreira que acreditou no meu trabalho e depositou toda confiança. Por toda a sua amizade, companheirismo, receptividade, muita paciência e incentivo. Pelas excelentes conversas e discussões que me proporcionaram excelentes ensinamentos. Por toda a sabedoria, ensinamento e dedicação ao meu projeto, meu muito obrigado.

Às professoras do Departamento de Reprodução Animal, Maria Denise Lopes, Fernanda da Cruz Ladim Alvarenga, Eunice Oba e Fabiana F. de Souza e aos professores Sony Dimas Bicudo, Frederico Ozanan Papa, Nereu Carlos Preste, Cezinande Meira e Marco Antonio Alvarenga pelos ensinamentos durante todo o período.

Ao Prof. Dr. Milo C. Wiltbank que me concedeu a oportunidade de realização do estágio de pesquisa no exterior em seu laboratório (Universidade de Wisconsin – Madison, Wisconsin – USA). Por toda a confiança e os ensinamentos nas reuniões e até mesmo em conversas particulares, possibilitando um enorme crescimento científico, cultural, e pessoal. Agradeço, principalmente pela colaboração em nossos experimentos.

Ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, em especial ao laboratório de reprodução animal, o qual cedeu os animais, funcionários e equipamentos laboratoriais necessários para a realização do experimento a campo. Ao estagiário Wander Lacerda Junior que me ajudou nas coletas de dados noturnas.

Aos amigos de laboratório Julian, Carol, Henry, Rodrigo, Ian, Milena, Camila e Carla, aos colegas de laboratório no exterior Giovanni, Alvaro, Rafael, Alexandre e Paulo.

Aos amigos de Botucatu Leandro (Lemão), André, Rodrigo (Ruffles), Carlos Renato, Jair, Gabriel, Leandro, Priscila, Paulinha, Carmen, Guta, os Baianos, amigos do laboratório da prof^a. Renne e os residentes pelo convívio durante esse período.

Ao curso de Biotecnologia Animal da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

A todos os funcionários da Pós-graduação da FMVZ-UNESP e do Departamento de Reprodução Animal por toda sua receptividade, prontidão e eficiência.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Campus Botucatu.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (Bolsa de Doutorado: 2011/020449-7; Bolsa BEPE: 2013/17801-6) que possibilitou a elaboração desta tese.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1: Modelo representativo do delineamento experimental. Iniciando com a sincronização da ovulação; Dia -9 (D-9 - início do protocolo): aplicação de GnRH e colocação de dispositivo intravaginal de P4; D-2,5: aplicação de PGF_{2α}; D-2: aplicação de PGF_{2α} e retirada do dispositivo intravaginal de P4 e D0: aplicação de GnRH. A ovulação foi detectada entre 24 e 32 horas após ultimo GnRH. As coletas de sangue e imagens ultrassonográficas iniciaram no D6 e se estenderam a cada 8 horas por 48 horas. Duas biopsias luteais foram coletadas com 24 e 40 horas após os tratamentos..... 41

FIGURA 2: Média e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) após três diferentes tratamentos no D6 do ciclo estral: Controle (2 mL, salina, i.m.; n=10), 2XPGF (Luteólise – duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.; n=8) ou 1/6PGF (Luteólise Parcial – 83,3 µg de cloprostenol sódico, i.m.; n=10). As diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) a partir do momento 0 são indicados pelo asterisco (*) e entres tratamento (T), momento (H) e interação tratamento – momento (TH) estão demonstradas..... 47

FIGURA 3: Média e erro padrão do volume luteal (cm³) após três diferentes tratamentos no D6 do ciclo estral: Controle (2 mL, salina, i.m.; n=10), 2XPGF (Luteólise – duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.; n=8) ou 1/6PGF (Luteólise Parcial – 83,3 µg de cloprostenol sódico, i.m.; n=10). As diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) a partir do momento 0 são indicados pelo asterisco (*) e entres tratamento (T), momento (H) e interação tratamento – momento (TH) estão demonstradas..... 48

FIGURA 4: Média e erro padrão da área das células luteais grandes (LLC - µm²) nos momentos 24 e 40 após três diferentes tratamentos no D6 do ciclo estral; Controle (2 mL, salina, i.m.), 2XPGF (Luteólise – duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.) ou 1/6PGF (Luteólise Parcial – 83,3 µg de clorprostenol sódico, i.m.). As diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) entre tratamentos ou momentos são indicados pelo asterisco (*)..... 49

FIGURA 5: Imagens fotográficas representativas dos resultados da imunoistoquímica para StAR (proteína reguladora aguda esteroidogénica), COX-2 (ciclo-oxigenase 2) e PGDH (15- hidrox-prostaglandina desidrogenase), no corpo lúteo bovino nos momentos 24 e 40 horas após tratamento com 1/6PGF (83.3 µg de clorprostenol sódico, i.m.), Controle (2 mL, salina, i.m.), 2XPGF (duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.). As imagens foram capturadas no aumento de 400X, e as barras em preto representa o tamanho de 50 µm. Setas em amarelo indicam as células luteais grandes e as setas em vermelho indicam as células luteais pequenas..... 50

FIGURA 6: Imagens fotográficas representativas dos resultados da imunoistoquímica para FAS e FAS-Ligante nas células do corpo lúteo bovino nos momentos 24 e 40 horas após tratamento com 1/6PGF (83.3 µg de clorprostenol sódico, i.m.), Controle (2 mL, salina, i.m.), 2XPGF (duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.). As imagens foram capturadas no aumento de 400X, e as barras em preto representa o tamanho de 50 µm..... 51

CAPÍTULO II

FIGURA 1: Modelo representativo do delineamento experimental. Iniciando com a sincronização da ovulação; Dia -9 (D-9 - início do protocolo): aplicação de GnRH e colocação de dispositivo intravaginal de P4; D-2,5: aplicação de PGF_{2α}; D-2: aplicação de PGF_{2α} e retirada do dispositivo intravaginal de P4 e D0: aplicação de GnRH. A ovulação foi detectada entre 24 e 32 horas após ultimo GnRH. As coletas de sangue e imagens ultrassonográficas iniciaram no D7 e D12 e se estenderam a cada 8 horas por 48 horas. Duas biopsias foram coletadas, sendo uma antes dos tratamentos e outra com 18 após..... 67

FIGURA 2: Medias e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) após três diferentes tratamentos no D7 do ciclo estral: Controle (2 mL, salina, i.m.; n=6), 2XPGF (Luteólise – duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.; n=5) ou 1/6PGF (Luteólise Parcial – 83,3 µg de clorprostenol sódico, i.m.; n=5). As diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) a partir do momento 0 são

indicados pelo asterisco (*) e entres tratamento (T), momento (H) e interação tratamento – momento (TH) estão demonstradas..... 71

FIGURA 3: Medias e erro padrão dos volumes luteais (cm³) após três diferentes tratamentos no D7 do ciclo estral: Controle (2 mL, salina, i.m.; n=6), 2XPGF (Luteólise – duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.; n=5) ou 1/6PGF (Luteólise Parcial – 83,3 µg de clorprostenol sódico, i.m.; n=5). As diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) a partir do momento 0 são indicados pelo asterisco (*) e entres tratamento (T), momento (H) e interação tratamento – momento (TH) estão demonstradas..... 72

FIGURA 4: Medias e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) após três diferentes tratamentos no D12 do ciclo estral: Controle (2 mL, salina, i.m.; n=6), 2XPGF (Luteólise – duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.; n=6) ou 1/6PGF (Luteólise Parcial – 83,3 µg de clorprostenol sódico, i.m.; n=6). As diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) a partir do momento 0 são indicados pelo asterisco (*) e entres tratamento (T), momento (H) e interação tratamento – momento (TH) estão demonstradas..... 73

FIGURA 5: Medias e erro padrão dos volumes luteais (cm³) após três diferentes tratamentos no D12 do ciclo estral: Controle (2 mL, salina, i.m.; n=6), 2XPGF (Luteólise – duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.; n=6) ou 1/6PGF (Luteólise Parcial – 83.3 µg de clorprostenol sódico, i.m.; n=6). As diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) a partir do momento 0 são indicados pelo asterisco (*) e entres tratamento (T), momento (H) e interação tratamento – momento (TH) estão demonstradas..... 73

FIGURA 6: Imagens fotográficas representativas dos resultados da marcação imunoistoquímica para StAR (proteína reguladora aguda esteroidogénicas) e COX-2 (ciclo-oxigenase 2) no corpo lúteo bovino do dia 7 e 12, 18 horas após tratamento com; 1/6PGF (83.3 µg de clorprostenol sódico, i.m.), Controle (2 mL, salina, i.m.), 2XPGF (duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.). As imagens foram capturadas no aumento de 400X, e as barras em preto representa o tamanho de 50 µm..... 75

FIGURA 7: Imagens fotográficas representativas dos resultados da marcação imunoistoquímica para FAS e FAS-Ligante nas células do corpo lúteo bovino no dia 7 e 12 do ciclo estral, 18 horas após tratamento com 1/6PGF (83.3 µg de clorprostenol sódico, i.m.), Controle (2 mL, salina, i.m.), 2XPGF (duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.). As imagens foram capturadas no aumento de 400X, e as barras em preto representa o tamanho de 50 µm..... 76

CONSIDERAÇÕES FINAIS

FIGURA 1: Esquema representativo da ação de sub-dose de cloprostenol sódico no corpo lúteo em desenvolvimento e estabilizado. Em ambas as fases notamos o aumento de Ciclo-oxigenase 2 (COX-2), FAS e FAS-L, com isso acreditamos haver um aumento intraluteal de PGF2α e fatores imunológicos. Contudo, a diferença entre as fases está relacionada a intensa expressão no CL estabilizado de cada fator e principalmente o aumento da expressão de 15- hidroxiprostaglandin-desidrogenase (PGDH) na fase em desenvolvimento..... 86

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	16
OBJETIVO GERAL	17
HIPÓTESES	17
REVISÃO DE LITERATURA	14
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO I	36
CAPÍTULO II	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
ANEXOS	87

TREVISOL, E. **Aspectos morfológicos e funcionais do corpo lúteo bovino durante a luteólise parcial e total**. Botucatu, 2014. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi descrever as características do corpo lúteo (CL) durante a luteólise parcial, em diferentes dias do ciclo estral, após desafio com sub-dose de cloprostenol sódico. Para tanto foram realizados dois experimentos que foram descritos em dois artigos. No artigo I, 32 vacas foram submetidas à sincronização da ovulação (Ovsynch + P4), sendo dessas, 28 ovularam entre 24 e 32 horas (h) após último GnRH (Dia 0) do protocolo. No D6 as vacas foram divididas aleatoriamente em três tratamentos (momento 0h): Controle (2 mL, salina, i.m.; n=10), 2XPGF (duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.; n=8) ou 1/6PGF (83,3 µg de cloprostenol sódico, i.m.; n=10). Amostras de sangue e volume luteal, foram coletadas antes dos tratamentos e a cada 8 h durante às 48 h de observações. Também foram coletadas duas biopsias de CL nos momentos 24 e 40 h pós-tratamento. Valores com $P < 0,05$ foram considerados diferentes estatisticamente. Nos animais do tratamento 2XPGF, a diminuição da concentração plasmática de progesterona (P4) foi observada a partir de 16 h permaneceu diminuindo até 48 h pós-tratamento. No tratamento 1/6PGF foi observada a luteólise parcial, caracterizada pelas menores concentrações da P4 no momento 16 h seguido do aumento de nos momentos seguintes. As marcações de COX-2 e PGDH foram intensas nos momentos 24 e 40 h, porém a marcação para StAR foi intensa somente no momento 40 h. Ainda no tratamento 1/6PGF o volume luteal também diminuiu com 24 h e esse momento foi caracterizado pela menor área das células luteais grandes (LLC), comparada com o Controle, também algumas células positivas para a marcação de FAS e FAS-L. Nos momentos seguintes o volume luteal aumentou assim como a área das células tiveram tendência em aumentar. No artigo II, 39 vacas foram divididas em dois grupos e submetidas a sincronização da ovulação (Ovsynch + P4), sendo dessas vacas, 34 ovularam entre 24 e 32 h após último GnRH (Dia 0) do protocolo. Os animais utilizados no D7 e D12 foram sincronizados de modo que as coletas de dados fossem no mesmo dia. Com isso cada dia do ciclo foi submetido aos três tratamentos, iguais aos descritos no artigo I; D7 (2XPGF, n=5; 1/6PGF, n=5; Controle, n=6) e D12 (2XPGF, n=6; 1/6PGF, n=6; Controle, n=6). Amostras de sangue e volume luteal, foram coletadas antes dos tratamentos e a cada 8 h durante às 48 h de observações. Também foram coletadas duas biopsias de CL nos momentos 0 e 18 h pós-tratamento. Valores com

$P < 0,05$ foram considerados diferentes estatisticamente. Não foram observadas alterações na concentração de P4 após o tratamento 1/6PGF no D7, contudo, no D12 a P4 diminuiu progressivamente a partir de 16h até o último momento (48 horas). A concentração de P4 e marcações para StAR diminuíram no tratamento 2XPGF em ambos os dias D7 e D12 após 18 horas e a P4 permaneceu baixa nas demais observações. O tratamento 1/6PGF diminuiu a P4 apenas no D12, porém as marcações de StAR ocorreu nos dois dias no momento 18 h. As marcações de COX-2 esteve presente em todos CL tratados com $\text{PGF}_{2\alpha}$ porém com maior intensidade no tratamento 2XPGF. Conclui-se que durante a luteólise parcial a uma diminuição da P4, StAR, volume luteal e área das células luteais grandes e aumento de COX-2 e PGDH. Durante a luteólise total os aumentos e diminuições citados anteriormente são mais intensos, porém o PGDH intraluteal não se altera.

Palavras – chave: Prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$, progesterona, volume luteal, células luteais grandes, imunoistoquímica.

TREVISOL, E. **Functional and morphological changes in bovine corpus luteum during full and parcial luteolysis and luteal sensitivity feature to low dose of Cloprostenol sodium during estrous cycle.** Botucatu, 2014 Tese (doutorado) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo State University.

ABSTRACT

We aimed describe the CL characteristics during partial luteolysis, in different days of estrous cycle, after cloprostenol sodium low-dose challenge. Therefore, two projects were conduct and describe in two articles. In the first article, 32 cows were submitted to ovulation synchronization (Ovsunch +P4), 28 cows ovulated between 24 and 32 hours (h) after last GnRH (Day 0) of ovulation synchronization protocol, and were used in the project. At D6, cows were randomly divided in three treatments (moment 0): Control (2 mL of saline 0.9%; IM, n=10), 2XPGF (two doses of 500 µg of cloprostenol sodium with 2 hours interval, n=8) and 1/6PGF (83.33 µg of cloprostenol sodium, IM, n=10). Blood samples and luteal volume were collect before treatments and every 8 h, during 48 h of observations. We also collect two CL biopsies at 24 and 40 h post-treatments. The data was considered statically different when $P < 0.05$. Animals from 2XPGF had progesterone concentration (P4) decreased 16 h after treatment and it remain low until 48 h after treatment. In 1/6PGF, we observe a partial luteolysis, with decrease on circulating P4 and luteal volume 16 h, after that, we observe an increase in the next moments. The COX-2 and PGDH staining were more intense at 24 and 40 h, however the staining for StAR was intense only on 40 h moment. Still in 1/6PGF treatment, the luteal volume also decrease after 24 h and this moment was characterized by large luteal cells (LLC) minor area than Control, also some positive cell for FAS and FAS-L staining. In the next moments, luteal volume increase as well as cell area tend increase. In the second article, 39 cows were submitted to ovulation protocol (last GnRH = D0), 34 ovulated between 24 and 32 h after GnRH of protocol. The cows were synchronized in a way that data collect were at the same day. Each estrous cycle day were submitted in the same 3 treatments described in Article I: D7 (n=5/2XPGF, n=5/1/6PGF e n=6/control) and D12 (n=6/each treatment). Blood samples and luteal volume were collect before treatments and every 8 h, during 48 h of observations. Two CL biopsys at 24 and 40 h post-treatments were collected. Data was considered statically different when $P < 0.05$. On D7 no change was observed in P4 and luteal volume during 48 hours after 1/6PGF treatment, however at D12 the P4 decrease after 16 h until last observation (48 h). P4 concentration and StAR staining diminish after 2XPGF treatment in both D7 and D18, after 18 h, remaining low

in all observations after that. Treatment 1/6PGF diminishes P4 concentrations only at D12, however StAR staining was observed in both days at 18h moment. The COX-2 was staining in all CL treated with PGF_{2α}, however with greater intensity in 2XPGF treatment. We concluded that during partial luteolysis a decrease on P4, StAR, luteal volume and LLC area, and increase in COX-2 and PGDH occurs. During full luteolysis the increases and decrease are greater, however no changes in intraluteal PGDH are observed.

Key words: Prostaglandin F_{2α}, progesterone, luteal volume, large luteal cells, immunohistochemistry.

Introdução

INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos bovinos do mundo, quase 209 milhões de cabeças (IBGE 2013). Apesar de termos o maior rebanho, o sistema de criação de bovinos no Brasil é uma das atividades agropecuárias menos rentável. Especialistas acreditam que isso se deve à falta de tecnologia aplicada no campo. Contudo, o país é um dos principais exportadores de carne bovina do mundo (Garcia, 2014), gerando uma necessidade constante do aperfeiçoamento das técnicas, como melhoramento genético, nutricional, sanitário e reprodutivo, a fim de se obter o máximo de produtividade em menor área.

O estudo de todos os fatores envolvidos no ciclo estral bovino é fundamental para otimizar o manejo reprodutivo. O ciclo tem duração média de 21 dias e o mesmo pode ser caracterizado em duas fases distintas, baseados nas oscilações hormonais. Uma fase é marcada pela alta concentração de estrógeno (fase estrogênica, próximo da ovulação) e outra pela progesterona (fase lútea). A fase lútea ocorre entre a ovulação e a regressão do corpo lúteo (CL), durando em média 17 dias (Sartori et al., 2004).

A regressão luteal é muito estudado em bovinos (Atli et al., 2012; Pate et al., 2012; Ginther et al., 2009). Na ausência de um embrião viável no corno uterino ipsilateral ao CL, ocorre a liberação de múltiplos pulsos de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF_{2\alpha}$), acarretando na regressão do CL (Kindahl et al., 1976; McCracken et al., 1999). Não existe um padrão definido para a frequência e amplitude de cada pulso de $PGF_{2\alpha}$, variando em cada animal, porém tipicamente ocorrem de 4 à 8 pulsos com intervalos de 6 à 14 horas (Silvia et al., 1991; Schams e Berisha, 2004). A luteólise funcional é caracterizada pelo rápido declínio das concentrações de $P4$ nas primeiras 8 a 12 horas após a secreção de $PGF_{2\alpha}$. A luteólise estrutural é identificada pela diminuição de tamanho e peso do CL em consequência da apoptose das células luteínicas (McCracken et al., 1999). As células imunes estão presentes no CL no momento da luteólise, e acredita-se ser uma mediadora da regressão estrutural, podendo também contribuir para a redução da capacidade esteroidogênicas (Pate et al., 2001).

Após as observações feitas na ação da $PGF_{2\alpha}$ no CL, a mesma começou a ser pesquisada e testada em toda fase luteal, consequentemente foi observada as diferentes respostas (Berardinelli e Adair, 1989). Além disso começou a ser empregado o fármaco (análogos ou $PGF_{2\alpha}$ natural) como ferramenta para regressão luteal, assim desenvolvendo

protocolos de sincronização da ovulação (Pursley et al., 1995). Além do uso nos protocolos, estudos envolvendo $\text{PGF}_{2\alpha}$ e CL são realizados com o intuito de melhorar a compreensão da fisiologia, tanto para luteólise (Atli et al., 2012) quanto para estabelecimento da prenhez (Antoniazzi et al., 2013).

A compreensão da fisiologia do CL é importante pelo envolvimento no ciclo reprodutivo. A composição e modificação celular que ocorrem durante a existência do CL, iniciando a partir do primeiro evento fisiológico após ovulação, até o estabelecimento da prenhez. Estudando cada etapa, podemos assim relacionar com fracasso de uma gestação, diminuir problemas de anestro pós-parto e outros distúrbios envolvidos com a secreção de progesterona (Wiltbank et al., 2012).

Objetivo geral

Caracterizar o corpo lúteo bovino, através da morfometria, marcações proteicas, concentrações hormonais e avaliações ultrassonográficas durante a luteólise parcial e total em diferentes dias do ciclo estral.

Hipóteses

- O corpo lúteo submetido a tratamentos com sub-dose de cloprostenol sódico terá luteólise parcial, caracterizado pelas oscilações de progesterona e volume luteal.
- As marcações protéicas para StAR proporcionarão um perfil concomitante com as oscilações de progesterona.
- As marcações proteicas para COX-2 serão intensas nos animais tratados com cloprostenol sódico, porém nos animais com luteólise parcial terão marcações para PGDH superior os animais com luteólise total.
- As células luteais em apoptose serão identificadas com as marcações de FAS e FAS-L com maior intensidade nos animais com luteólise total em comparação a parcial.
- A diminuição do volume luteal após tratamento com cloprostenol sódico será caracterizada em menor área das células luteais grandes.
- O corpo lúteo na fase estabilizada será mais sensível a ação da sub-dose de cloprostenol sódico em relação a fase em desenvolvimento.

Revisão de Literatura

REVISÃO DE LITERATURA

Corpo Lúteo

O CL é um órgão endócrino transitório formado pela ruptura do folículo ovulatório e sua função primária é a produção de progesterona (P4), responsável pela preparação do endométrio para implantação e manutenção da gestação (Wiltbank, 1994; Milvae et al., 1996; Milvae, 2000).

O CL apresenta períodos regulares de formação, funcionamento e luteólise marcados por intensas remodelações teciduais, caracterizadas pela proliferação, migração, diferenciação e morte celular. O CL possui populações heterogêneas de células com características morfofuncionais e bioquímicas distintas, classificadas como células esteroideogênicas e não-esteroideogênicas (revisado por Martin e Ferreira, 2009).

Na formação do CL estão presentes vários fatores responsáveis pela formação da nova rede de vascularização. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é importante fator de regulação da angiogênese com potente ação mitogênica nas células endoteliais; induz migração, diferenciação e proliferação destas células e participa também da maturação, estabilização e controle da permeabilidade dos vasos sanguíneos (Ferrara e Davis-Smyth, 1997; Neufeld, et al., 2000).

No CL bovino foram encontrados todos os componentes do sistema VEGF, tanto durante o ciclo estral quanto na prenhez. A concentração deste fator de crescimento é significativamente mais alta durante a fase lútea inicial, decrescendo durante as fases média e final, apresentando queda acentuada na fase de regressão do CL. Existem duas principais isoformas para o VEGF expressas no CL que são VEGF120 e VEGF164 (Berisha et al., 2000). A proteína VEGF é predominantemente encontrada nas células luteínicas, os receptores (VEGF-1 e VEGF-2) são encontrados nas células endoteliais, indicando que o VEGF deve agir na quimiotaxia das células endoteliais para a formação de novos vasos sanguíneos (Schams & Berisha, 2004).

O fator de crescimento fibroblástico (FGF) também é importante fator angiogênico que participa da transformação, diferenciação e proliferação celular. Baseado nos padrões de expressão dos receptores para FGF (FGFR; Reynolds et al. 2000), concluiu-se que os FGFs provavelmente não estão envolvidos somente na angiogênese luteal, que ocorre principalmente no início do ciclo estral, mas também participam dos mecanismos envolvidos na produção de progesterona e inibem a morte de vários tipos de células.

Dentre vários FGF encontrados em bovinos, o FGF-2 é o mais envolvido com função luteínica. Ele é expresso em maiores quantidades na fase de desenvolvimento do CL e menores quantidades na fase média, contudo, na fase final e de regressão observa-se o retorno da expressão a valores semelhantes aos encontrados na fase inicial. A expressão de FGF-2 no momento da luteólise induzida na fase luteal média (dia 8-10) verifica-se que a partir da aplicação de PGF_{2α} até 12 h após, ocorre um aumento progressivo e a partir das 12 h há uma queda nas concentrações, ficando similar ao grupo controle. (Neuvians et al. 2004)

Durante a regressão luteínica, quando inicialmente os microvasos luteais de diâmetros maiores são mantidos, nota-se nestes o aumento de FGFR (Reynolds et al., 2000). Esse fenômeno sugere que o FGF é importante durante o processo de luteólise por permitir a manutenção da circulação no CL em regressão.

As angiopoetinas (ANPT) 1 e 2 também estão envolvidas no desenvolvimento do CL. A ANPT-1 é necessária para manter e estabilizar os vasos sanguíneos, enquanto a ANPT-2 age como um antagonista para ANPT-1. A baixa relação ANPT-1/ANPT-2 desestabiliza os vasos sanguíneos, sendo um pré-requisito para a angiogênese, no início da fase luteal, e regressão do CL (Schams e Berisha, 2004). Na fase lútea média (8-12 dias após a ovulação) encontra-se a mesma proporção de ANPT -1 e -2, isso faz com que os vasos se mantenham estabilizados. Essa mesma proporção também é observada com 16 dias de prenhez na periferia do CL de vacas e em todo CL com 40 dias de gestação (Beindorff et al., 2010).

A angiotensina II (Ang II) é um potente vasoconstritor, sendo a mesma proveniente da conversão de angiotensina I pela enzima conversora de angiotensina (ACE) nas células endoteliais de CL bovino (Miyamoto, et al., 2005).

Dois tipos de receptores têm sido descritos para a angiotensina: os do tipo 1 e 2 (AT1R e AT2R; Miyamoto et al., 2009). Receptores de Ang II foram localizados nas células endoteliais aórticas de bovinos, indicando que as células endoteliais são o principal local de produção e ação da Ang II.

As expressões de Ang II são maiores no início da fase luteal do que na fase média, com isso a produção intraluteal de Ang II é mais ativa durante a fase inicial coincidindo com a alta atividade da angiogênese. A infusão de VEGF e FGF-2 estimulam a liberação de Ang II, PGF_{2α} e P4 no CL em desenvolvimento, sugerindo uma interação positiva entre fatores angiogênicos e vasoativos nessa fase do CL.

A Ang II também pode auxiliar tanto a esteroidogênese quanto a angiogênese durante o desenvolvimento do CL (Kobayashi et al., 2001). Contudo, a liberação de Ang II aumenta após a injeção de PGF_{2α} *in vivo* na fase média do CL, provocando a inibição da secreção de progesterona (Hayashi et al., 1999).

Populações celulares

Na maioria dos mamíferos as células luteais esteroidogênicas derivadas das células da granulosa são denominadas células luteais grandes (LLC- Large Luteal Cells) e as derivadas das células da teca, células luteais pequenas (SLC- Small Luteal Cells) (Alila e Hansel, 1984).

As SLC são caracterizadas por medirem menos que 20 µm, secretarem baixas quantidades de P4 e responderem à estimulação por LH aumentando essa secreção. As LLC medem mais de 20 µm, produzem altas quantidades de P4 e não são responsivas a estimulação pelo LH. Embora se saiba que os dois tipos celulares apresentam receptores para este hormônio, a partir de estudos realizados em ovinos, determinou-se que os receptores presentes nas LLC não são responsivos ao LH (Niswender, 2002; Rekawiecki, et al., 2005)

As células LLC e as SLC são distribuídas nas seguintes proporções ao longo do ciclo estral; entre os dias 3-5, 10-12, 15-18, 19-20, foram respectivamente de 1,6%, 5,1%, 4,5%, 2,2% para as LLC e de 98,3%, 95%, 95,4%, 97,7% para as SLC (Hansel et al., 1987).

Apesar das LLC originarem-se da camada granulosa, existe a hipótese que em estágios mais tardios do CL elas também sejam formadas a partir das SLC (Alila e Hansel, 1984; Hansel e Dowd, 1986). As modificações dinâmicas nas proporções das LLC e SLC sugerem que as células do CL sofrem diferenciação contínua e que as LLC bovinas representam o estágio final de diferenciação SLC (Farin et al., 1988).

No CL existem ainda células não esteroidogênicas, que compreendem diferentes tipos celulares, tais como as células endoteliais, os pericitos e os fibroblastos, que também desempenham importantes papéis na função do CL. Os fibroblastos classicamente estão associados aos componentes estruturais dos tecidos e produzem glicosaminoglicanas, colágenos e algumas citocinas. Os macrófagos também têm importante participação fagocítica na resposta imune que envolve a regressão do CL. As células do sistema vascular representam cerca de 50% das células que constituem o CL e ocupam um volume de 14% (Weber, et al., 1987).

Durante a formação do CL há o desenvolvimento de uma rede de capilares responsável pela vascularização. Ao longo da fase lútea há o aumento dessa vascularização acompanhando a dinâmica de aumento da secreção de progesterona. No início da luteólise nota-se a diminuição da irrigação do CL e da síntese de progesterona (Miyamoto et al., 2005).

Através de exames ultrassonográficos em modo Doppler é possível observar alterações do fluxo sanguíneo em tempo real no momento da luteólise. Essas alterações foram representadas por área colorida em imagem seccional no diâmetro máximo do CL e foram avaliadas na forma de um índice quantitativo das alterações do fluxo sanguíneo (Acosta et al., 2002). No momento da luteólise induzida ocorre um breve aumento do fluxo sanguíneo seguido de um decréscimo; essa dinâmica é acompanhada por modificações semelhantes da secreção de progesterona (Miyamoto et al., 2005). Estudos têm demonstrado que o aumento no fluxo sanguíneo inicial é devido à ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, seja ela administrada de forma sistêmica ou intrauterina (Ginther et al., 2007).

A diminuição do fluxo sanguíneo causa hipóxia no CL e esse fenômeno está diretamente envolvido na apoptose das células luteais e diminuição da síntese de progesterona do CL (Nishimura, et al., 2008).

Ginther et al. (2010a,b) define a luteólise em três fases, pré-luteólise, luteólise e pós-luteólise. A pré-luteólise é caracterizada por grandes oscilações de progesterona, entre 3 e 4 ng/mL, seja aumentando ou diminuindo, oscilações essas influenciadas pelos primeiros pulsos de PGFM. A luteólise é a fase em que a P4 diminui até as concentrações basais e ocorrem os últimos pulsos de PGFM. A pós-luteólise é quando a P4 se mantém nas concentrações basais por mais de 24 de observação.

Alterações nas primeiras 12 horas após liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$

Durante a fase luteal media, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimula a expressão mRNA para óxido nítrico (NO) sintetase endotelial e induzível (eNOS e iNOS, respectivamente), sendo esse fenômeno observado na área periférica do CL, enquanto que na área central esse efeito não ocorre (Shirasuna et al., 2008; Shirasuna et al., 2010b).

O aumento do fluxo sanguíneo periférico é um dos primeiros indicadores fisiológicos da ação do NO em resposta a $\text{PGF}_{2\alpha}$. Contudo, o NO não atua somente na luteólise funcional, mas também participa da regressão estrutural do CL, modificando a expressão de proteínas envolvidas com a apoptose (Shirasuna et al., 2010a; Shirasuna et al., 2010b).

Neuvians et al. (2004) estudando a expressão de FGF no momento da luteólise induzida em bovinos na fase luteal média (dia 8-10) verificaram que após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ocorreu um aumento progressivo da expressão de FGF-1 e -2 até 12 h; a partir desse momento houve diminuição, que retornaram aos valores iniciais. Contudo, nos microvasos luteais de maiores diâmetros os FGFRs são mantidos durante a regressão lútea (Reynolds et al., 2000).

A administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimula a expressão mRNA de ANPT-2, e diminui de mRNA de ANPT-1. A consequente elevação da ANPT-2 inibe a secreção luteínica de P4 e desestabiliza os vasos sanguíneos. O ambiente de baixa relação ANPT-1/ ANPT-2 promove a instabilidade dos microvasos e favorece a regressão do CL (Tanaka et al., 2004).

A endotelina -1 (EDN1) está envolvida na inibição da secreção de P4 em bovinos e ovinos. Hinckley e Milvae (2001) estudando o efeito do antagonista de EDN1 no CL observaram que após a administração intraluteal durante a fase lútea média, ocorreu a inibição do efeito luteolítico da $\text{PGF}_{2\alpha}$. Isto sugere que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimula a biosíntese de EDN1 e por sua vez aumenta a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em células luteais (Shirasuna et al., 2004).

Existe também uma relação entre a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, Ang II e EDN1 durante a luteólise em bovinos. Estas substâncias vasoativas parecem interagir umas com as outras em retroalimentação positiva local, para gerar mais secreções de si mesmo e agir na regressão do CL, acelerando a luteólise (Shirasuna et al., 2004).

Este parece ser um importante mecanismo regulador da luteólise, pois o IGF-1 luteínico diminui trinta minutos após a administração intrauterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$ mantendo-se em baixas concentrações até 64 horas. Ao mesmo tempo a expressão mRNA para proteína ligante de IGF (IGFBP-1) aumenta após 2 horas e se mantém alta até 24 horas após a $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Berisha et al., 2010).

Para aprofundar o conhecimento da luteólise e chegar o mais próximo possível do natural, Atli et al. (2012) administraram 4 doses de 0,5mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ intrauterina com intervalos de 6 h. Observou-se que a expressão gênica de animais que tiveram luteólise se definiram nas primeiras 12 horas. Genes relacionados a secreção de progesterona e angiogênese diminuíram a expressão e genes ligados a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumentaram. Nesse mesmo trabalho concluiu-se ser necessário 4 pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ para a indução da luteólise completa.

Alterações após 12 horas da liberação de PGF_{2α}

As rápidas alterações observadas no padrão de secreção de P4 durante a luteólise não são acompanhadas de modificações estruturais do CL. Através de exames ultrassonográficos é possível observar alterações no diâmetro do CL apenas 12 horas após o início da liberação de PGF_{2α} (Acosta e Miyamoto, 2004).

Quando a expressão de VEGF, VEGF-R1 e VEGF-R2 foram analisadas durante a luteólise induzida na fase luteal média (dia 8-10), notou-se declínio progressivo desses fatores 12 horas após a aplicação de PGF_{2α}, demonstrando que o sistema VEGF tem participação na regressão estrutural do CL (Neuvians, et al., 2004).

Estudos têm demonstrado o envolvimento do NO com apoptose de células luteais. O NO intensifica a expressão para fatores apoptóticos durante a regressão luteal, foi o que demonstraram Korzekwa et al. (2006). Após a administração de NO ocorreu um aumento na expressão de Fas, Bax e caspase 3.

A caspase 3 é expressa durante toda fase luteal e encontra-se em maiores quantidades no D10 do ciclo estral (Martin, 2009). Com isso cria a hipótese de que o CL já se desenvolva com os fatores necessários para a regressão, porém necessita de um estímulo para que ocorra a luteólise e no caso de vacas prenhes, possivelmente, exista algum mecanismo que interrompa ou proteja a ação de fatores apoptóticos.

Luteólise parcial

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de avaliar a utilização de doses reduzidas de cloprostenol (análogo de prostaglandina F_{2α}), aplicado por via intramuscular (IM) ou intra-vulvosubmucosa (IVSM), para a indução da luteólise em bovinos (Chacur et al., 2005; Gioso et al., 2005).

O primeiro autor a citar a expressão “luteólise parcial” foi Stellflug et al., 1977, quando se referiu a dinâmica da progesterona em novilhas submetidas a administrações de diferentes doses de PGF_{2α}. As concentrações de progesterona ao longo das 108 horas de observação, após tratamentos, que não permaneceram abaixo de 1,0 ng/mL, foram consideradas como luteólise parcial, ou seja, animais que não tiveram regressão total do CL.

Estudos feitos por Meira et al. (2006) com vacas Nelore utilizando doses reduzidas de luprostiol, 100%, 50%, 25% ou 10% da dose convencional recomendada (15 mg/vaca), verificaram que vários animais dos grupos que receberam 50 ou 25% da dose

convencional apresentaram luteólise parcial, definidas nas concentrações plasmáticas da P4. E esses animais apresentaram diminuição até valores próximos de 1,0 ng/ml, 24 horas após a administração do luprostiol, e em seguida, 48 horas após a indução da luteólise, voltaram a valores semelhantes aos verificados antes dos tratamentos.

Do mesmo modo, Ginther et al. (2009) administrando várias doses de dinoprost trometamina no 9º ou 10º dia pós-ovulação, por via intravenosa ou intrauterina, observaram, em novilhas holandesas tratadas com sub-doses de PGF_{2α} (0,5 mg e 1,0 mg), a diminuição inicial da concentração plasmática de P4, nas primeiras 6- 12 horas, seguida do aumento dos valores a níveis semelhantes aos observados antes dos tratamentos. Shrestha et al. (2010) observaram esse fenômeno um pouco mais tarde, entre 8 e 24 horas após administração de sub-dose.

Uma retomada nas concentrações de P4 também é notada entre 2 ou 3 horas após tratamento com única administração de PGF_{2α} ou análogos, isso quando utilizada sub-dose (0,25 ou 1,0 mg) induzindo a luteólise parcial. A retomada da P4 também é observada na dose de 4,0 mg, porém a P4 se mantém alta por apenas 1 hora e em seguida volta a declinar e a luteólise se completa (Shrestha et al., 2010).

Trevisol et al. (2012) administrando 1/6 da dose convencional observou a diminuição da concentração plasmática de P4 nas primeiras 16 horas com posterior recuperação nos momentos seguintes, e 48 horas após administração observou-se concentrações semelhantes às iniciais. Dados não publicados demonstraram uma tendência no aumento da pulsatilidade de LH entre 12 e 20 horas após administração de sub-dose. Possivelmente o aumento do LH que está envolvido com o resgate da síntese de P4.

Vacas em que não se observa luteólise após baixas doses de PGF_{2α} apresentaram expressões gênicas semelhantes a vacas controle, principalmente de genes ligados ao sistema imune e angiogênicos, contudo, genes ligados a esteroideogênese (ex: StAR) acompanham as oscilações das concentrações plasmáticas de progesterona (Atli et al., 2012)

Prostaglandina F_{2α}

Nos bovinos, entre os dias 15 e 17 do ciclo estral, período crítico do início da luteólise, ocorre importante aumento da secreção endometrial de PGF_{2α} na ausência de um embrião viável (Tanikawa et al., 2005).

A luteólise é desencadeada pelo aumento da amplitude dos pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Inicialmente observa-se picos (2-3) de secreção que elevam a concentração plasmática de PGFM (metabólito da $\text{PGF}_{2\alpha}$) a valores $> 100\text{-}125\text{ pg/mL}$. Subsequentemente, há um grande aumento da magnitude do pulso e a PGFM alcança valores em torno de 550 pg/mL . Com isso a P4 começa a diminuir e 12 horas após esse grande pico de PGFM, as concentrações encontram-se menores que 1 ng/mL . Durante o período de declínio dos hormônios continuam acontecendo pulsos de secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, contudo a amplitude dos mesmos diminui progressivamente. Os pulsos sequenciais acontecem a cada 9-12 horas, duram em média 4 horas e o processo todo tem duração aproximada de 30 horas (Miyamoto et al., 2005; Ginther et al., 2007; Ginther et al., 2010b).

A administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em ovelhas e novilhas na fase média do ciclo estral causa, de 4 a 12 horas após sua administração, diminuição significativa no mRNA luteínico da proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR), responsável pelo transporte de colesterol citoplasmático para o interior da mitocôndria (Waite et al., 2005).

Uma única dose luteolítica administrada via intramuscular, intra-vulvar ou intraluteal de $\text{PGF}_{2\alpha}$, causa inicialmente um aumento da P4. Os estudos têm demonstrado que nos primeiros 5 minutos após a administração nota-se um aumento, porém com 36 horas as concentrações de P4 voltam a diminuir chegando a menos de $1,0\text{ ng/mL}$. O aumento da P4 no início da luteólise não é detectado quando são simulados pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (infusões intrauterina de $0,5\text{ mg}$ de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante 2 horas), e múltiplos pulsos são necessários para obter completa luteólise (Ginther et al., 2009; Miyamoto, et al., 2009).

Alguns estudos relatam as características do CL após ação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em diferentes fases do ciclo estral (revisado por Miyamoto et al., 2009) e com isso as diferentes respostas da $\text{PG}_{2\alpha}\text{ F}$, com o intuito de explicar o motivo pelo qual o CL é responsivo ou não a $\text{PGF}_{2\alpha}$. Estudos com transcriptoma deram um passo muito grande para decifrar o paradigma. Mondal et al. (2011) e Zalman et al. (2012) através de micro-arranjos analisaram a resposta da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 4 (refratário) e 11 (responsível) do ciclo estral. Observaram que no D11 a $\text{PGF}_{2\alpha}$ induz ao aumento muito maior no número de genes em comparação ao D4. Outra observação, foi que os genes estimulados no D4 nas primeiras 4 horas pós-tratamento, não permaneceram estimulados quando observados após 24 horas, ocorrendo uma falha na auto-amplificação. Os mecanismos responsáveis pelo aumento persistente de genes estimulados $\text{PGF}_{2\alpha}$ relacionadas ao sistema imunológico, observado no dia 11 (entre 4 e 24 horas), mas não no dia 4 (no mesmo momento), pode

possivelmente, ser atribuída à conexão extracelular reforçada entre células do sistema imunológico e outras populações de células do CL responsivo (Mondal et al., 2011).

Existem diversos análogos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que são utilizados como indutor da luteólise, como por exemplo o Cloprostenol sódico e o Luprostiol. As células luteais respondem de diferentes maneiras a ação desses análogos ou mesmo quando comparado com $\text{PGF}_{2\alpha}$ natural (dinoprost). Os análogos induzem um maior influxo de cálcio intracelular, apoptose e contractilidade da artéria ovariana em comparação a natural. Quando comparado entre os análogos, o Luprostiol apresentou melhor efeito nas características anteriormente citadas, do que o cloprostenol sódico (Korzekwa et al., 2014).

Por outro lado, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode ter sua liberação interrompida pela presença do embrião. Por volta do 12º dia pós-ovulação, quando o embrião se alonga, ocorre aumento nas concentrações de IFNt, o qual está diretamente ligado aos receptores de ocitocina (OXTR). A diminuição desses receptores é fundamental para o não desencadeamento da luteólise. Além disso, a presença do embrião no endométrio desencadeia secreções de citocinas e fatores de crescimento necessários para manter a prenhez (Robinson et al., 2008).

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.127-140, 2004.
- ACOSTA, T.J.; YOSHIKAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F_{2a} injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v.66, p.651–658, 2002.
- ALILA, H.W.; HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. **Biology of Reproduction**, v.31, p.1015-1025, 1984.
- ANTONIAZZI, A.Q., WEBB, B.T., ROMERO, J.J., ASHLEY, R.L., SMIRNOVA, N.P., HENKES, L.E., BOTT, R.C., OLIVEIRA, J.F., NISWENDER, G.D., BAZER, F.W., HANSEN, T.R. Endocrine delivery of interferon tau protects the corpus luteum from prostaglandin f₂ alpha-induced luteolysis in ewes. **Biology of Reproduction**, 88, 1-12, 2013.

- ATLI, M., BENDER, R.W., MEHTA, V., BASTOS, M., LUO, W., VEZINA, C.M., WILTBANK, M.C. Patterns of gene expression. In the bovine corpus luteum following repeated intra-uterine infusions of low doses of prostaglandin F2 α . **Biol. Reprod.** **86**, 1-13, 2012.
- BEINDORFF, N.; NAGAI, K.; SHIRASUNA, K.; HERZOG, K.; HOFFMANN, K.; SASAKI, M.; BOLLWEIN, H.; MIYAMOTO, A. Vascular changes in the corpus luteum during early pregnancy in the cow. **Journal of reproduction and Development**, v.56, p.263-270, 2010.
- BERARDINELLI, J.G., ADAIR, R. Effect of prostaglandin F2 α dosage and stage of estrous cycle on the estrus response and corpus luteum function in beef heifers. **Theriogenology** 32, 301–314, 1989.
- BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.M.; EINSPIANIER, R. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptor, and localization in the bovine corpus luteum during estrus cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1106-1114, 2000.
- BERISHA, B.; MEYER, H.H.D.; SCHAMS, D. Effect of Prostaglandin F2 α on Local Luteotropic and Angiogenic Factors During Induced Functional Luteolysis in the Bovine Corpus Luteum. **Biology of Reproduction**, v.82, p.940-947, 2010.
- CHACUR, M.G.M.; MENEZEZ, C.M.; BARBOSA, L.J.; KRONKA, S.N. Eficiência da meia dose de cloprostenol na submucosa vulvar nas taxas de indução do estro e de prenhez em vacas “repeat-breeders” Nelore-Chianina. **Ciência Agrária**, v.26, p.387-394, 2005.
- CHECURA, C.M.; BEG, M.A.; PARRISH, J.J.; GINTHER, O.J. Functional relationships among intrafollicular insulin-like growth factor 1, circulating gonadotropins, and development of the dominant follicle in mares. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.270-278, 2010.
- COWLEY, M.A.; RAO, A.; WRIGHT, P.J.; LING, N.; MILLAR, R.P.; CLARKE, I.J. Evidence for differential regulation of multiple transcripts of the gonadotropin releasing hormone receptor in the ovine pituitary gland; effect of estrogen. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.146, p.141–149, 1998.
- CUPP, A.S.; STUMPF, T. T.; KOJIMA, F. N.; WERTH, L. A.; WOLFE, M. W.; ROBERSON, M. S.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Secretion of gonadotrophins change during the luteal phase of the bovine oestrous cycle in the absence of

- corresponding changes in progesterone or 17 β -oestradiol. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.109-119, 1995.
- FARIN, C.E.; MOELLER, C.L.; MAYAN, H.; GAMBONI, F.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. Effects of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on cell populations in the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.38, p.413-421, 1988.
- FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr Rev**; 18; 4-25; 1997.
- FIKE, K.E.; KOJIMA, F.N.; LINDSEY, B.R.; BERFELD, E.G.M.; QUINTAL-FRANCO, J.A.; MELVIN, E.J.; ZANELLA, E.L.; WEHRMAN, M.E.; KINDER, J.E. Regulation of frequency of luteinizing hormone pulses by magnitude of acute change in circulating concentration of progesterone of female cattle. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.279–291, 2004.
- GARCIA, M. Aspectos gerenciais e econômicos de um programa de inseminação artificial em bovinos de corte. Anais do 6º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada – Londrina, 2014.
- GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging and animal reproduction: Cattle, Ed. OJ Ginther. Cross Plains: **Equiservices Publishing**, 1998.
- GINTHER, O.J. Producing color-flow images. In Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography, Ed. OJ Ginther. Cross Plains: **Equiservices Publishing**, 2007.
- GINTHER, O.J.; SILVA, L.A.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Temporal Associations among Pulses of 13,14-Dihydro-15-keto-PGF₂ α , Luteal Blood Flow, and Luteolysis in Cattle. **Biology of Reproduction**, v.76, p.506–513, 2007.
- GINTHER, O.J.; SILVA, L.A.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Necessity of sequential pulses of prostaglandin F₂ α for complete physiologic luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, p.641-648, 2009.
- GINTHER, O.J.; FUENZALIDA, M.J.; SHREATHA, H.K.; BEG, M.A. Concomitance of luteinizing hormone and progesterone oscillations during the transition from preluteolysis to luteolysis in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, 2010a.
- GINTHER, O.J.; SHREATHA, H.K.; BEG, M.A. Circulating hormone concentration within a pulse of a metabolite of prostaglandin F₂ α during preluteolysis and early luteolysis in heifer. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.253-258, 2010b.

- GINTHER, O.J.; FUENZALIDA, M.J.; PUGLIESI, G.; HANNAN, M.A.; BEG, M.A. Effect of luteinizing hormone oscillations on progesterone concentrations based on treatment with a gonadotropin-releasing hormone antagonist in heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v.40, p.119-127, 2011.
- GIOSO, M. M.; COSTA, E.P.; FERNANDES, C.A.C; GUIMARAES, JOSE D.; CARVALHO, G.R. Perfil de progesterona e intervalo ao estro de receptoras bovinas sincronizadas com doses reduzidas de cloprostenol. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1181-1187, 2005.
- HANNAN, M.A. FUENZALIDA, M.J.; SIDDIQUI, M.A.R.; SHAMSUDDIN, M.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Diurnal variation in LH and temporal relationships between oscillations in LH and progesterone during the luteal phase in heifers. **Theriogenology**, v.74, p.1491–1498, 2010.
- HANSEL, W.; DOWD, J.P. New concepts of the control of corpus luteum function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.78, p. 755-768, 1986.
- HANSEL, W.; ALILA, H.W.; DOWD, J.P.; YANG, X. Control of steroidogenesis in small and large bovine luteal cells. **Aust. J. Biol. Sci.**, v.40, p.331-347, 1987.
- HAYASHI, K.; MIYAMOTO, A. Angiotensin II interacts prostaglandins F2 α and endothelin-1 as a local luteolytic factor in the bovine corpus luteum *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.60, p.1104-1109, 1999.
- HERBST, K.L.; ANAWALT, B.D.; AMORY, J.K.; BREMNER, W.J. Acyline: the first study in humans of a potent, new gonadotropin-releasing hormone antagonist. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, p.3215-3220, 2002.
- HINCKLEY, S.T.; MILVAE, R.A.; Endothelin-1 mediates prostaglandin F2 α -induced luteal regression in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1619-1623, 2001.
- HOUGHTON, P. L.; LEMENAGER, R. P.; MOSS, G. E.; AND HENDRIX, K. S. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1428-1427, 1990.
- IBGE, - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Séries Estatística e Séries Históricas, Brasília: IBGE. Disponível em: <<http://serieestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=PPM01&sv=59&t=efetivo-rebanhos-tipo-rebanho>> . Acesso em: 08 Julho. de 2014.
- JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; HOU, X.; DAVIS, J.S.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the

- corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, p.1272–1281, 2009.
- KINDAHL H, EDQVIST LE, GRANSTROM E, BANE A. Release of prostaglandin-F2alpha as reflected by 15-Keto-13,14-Dihydroprostaglandin F2alpha in peripheral-circulation during normal luteolysis in heifers. **Prostaglandins**. 11, 871-878. 1976.
- KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W.M.; SCHAMS, D. Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with a luteal angiogenic factors and prostaglandins F2 α . **Journal of Endocrinology**, v.170, p.369-380, 2001.
- KORZEKWA, A.J.; OJUDA, K.; WOCLAWEK-POTOCKA, I.; MURAKAMI, S.; SKARZYNSKI, D.J. Nitric oxide induces apoptosis in bovine luteal cells. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, p.353-361, 2006.
- KORZEKWA, A.L., LUKASIK, K., PILAWASKI, W., PIOTRAWSKA-TOMALA, K.K., JAROSZEWSKI, J.J., YOSHIOKA, S., OKUDA, K., SKARZYNSKI, D.J. Influence of prostaglandina F2 α analogues on the secretory function of bovine luteal cells and ovarian arterial contractility in vitro. *The Veterinary Journal*. 199, 131-137, 2014.
- LUO, W.; GUMEN, A.; HAUGHIAN, J.M.; WILTBANK, M.C. The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.84, p.369-378.
- MARTIN, I.; FERREIRA, J.C.P. Fisiologia da ovulação e formação do corpo lúteo bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, p.270-279, 2009.
- MARTINS, J.P.N.; POLICELLI, R.K.; NEUDER, L.M.; RAPHAEL, W.; PURSLEY, J.R. Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F2 α of ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.2815-2824, 2011.
- McCRACKEN JA, CUSTER EE, LAMSA JC. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. **Physiol Rev**, 79,.264-323, 1999.
- MEIRA, C.; PESSOA, V.M.; FERREIRA, J.C.P.; ARAUJO, G.H.; GIOSO, M.M.; BICUDO, S.D.; OBA, E.; ORLAND, C. Alternative low doses and routes of administering a prostaglandin F2 α analogue to induce luteolysis in Nelore cows. *Journal of Veterinary Science*, v.7, p.387-390, 2006.
- MILVAE, R.A.; HINCHLEY, S.T.; CARLSON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v.45, p.1327-1349, 1996.

- MILVAE, R. Inter-relationship between endothelin and prostaglandin F2alpha in corpus luteum function. **Reveiw of Reproduction**, v.5, p.1-5, 2000.
- MIYAMOTO, A. SHIRASUNA, K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B.; WATANABE, S.; HAYASHI, M.; YAMAMOTO, D.; MATSUI, M.; ACOSTA, T.J. Blood flow: a key regulatory components of corpus luteum function in cow. **Domestic Animal Endocrinology**., v.29, p.329-339, 2005.
- MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; SASAHARA, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: impact of angiogênico and vasoactive factor. **Domestic Animal Endocrinology**, v.37, p.159-169, 2009.
- MONDAL M, SCHILLING B, FOLGER J, STEIBEL JP, BUCHNICK H, ZALMAN Y, IRELAND JJ, MEIDAN R, SMITH GW. Deciphering the luteal transcriptome: potential mechanisms mediating stage-specific luteolytic response of the corpus luteum to prostaglandin F. *Physiol Genomics* 43, 447– 456, 2011.
- NEUFELD, G.; COHEN, T.; GENGRINOVITCH, S.; PLTORAK, Z. Vascular endothelial growth factor and its receptor. **The Faseb Journal**, v.13, p.9-22, 2000.
- NEUVIANS, T.P.; PFAFFL, M.W.; BERISHA, B.; SCHAMS, D.; The mRNA expression of the members of the IGF-system in bovine corpus luteum during induced luteolysis. **Domestical Animal Endocrinology**., v.25, p.359-372, 2003.
- NEUVIANS, T.P.; SCHAMS, D.; BERISHA, B.; PFAFFL, M.W. Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F2a-induced luteolysis in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**., v.70, p.473-480, 2004.
- NISHIMURA, R.; KOMIYAMA, J.; TASAKI, Y.; ACOSTA, T.J.; OKUDA, K. Hipoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum, **Biology of Reproduction**, v.78, p.529-536, 2008.
- NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYSON, M.K.; McINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v.80, p.1-29, 2000.
- NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. Review. **Reproduction**, v.123, p.333-9, 2002.
- PATE JL, LANDIS KEYES P. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? **Reproduction** 122: 665–676, 2001.

- PURSLEY JR, MEE MO, WILTBANK MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. **Theriogenology**. 44, 915–23, 1995.
- REKAWIECKI, R. NOWIK, M.; KOTWICA, J. Stimulatory effect of LH, PGE₂ and progesterone on Star protein, cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3 β hydroxysteroid dehydrogenase gene expression in bovine luteal cells. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v.78, p.169-184, 2005.
- REYNOLDS, L.P.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D. Angiogenesis in the corpus luteum, **Endocrine**, v.12, p.1-9, 2000.
- ROBINSON, R.S.; HAMMOND, A.J.; WATHES, D.C.; HUNTER, M.G.; MANN, G.E. Corpus luteum–endometrium–embryo interactions in the dairy cow: Underlying mechanisms and clinical relevance. **Reproduction in Domestic Animal**, v.43, p.104–112, 2008.
- ROCHA, J.C.M.C. TONHATI, H., ALENCAR, M.M., LOBO, R.B. Componentes de variância para o período de gestação em bovinos de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 57, 784-791, 2005.
- SARTORI, R., HAUGHIAN, J.M., SHAVER, R.D., ROSA, G.J.M., WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **J. Dairy Sci.** 87, 905-920, 2004.
- SCHAMS, D.; BERISHA, B.; Regulation of corpus luteum function in cattle-an overview. **Reproduction Domestic Animals**, v.39, p.241-251, 2004.
- SHIRASUNA, K.; ASAOKA, H.; ACOSTA, T.J.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B.; AHTANI, M.; HAYASHI, M.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Real-time relationship in intraluteal release among prostaglandin F2 α , endothelin-1, and angiotensin II during spontaneous luteolysis in the cow. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1706-1711, 2004.
- SHIRASUNA, K.; WATANABE, S.; ASAHI, T.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B.; SASAHARA, K.; JIANG, C.; MATSUI, M.; SASAKI, M.; SHIMIZU, T.; DAVIS, J.; MIYAMOTO, A. Prostaglandin F2 α increase endothelial nitric oxide synthase in the periphery of the bovine corpus luteum: the possible regulation of blood flow at an early stage of luteolysis. **Reproduction**, v.135, p.527-539, 2008.
- SHIRASUNA, K.; SASAHARA, K.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A. Prostaglandin F2 α differentially affects mRNA expression relating to angiogenesis, vasoactivation and prostaglandins in the early and mid corpus luteum in the cow. **Journal of Reproduction and Development**, v.56, p.428-436, 2010a.

- SHIRASUNA, K.; ASAH, T.; SASAKI, M.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A. Distribution of arteriolo-venous vessels, capillaries and eNOS expression in the bovine corpus luteum during the estrous cycles: a possible implication of different sensitivity by luteal phase to PGF 2α in the increase of luteal blood flow. **Journal of Reproduction and Development**, v.56, p.124-130, 2010b.
- SHRESTHA, H.K.; BEG, M.A.; SIDDIQUI, M.A.R.; GINTHER, O.J. Dynamic progesterone responses to simulation of a natural pulses of a metabolite of prostaglandin F 2α in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.118-123, 2010.
- SIANANGAMA, P.C.; RAJAMAHENDRAN, R. Effect of human chorionic gonadotropin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. **Theriogenology**, v.38, p.85-96, 1992.
- SILVIA WJ, LEWIS GS, MCCracken JA, THATCHER WW, WILSON L, JR. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F 2α during luteolysis in ruminants. **Biol Reprod**. 45, 655-663, 1991.
- TANAKA, J.; ACOSTA, T.J.; BERISHA, B.; TETSUKA, M.; MATSUI, M.; KOBAYASHI, S.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Relative change in mRNA expression of angiopoietins and receptors Tie in bovine corpus luteum during estrus cycle and prostaglandin F 2α -induced luteolysis: A possible mechanism for the initiation of the luteal regression. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, p.619-626, 2004
- TANIKAWA, M.; ACOSTA, T.J.; FUKUI, T.; MURAKAMI, S.; KORZEKWA, A.; SKARZYNSKI, D.J.; PIOTROWSHA, K.K.; PARK, C.K.; OKUDA, K Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin - 1 α in bovine endometrium during estrous cycle. **Prostaglandins & Other Lipid Mediator**., v.78, p.279-290, 2005.
- TREVISOL, E.; DESTRO, F.C.; FERREIRA, J.C.; MARQUES FILHO, W.C.; CAMARGOS, A.S.; ACKERMANN, C.L.; AMARAL, J.B.; FERREIRA, J.C.P. Morphological and physiological changes in bovine corpus luteum after challenges with low dose of prostaglandin F 2α analogue. Abstract in 17Th International Congress of Animal Reproduction, **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, 2012.
- WAITE, A.L.; HOLTEN, D.W.; STORMSHAK, F. Changes in bovine luteal progesterone metabolism in response to exogenous prostaglandin F 2α . **Domestic Animal Endocrinology**., v.28, p.162-171. 2005.

- WEBER, D.M.; FIELDS, P.A.; ROMRELL, L.J.; TUMWASORN, S.; BALL, B.A.; DROST, M.; FIELDS, M. Functional differences between small and large luteal cells of the late-pregnant vs. Nonpregnant cow. **Biology of Reproduction**, v.37, p.685-697, 1987.
- WILTBANK, M.C. Cell type and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. **Journal of Animal Science**. v.71, p.1873-1883, 1994.
- WILTBANK, M.C., SOUZA, A.H., CARVALHO, P.D., BANDER, R.W., NASCIMENTO, A.B. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. **Reprod. Fert. Devel.** 24; 238-243, 2012.
- ZALMAN Y, KLIPPER E, FARBEROV S, MONDAL M, WEE G, FOLGER JK, SMITH GW, MEIDAN R, Regulation of angiogenesis- related prostaglandin F2alpha-induced genes in the bovine corpus luteum. **Biol Reprod** 86, 92, 2012.

CAPÍTULO I

ASPECTOS MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS NO CORPO LÚTEO BOVINO APÓS DESAFIO COM SUB-DOSE DE CLOPROSTENOL SÓDICO

Este artigo será submetido ao periódico Animal Reproduction Science e encontra-se de acordo com as normais de submissão exigidas. Contudo, está sendo utilizado a língua portuguesa e as figuras estão entre os parágrafos dos resultados apenas para facilitar a leitura e discussão da tese.

Título: Alterações morfológicas e funcionais no corpo lúteo bovino após desafio com sub-dose de Cloprostenol sódico.

Autores: Eduardo Trevisol¹, Wander Lacerda Jr.², Camila L. Ackermann¹, Ian Martin¹, Rita M. L. Pires², Milo C. Wiltbank³, João C. P. Ferreira¹.

Filiações: 1 – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, São Paulo, Brasil. 2 – Instituto de Zootecnia, APTA – SAA, São Paulo, Brasil. 3 – Departamento de Zootecnia, Universidade de Wisconsin – Madison, Wisconsin, USA.

Resumo:

O objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações estruturais do CL bovino após tratamento com sub-dose de Cloprostenol sódico, caracterizando a luteólise parcial. Foram submetidas à sincronização da ovulação (Ovsynch + P4) 32 vacas primíparas da raça Caracu, sendo dessas, 28 ovularam entre 24 e 32 horas (h) após último GnRH (Dia 0) do protocolo. No D6 as vacas foram divididas aleatoriamente em três tratamentos (momento 0h): Controle (2 mL, salina, i.m.; n=10), 2XPGF (duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.; n=8) ou 1/6PGF (83,3 µg de cloprostenol sódico, i.m.; n=10). Amostras de sangue e volume luteal, foram coletadas antes dos tratamentos e a cada 8 h durante às 48 h de observações. Também foram coletadas duas biopsias de CL nos momentos 24 e 40 h pós-tratamentos. Valores com $P < 0,05$ foram considerados diferentes estatisticamente. Nos animais do tratamento 2XPGF, a diminuição da concentração plasmática de progesterona (P4) foi progressiva a partir de 16 h até 48 h pós-tratamento. No tratamento 1/6PGF foi observada a luteólise parcial, caracterizada pelas diminuições das concentrações da P4 até 16 h seguido do

aumento de nos demais momentos. As marcações de COX-2 e PGDH foram intensas nos momentos 24 e 40 h, porém no tratamento 2XPGF, foram poucas as marcações de PGDH. As marcações para FAS e FAS-L estiveram presente nas células luteais do tratamento com 1/6PGF e com maior intensidade no tratamento 2XPGF. Ainda no tratamento 1/6PGF o volume luteal diminuiu com 24 h e observou-se uma menor área das células luteais grandes (LLC), comparada com o Controle. Nos momentos seguintes o volume luteal aumentou assim como a área das células tiveram tendência em aumentar. Conclui-se que o CL desafiado com sub-dose tem características semelhantes ao CL desafiado com dose convencional, porém com menor intensidade e principalmente com a capacidade de metabolizar a PGF sintetizada.

Palavras chave: luteólise, prostaglandina F2 α , células luteais, marcação protéica.

Introdução

O corpo lúteo (CL) bovino é um órgão transitório formado a partir da ruptura de folículo pré-ovulatório capaz de secretar grandes quantidades de Progesterona (P4). É composto por células esteroideogênicas grandes (LLC), pequenas (SLC) e não esteroideogênicas (fibroblastos, endoteliais e pericitos). As células LLC e as SLC foram distribuídas nas seguintes proporções ao longo do ciclo estral; entre os dias 3-5, 10-12, 15-18, 19-20, foram respectivamente de 1,6%, 5,1%, 4,5%, 2,2% para as LLC e de 98,3%, 95%, 95,4%, 97,7% para as SLC (Hansel et al., 1987; Niswender et al., 2000). Apesar das LLC serem em menor número, elas ocupam o maior espaço no CL, sendo que no D12 ocupam 40,2% do volume enquanto as SLC apenas 27,7% (O'Shea et al., 1989).

No decorrer do ciclo estral regular, a falta de um embrião viável acarreta na regressão do CL. Em bovinos a regressão ocorre devido a múltiplos pulsos de prostaglandina F2 α (PGF_{2 α}) liberada pelo corno uterino ipsilateral ao CL (Kindahl et al.,

1976; McCracken et al., 1999). Não existe um padrão definido para a frequência e amplitude de cada pulso de $\text{PGF}_{2\alpha}$, variando em cada animal, porém tipicamente ocorrem de 4 à 8 pulsos com intervalos de 6 à 14 horas (Silvia et al., 1991; Schams et al., 2004).

Sendo notória a ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no CL, a mesma começou a ser utilizada nos protocolos de sincronização de estro (Pursley et al., 1995). O uso de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi testada em todas as fases do CL e em diferentes concentrações (Berardinelli e Adair, 1989; Nascimento et al., 2014; Cuervo-Arango et al., 2011). Contudo, a ausência de luteólise em fêmeas bovinas submetidas ao tratamento com duas doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no D6 (5% de luteólise em vacas Angus x Simental; Bridges et al., 2008) ou uma dose no D7 (25% em novilhas Holandesas; Pursley et al., 1995) ou no D9 (23,1% em vacas Nelore; Meira et al., 2006) são descritos na literatura científica.

Foi observado que a ação de sub-dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ nem sempre causa a regressão do CL, devido a fatores, como a fase do ciclo estral, forma de administração e outros ainda não estudados (Berardinelli e Adair, 1989). Meira et al. (2006) e Shrestha et al. (2010) observaram um fenômeno particular caracterizado pela diminuição inicial das concentrações plasmáticas de P4 nas primeiras 12-24 horas, seguida do aumento constante desta que apresentam novamente valores semelhantes aos observados antes dos tratamentos.

A dinâmica da progesterona de diminuir e aumentar após ação induzida pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi caracterizada como luteólise parcial primeiramente por Stellflug et al. (1977). Esse estudo e os citados anteriormente, pouco detalham as características fisiológicas e morfológicas do corpo lúteo durante a luteólise parcial. Com isso, os mecanismos luteais que estão envolvidos nesse processo ainda não são bem elucidados. Em um achado interessante em nosso laboratório (Trevisol et al., 2012), foi observado que o CL no D6, desafiado com 1/6 da dose convencional de $\text{PGF}_{2\alpha}$ apresentou luteólise parcial,

caracterizada pela diminuição da concentração plasmática de progesterona após 16 h do tratamento e voltou a aumentar nos momentos seguintes, e o mais interessante foi que o volume luteal também acompanhou a dinâmica da P4, diminuindo aproximadamente 32%, após 24 horas e voltando a aumentar nos momentos seguintes.

Objetivou-se avaliar a morfometria das células luteais esteroideogênicas, juntamente com as marcações proteicas no CL de bovino, após tratamento com sub-dose de Cloprostenol sódico, para melhor caracterizar a luteólise parcial.

Material e métodos

Este trabalho foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu, no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, em parceria com o Laboratório de Reprodução Animal do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa no período de agosto de 2012 a julho de 2014.

Animais e instalações experimentais

As coletas de dados iniciaram após o projeto ser avaliado pelo comitê de ética local. Após aprovação, foram utilizadas 32 vacas primíparas da raça Caracu adultas com atividade cíclica regular e escore corporal entre 3 e 4 pontos (escala de 1 a 5, Houghton et al., 1990), pesando entre 550 e 630 kg e idade entre 4 e 6 anos. Durante as coletas de dados os animais permaneceram em piquetes com capim Braquiária (*Brachiaria decumbens*), sal mineral e água *ad libitum*, seguindo o manejo nutricional, assim como sanitário do Instituto de Zootecnia.

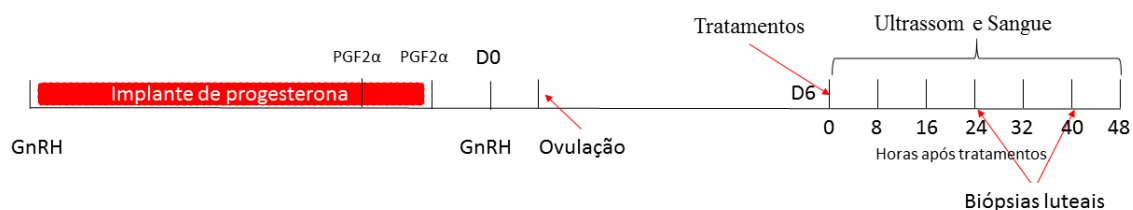


Figura 1: Modelo representativo do delineamento experimental. Iniciando com a sincronização da ovulação; Dia -9 (D-9 - início do protocolo): aplicação de GnRH e colocação de dispositivo intravaginal de P4; D-2,5: aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$; D-2: aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e retirada do dispositivo intravaginal de P4 e D0: aplicação de GnRH. A ovulação foi detectada entre 24 e 32 horas após ultimo GnRH. As coletas de sangue e imagens ultrassonográficas iniciaram no D6 e se estenderem a cada 8 horas por 48 horas. Duas biópsias luteais foram coletadas com 24 e 40 horas após os tratamentos.

Sincronização da ovulação

Inicialmente as vacas foram submetidas a sincronização da ovulação através do seguinte protocolo: Dia -9 (D-9 - início do protocolo): aplicação de 50 μg de Lecirelina (Gestran plus®, Tecnopec - São Paulo – Brasil; IM) e colocação de dispositivo intravaginal de P4 (DIB®, Syntex - Argentina); D-2,5: aplicação de 500 μg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ouro Fino – São Paulo – Brasil; IM); D-2: aplicação de 250 μg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, IM) e retirada do dispositivo intravaginal de P4; e D0: administração de 50 μg de Lecirelina (Gestran plus®, IM). Posteriormente a administração da última dose de Lecirelina os ovários de todas as vacas foram examinados a cada 8 horas até a detecção da ovulação, através de ultrassonografia transretal

Grupos experimentais

No D6, das 32 vacas que foram submetidas a sincronização da ovulação, 28 ovularam entre 24 e 32 horas após último GnRH do protocolo e foram divididas aleatoriamente entre os tratamentos:

Grupo Controle – (n=10): 2 mL de solução fisiológica (0,9%) IM.

Grupo 2XPGF – (n=8): 2 doses de 500 µg de cloprostenol sódico, i.m., aplicadas com intervalo de 2 horas.

Grupo 1/6PGF – (n=10): 83,33 µg de cloprostenol sódico i.m.

O volume de 0,33 mL de Sincrocio® contendo 83,33 µg de cloprostenol sódico, foi diluído em 1,0 mL de solução fisiológica (0,9%) para maior precisão da concentração administrada.

A determinação do dia do ciclo e a dose de cloprostenol empregados no projeto foram determinadas a partir de estudos anteriores (Trevisol et al., 2012).

Avaliações ultrassonográficas

Imediatamente antes do tratamento (momento 0) e posteriormente a cada 8 horas por 48 horas (momento 48) os animais foram submetidos a avaliações ultrassonográficas (Mindray DP 3300 Vet®, Shenzhen Mindray Bio – Medical electronics CO Ltd, Keji, China) com transdutor de 7,5 MHz via transretais no modo B (esquema representativo na figura 1). O exame ultrassonográfico em modo-B do CL baseou-se nos princípios, técnicas e interpretação descrito por Ginther et al. (2007). Nesse exame realizou-se a avaliação do aspecto geral do corpo lúteo e foi determinado o seu volume empregando-se recurso do próprio equipamento que realiza esse cálculo a partir de três medidas do

diâmetro (vertical, horizontal e oblíqua). As três medidas foram obtidas de imagens congelada realizadas na seção de maior tamanho do CL avaliado previamente.

Coleta de Biopsia luteal

As amostras de biopsias luteais foram coletadas em dois momentos, 24 e 40 horas após tratamentos, semelhante à técnica descrita por Atli et al. (2012). Previamente as vacas receberam anestesia epidural induzida com 5 mL de cloridrato de lidocaína (Lidojet – União Química, São Paulo, Brasil). Após antissepsia de todo posterior do animal com clorexidine a 2%, um transdutor convexo acoplado a uma guia transvaginal, foi inserido na vagina. Uma agulha tipo Tru-Cut® foi passada por dentro da guia e posicionada próximo ao fundo vaginal. O ovário contendo o CL foi monitorado, baseado nas imagens geradas pelo ultrassom e posicionado na frente da guia. A agulha foi inserida no CL e uma amostra foi coletada quando o gatilho da agulha disparava. A agulha foi removida e em seguida analisada a presença ou não de tecido luteal. O tecido luteal apresenta coloração laranja, tecido que não tinha essa característica era desprezado. Amostra contendo tecido luteal era lavada em PBS e seguia para fixação em solução de 4% de paraformoldeído por 12 horas, seguida da desidratado em soluções crescentes de metanol (25%, 50%, 75% e 100%), após desidratação o tecido era armazenado em metanol à 100% no freezer -20°C, para futura confecção de lâminas.

Imunoistoquímica

Após a inclusão das amostras de tecido luteal em parafina, foram realizados cortes histológicos de 4 µm. A técnica da imunoistoquímica teve início com a desparafinização tecidual em cuba contendo xilol e reidratação em soluções de álcool. Posteriormente, as

lâminas foram imersas em cuba contendo solução de citrato de sódio a 2,1% pH 6,0 e submetidas ao tratamento térmico para recuperação antigênica na Pascal ou Microondas.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio a 32% por 15 minutos, seguido da inibição das ligações inespecíficos utilizando solução de caseína a 3% por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas com solução tampão Tris – HCL 1M (6% de Tris base, pH 7,65; 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl).

Após a lavagem, as lâminas foram incubadas em câmara úmida com o anticorpo primário StAR (sc-25806; 200µg/mL; coelho; 1:500), PGDH (sc-98907; 200µg/mL; coelho; 1:200), FAS (sc-715; 200µg/mL; coelho; 1:300) e FAS-L (sc-956; 200µg/mL; coelho; 1:500) da empresa Santa Cruz Biotechnology – Inc (Dallas, Texas – USA), e COX-2 (k-20; 126µg/mL; rato; 1:200) da empresa Dako (Cytomation California Incorporation, Carpinteria, CA, USA), *overnight* a 4°C. Após incubação com primário, o anticorpo secundário N-Histofine® Simple Stain (Cosmo Bio USA, CA, USA) foi incubado por 30 minutos. As lâminas foram lavadas com solução TRIS duas vezes por 5 minutos. A revelação com o cromógeno DAB foi realizada por 2 minutos. A reação foi interrompida com 2 banhos de TRIS por 5 minutos. As lâminas foram contra-coradas com HE por 2 minutos e reidratada em álcool para posterior montagem. Todas as lâminas foram fotografadas usando microscópio óptico Leica DM50® equipado com uma câmera Leica® DC300F nos aumentos de 400X.

Mensuração das células luteais

As lâminas também foram utilizadas para caracterização histológica do tecido luteal, por meio da coloração de hematoxilina e eosina (HE) e análise em microscópio óptico Leica DM50 com aumento de 200 e 400X. As lâminas contendo tecido luteal foram

utilizadas para análise da área das células luteais grandes. Para cada lâmina foram obtidas 6 fotografias de campos aleatório, utilização microscópio Leica acoplado com a câmera ICC50 HD. As imagens capturadas foram observadas no computador com o auxílio do software da Leica (LAS EZ). Todas as imagens foram obtidas com a barra de escala de 50 μm .

A área das células luteais grandes foram analisadas no software Image Pro Plus. No programa as fotos foram abertas e primeiramente calibradas, utilizando a barra de escala fixada em cada foto. Cada célula luteal foi mensurada individualmente e para evitar a contagem da mesma célula por mais uma vez, foi mantida a marcação até o final da análise. A marcação era feita em toda delimitação da célula e do núcleo da mesma. Foram mensuradas apenas células com bordas e núcleos bem evidentes e que apresentavam diâmetro maior ou igual a 20 μm . Esse valor foi estipulado baseado no artigo de O'Shea et al. (1989), o qual cita que células luteais grandes apresentam diâmetro superior a 20 μm , e também foi escolhido mensurar apenas células grandes por ocuparem maior espaço no CL. Nas 6 imagens obtidas das lâminas de cada momento, foram mensuradas aproximadamente 80 células.

Colheita de sangue e determinação das concentrações plasmáticas de P4.

Após cada exame ultrassonográfico, amostras de sangue foram coletadas por punção dos vasos coccígeos utilizando agulha (25x8 mm) e tubo de 10 mL heparinizados (BD Vacutainer®), os quais foram acondicionadas em caixa térmica com gelo, para o transporte até o laboratório e imediatamente centrifugadas a 2500 X g por 15 minutos. O plasma obtido foi acondicionado em criotubos de 1,5 mL identificados e armazenado em freezer a -20°C.

As amostras foram quantificadas quanto as concentrações de P4 pelo método de radioimunoensaio utilizando o *kit* específico (Progesterone Ref: IM1188 – Immunoteck, A Beckmann Coulter Co. Pesadena, CA – USA) com sensibilidade de 0,03 ng/ml. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 6,8%. As dosagens foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia da FMVZ- UNESP.

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e as variáveis não apresentaram distribuição normal, com isso as concentrações de progesterona foram transformadas em logaritmo e volume luteal em raiz quadrada. As variáveis transformadas, foram submetidas ao PROC MIXED do programa estatístico SAS (SAS® 9.3 Institute Inc.) para determinar o efeito de tratamento, momento e interação, e foi realizado o teste TUKEY para comparação das médias. A área das células luteais foram analisadas por testes não paramétrico Kruskal-Wallis no PROC NPAR1WAY também do SAS para a comparação de tratamentos e entre momentos. Foram considerados como significativamente diferentes quando $P < 0,05$.

Resultados

Das 32 vacas utilizadas nas sincronizações de ovulações realizadas, 28 (90,62%) foram utilizadas para coleta de dados. Das vacas que não foram utilizadas, uma ocorreu ovulação dupla e outras duas não ovularam dentro do período observado.

Os resultados da concentração plasmática de P4 (figura 2) e volume luteal (figura 3) dos grupos experimentais, estão representados em gráficos na forma de média e erro padrão, respectivamente.

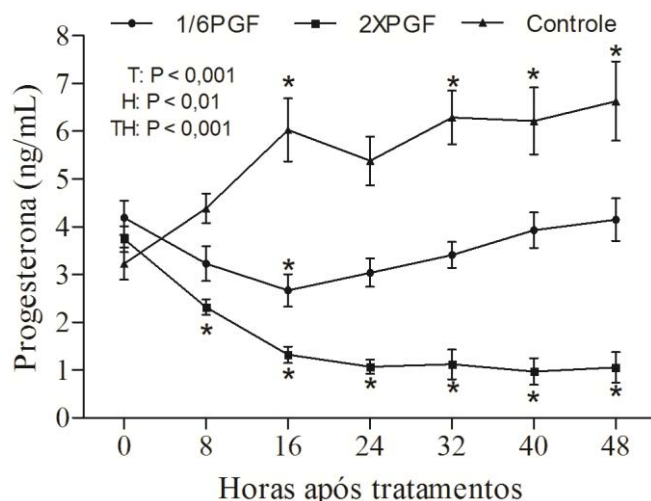


Figura 1: Media e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) após três diferentes tratamentos no D6 do ciclo estral: Controle (2 mL, salina, i.m.; n=10), 2XPGF (Luteólise – duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.; n=8) ou 1/6PGF (Luteólise Parcial – 83,3 µg de cloprostenol sódico, i.m.; n=10). As diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) a partir do momento 0 são indicados pelo asterisco (*) e entres tratamento (T), momento (H) e interação tratamento – momento (TH) estão demonstradas.

As alterações nas concentrações de P4 foram mais evidentes ($P < 0,01$) no tratamento 2XPGF do que no controle e 1/6PGF. A diminuição nas concentrações de P4, a partir de 16 horas do início do tratamento ($P = 0,03$), ocorreram em todos os animais do tratamento. Ainda na maioria delas, foi possível observar a partir de 24h, valores abaixo de 1,0 ng/mL e mantiveram os padrões de redução até 48h. Semelhante as oscilações de P4, o volume luteal também observou-se diminuição entre o momento 0 e 16 ($P < 0,05$) horas e o mesmo se estendeu até as 48h ($P < 0,001$).

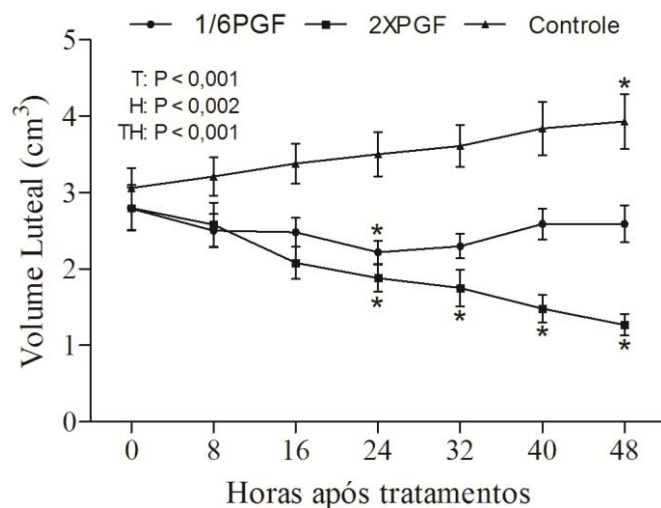
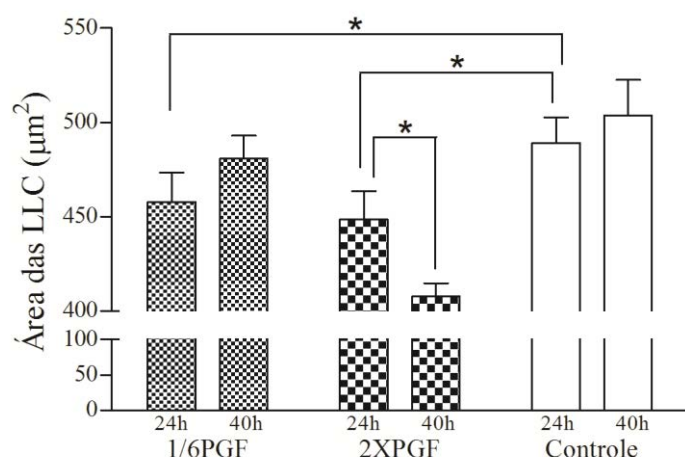


Figura 3: Media e erro padrão do volume luteal (cm³) após três diferentes tratamentos no D6 do ciclo estral: Controle (2 mL, salina, i.m.; n=10), 2XPGF (Luteólise – duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.; n=8) ou 1/6PGF (Luteólise Parcial – 83,3 µg de cloprostenol sódico, i.m.; n=10). As diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) a partir do momento 0 são indicados pelo asterisco (*) e entres tratamento (T), momento (H) e interação tratamento – momento (TH) estão demonstradas.

Nos animais que receberam tratamento 1/6PGF, as concentrações de P4 foram as menores no momento 16 h ($P < 0,001$) após a administração. Contudo, a partir desse momento as concentrações voltaram a aumentar alcançando valores semelhantes ou maiores que os inicialmente observados, não sendo diferentes os momentos 0 e 48 ($P > 0,05$; figura 1). Já o volume luteal teve os menores valores observado no momento 24h ($P = 0,0474$) e também não havendo diferença entre os momentos 0 e 48 ($P > 0,05$).

A área das células luteais grandes (figura 3) também foram influenciadas pelos tratamentos ($P < 0,001$), observando os maiores valores no grupo Controle em

comparação ao 1/6PGF, que por sua vez, foi maior que 2XPGF. Ainda no grupo 2XPGF as áreas foram menores no momento 40h do que no momento 24h ($P = 0,031$).



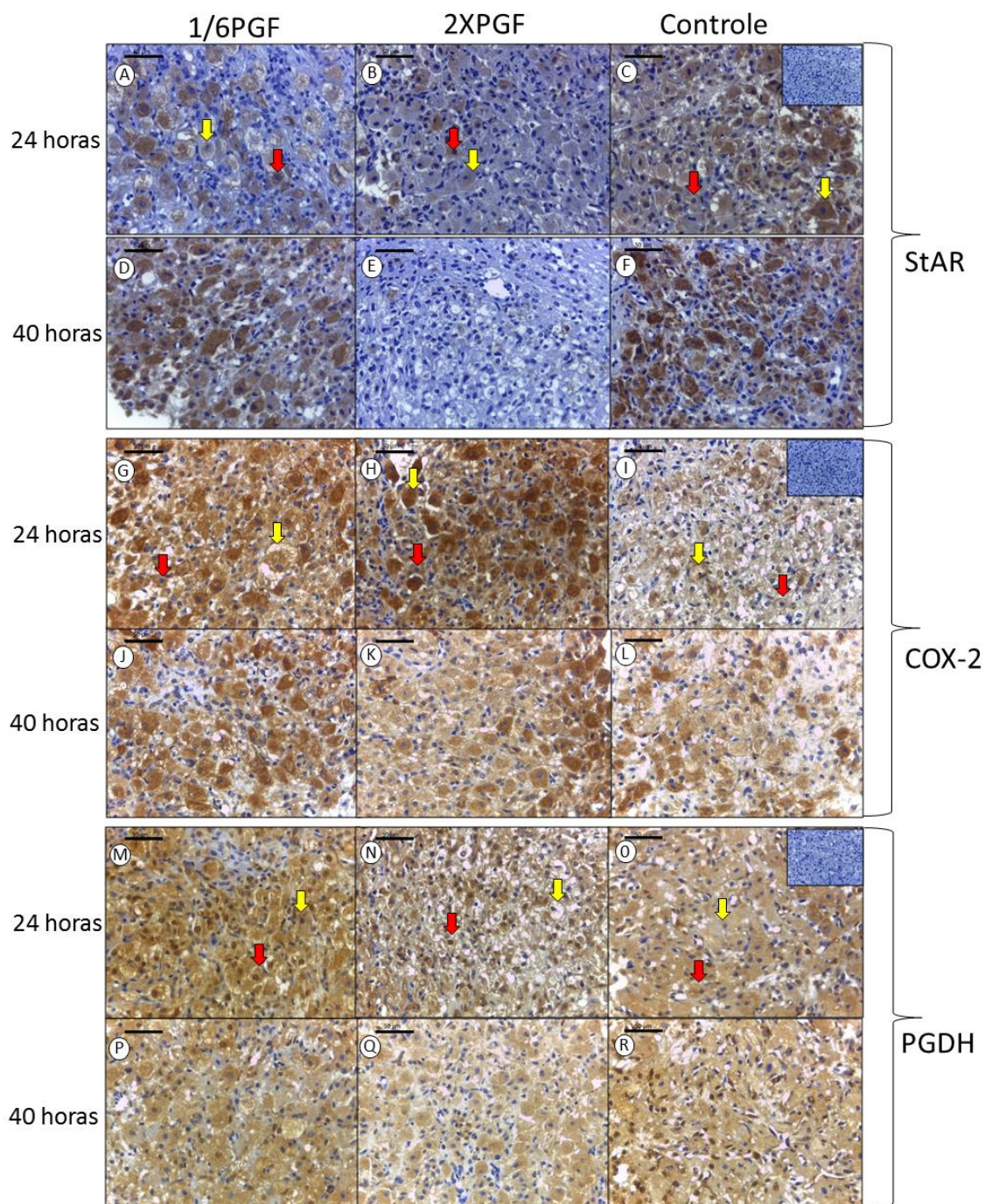
277

Figura 4: Média e erro padrão da área das células luteais grandes (LLC - μm^2) nos momentos 24 e 40 após três diferentes tratamentos no D6 do ciclo estral; Controle (2 mL, salina, i.m.), 2XPGF (Luteólise – duas doses de 500 μg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.) ou 1/6PGF (Luteólise Parcial – 83,3 μg de cloprostenol sódico, i.m.). As diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos ou momentos são indicados pelo asterisco (*).

284

As proteínas marcadas para StAR, COX-2 e PGDH podem ser visualmente observadas no citoplasma das células luteais esteroidogênicas (figura 4). As marcações para StAR foram particularmente marcadas em células luteais grandes e pequenas, sendo as marcações mais evidentes no grupo Controle e muito pouco marcado no grupo 2XPGF, tanto para os momentos 24 e 40 horas. No grupo 1/6PGF as marcações para StAR são mais evidentes no momento 40 horas. As marcações de COX-2 são visualmente mais expressas no grupo 2XPGF no momento 24 horas, e pouco no grupo Controle (figura 4), já o PGDH foi mais evidente no grupo 1/6PGF em ambos os momentos. A marcação para FAS e FAS-L foram visualizadas na membrana, ficando mais evidente nas células luteais

294 grandes do grupo 2XPGF em ambos os momentos. No grupo 1/6PGF pouca marcação no
 295 momento 24 horas e praticamente sem marcação para o momento 40 horas, momento esse
 296 semelhante ao Controle.



297

298 **Figura 5:** Imagens fotográficas representativas dos resultados da imunoistoquímica para
 299 StAR (proteína reguladora aguda esteroidogénicas), COX-2 (ciclo-oxigenase 2) e PGDH
 300 (15- hidrox-prostaglandina desidrogenase), no corpo lúteo bovino nos momentos 24 e 40

horas após tratamento com 1/6PGF (83,3 µg de cloprostenol sódico, i.m.), Controle (2 mL, salina, i.m.), 2XPGF (duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.). As imagens foram capturadas no aumento de 400X, e as barras em preto representa o tamanho de 50 µm. Setas em amarelo indicam as células luteais grandes e as setas em vermelho indicam as células luteais pequenas.

As marcações de FAS e FAS-L foram visualizadas nas membranas das células luteais. As marcações foram mais evidentes do grupo 2XPGF e menos visível no grupo Controle em ambos os momentos. Também pode ser visualizada em algumas células luteais no grupo 1/6PGF no momento 24 horas após tratamentos (figura 5).

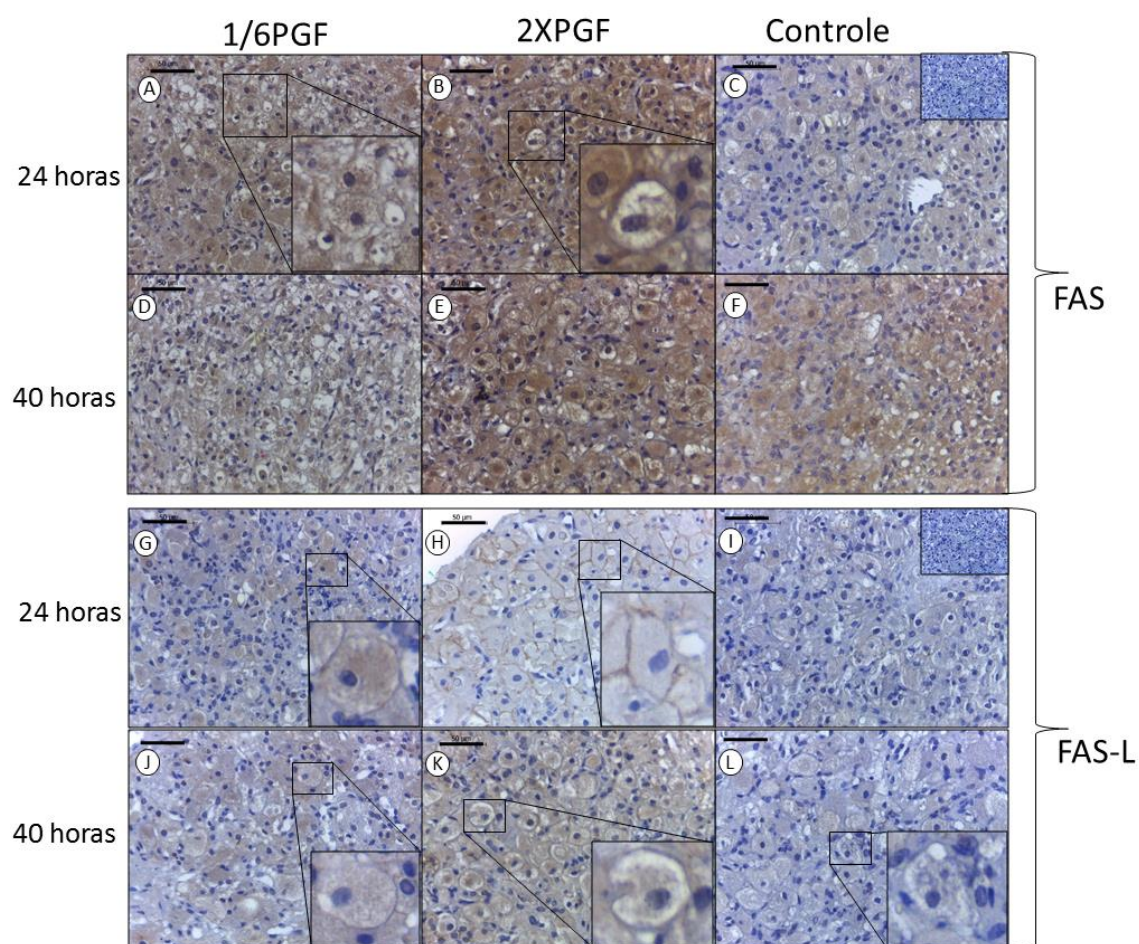


Figura 6: Imagens fotográficas representativas dos resultados da imunoistoquímica para FAS e FAS-Ligante nas células do corpo lúteo bovino nos momentos 24 e 40 horas após

tratamento com 1/6PGF (83,3 µg de cloprostenol sódico, i.m.), Controle (2 mL, salina, i.m.), 2XPGF (duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.). As imagens foram capturadas no aumento de 400X, e as barras em preto representa o tamanho de 50 µm.

Discussão

Os resultados apresentados no estudo demonstram que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ afeta diretamente as concentrações de P4 assim como a estrutura do CL, por mais baixa que seja a concentração administrada. Apesar da sub-dose no grupo 1/6PGF não ser comumente utilizada com finalidades práticas que não seja para indução da regressão luteal, as características observadas podem ser utilizadas para melhorar a compreensão dos mecanismos que proteção do CL em desenvolvimento contra ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$. Muitas pesquisas estudam as variações morfológicas e funcionais do CL após diferentes concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e em diferentes fases do ciclo, porém poucos estudos detalham as características morfológicas como em nosso estudo. Uma observação muito interessante foi a rápida recuperação funcional e estrutural do CL após tratamento com 1/6PGF.

A diminuição estrutural do CL, caracterizado pela menor área das células luteais grandes observadas nos tratamentos 2XPGF e 1/6PGF, podem ser influenciadas pela diminuição na entrada de colesterol no citoplasma das células luteais esteroidogênicas. O colesterol é um substrato essencial para a síntese de progesterona (Niswender et al., 2000). As gotas de lipoproteína podem ser encontradas em grandes quantidades nas células luteais grandes e pequenas, possivelmente ocupando um espaço considerável (Priedkalns e Weber, 1968). O fato da área das células luteais grandes, 24 h após o tratamento 1/6PGF, serem aproximadamente 7% menores em comparação ao Controle,

pode estar relacionado com a entrada de lipoproteínas nas células, uma vez observado a diminuição na concentração plasmática de P4 e volume luteal.

As células luteais grandes e pequenas tem receptores na membrana para lipoproteína de alta (HDL) e baixa densidade (LDL), e a entrada das lipoproteínas nas células luteais esteroidogênicas ocorre mediada pelos receptores de LDL e HDL através da ligação da proteína na membrana celular (Wiltbank et al., 1990; Shen et al., 2014). A $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode afetar diretamente a entrada e receptores para lipoproteínas no CL, principalmente de LDL (Tandeski et al., 1996). Acreditamos que o tratamento 1/6PGF não seja capaz de bloquear irreversivelmente a captação de LDL e HDL, fazendo com que a células retome a capacidade secretória, diferentemente da situação dos animais em regressão total, observados no tratamento com 2XPGF.

Para estudar melhor compreensão do fenômeno ocorrido no volume luteal após tratamento com 1/6PGF, além das avaliações morfométricas realizadas, seria conveniente estipular a população de células do CL, porém isso só poderia ser possível em um único momento, pois teríamos que remover totalmente o CL e perderíamos outros dados após ablação. Outra característica do CL a ser considerada, é a distribuição heterogênea da população de células esteroidogênicas entre as regiões periferia e central (Cools et al., 2013). Rigoglio et al. (2013) observaram que células luteais diferiram de tamanho em três tratamentos diferentes. O maior diâmetro de células luteais grandes, após estimulação por eCG, foi menor do que o diâmetro de células de CL oriundos de superestimulação com FSH ou Controle, contudo o número de células por CL foi superior a todos tratamentos.

A área das células luteais grandes no grupo 2XPGF foi menor, tanto 24 como 40 horas em comparação aos demais tratamentos e essa característica foi relacionada com a diminuição do volume luteal. A diminuição do volume luteal é causada também pela morte celular, apoptose e degeneração de tecido luteal (Niswender et al., 2000;

Skarzynski et al., 2008). A primeira evidencia que a célula está em apoptose é o aparecimento de fragmentação nuclear contendo degeneração da cromatina, diminuição da tamanho celular e aparência de fracções citoplasmáticas ligadas a membrana (Sawyer et al., 1990; Kerr et al., 1972). Esses fragmentos de células ou corpos apoptóticos, são alvos para células de fagocitose do sistema imune. Os macrófagos aumentam o processo apoptótico em tecido luteal por fagocitar fragmentos encapsulados de células luteais (Gemmell et al., 1976). Em nosso estudo podemos observar nas lâminas contendo tecido luteal, a presença de células sem núcleo no tratamento 2XPGF e algumas com núcleos fragmentados no tratamento 1/6PGF.

A marcação de células possivelmente em apoptose foi observada nas laminas contendo tecido luteal dos animais do grupo 2XPGF pela marcação de FAS e FAS-Ligante, e pouca marcação nos tratamentos 1/6PGF e praticamente sem marcação no Controle. FAS é um receptor transmembrânico que pertence a família de citocinas pró-inflamatórias. Quando se liga ao FAS-ligante, sinais de apoptose são ativados. FAS tem sido referenciado como mediador da morte celular durante a luteólise (Quirk et al., 2000; Roughton et al., 1999). FAS é expresso em toda fase luteal, porem aumenta no momento da luteólise ou quando células luteais são cultivadas com Tumor de necrose fatorial (TNF) e Interferon gama ($\text{IFN}\gamma$) (Taniguchi et al., 2002).

Uma possibilidade para a falta de responsividade à sub-dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no CL em fase de desenvolvimento é a pouca produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo próprio CL (auto-amplificação), além disso o CL produz enzimas (PGDH) que degradam a própria $\text{PGF}_{2\alpha}$ sintetizada (Miyamoto et al., 2009; Mondal et al., 2011), como observado nas marcações 24 e 40 h após tratamento 1/6PGF. A produção intraluteal de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode ser suposta pela presença de marcação de COX-2. Nota-se uma marcação mais intensa no citoplasma das células luteais grandes no grupo 2XPGF, do que no grupo 1/6PGF 24 horas pós-

tratamento. Atli et al. (2012) observaram que a expressão mRNA para COX-2 é superior nas vacas com Luteólise em comparação as que receberam $\text{PGF}_{2\alpha}$, mas não regrediram.

Semelhante ao observado no grupo 2XPGF, as concentrações plasmáticas de P4 no grupo 1/6PGF diminuíram até 16h após tratamento, quanto atingiram valores próximos a 2 ng/ml; a partir desse momento aconteceu o resgate da função luteínica evidenciado pelo retorno da P4 (48h) a valores semelhantes aos observados inicialmente (0h). A recuperação da função secretória do CL já descrita na literatura. Meira et al., (2006) utilizaram $\frac{1}{4}$ da dose convencional de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no D9 e observaram o mesmo fenômeno em vacas Nelore. Shrestha et al. (2010) também documentaram o fenômeno da recuperação lútea em novilhas holandesas desafiadas no D10 com infusões intra-uterinas contínuas de 0,5 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (dinoprost) por 2 h e verificaram que apesar da diminuição da P4 ter inicialmente o mesmo comportamento observado nos animais que tiveram luteólise, com 48 h os valores foram similares aos observados antes do desafio.

Apesar do resgate da função luteal no grupo 1/6PGF, as concentrações plasmáticas de P4 deste grupo não alcançaram valores semelhantes aos observados no grupo Controle 48 horas após tratamento. Esse resultado demonstrou que a recuperação luteínica da capacidade secretória de P4 não foi total até 48 h após o desafio e que o tratamento prejudicou o desenvolvimento normal do CL. Observando os valores do volume luteal, também podemos notar que a recuperação ocorreu, porem nas 48 h não alcançou os valores do grupo Controle, permanecendo 65% menor. A falta de recuperação total do CL pode ser causada por morte celular, por mais que a maioria das células retomem a capacidade secretório de P4, como observado pela marcação de StAR. O motivo pelo qual se tem uma mudança brusca em um curto período é um fato interessante e ainda não ficou bem esclarecido.

Acreditamos que a dinâmica de recuperação da função e estrutura luteal, observado em nosso trabalho, não pode ser observada tão evidentemente caso a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$ fosse realizada em outros dias do ciclo estral. Como discutido anteriormente o nosso trabalho foi realizado em um período em que o CL ainda tem a capacidade de se recuperar, mais também já é possível obter sucesso na regressão.

Conclusão

Concluiu-se que a utilização de sub-dose de cloprostenol sódico acarreta na luteólise parcial causando prejuízo ao desenvolvimento do CL. A luteólise parcial funcional foi caracterizada pela diminuição seguida do reestabelecimento das concentrações de P_4 , juntamente com as imunomarcações que favorecem essa síntese hormonal. Além disso, o CL é capaz de se proteger da ação de sub-dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ com a presença de PGDH.

Como observado na função, a estrutura do CL também é reestabelecida durante a luteólise parcial. A menor área nas células luteais grandes observadas 24 horas após tratamento, foi relacionada com a diminuição do volume luteal.

Referências bibliográficas

- Alila, H.W., Hansel, W., 1984. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 31, 1015-1025.
- Atli, M., Bender, R.W., Mehta, V., Bastos, M., Luo, W., Vezina, C.M., Wiltbank, M.C., 2012. Patterns of gene expression. In the bovine corpus luteum following repeated intra-uterine infusions of low doses of prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$. *Biol. Reprod.* 86, 1-13.

- 437 Benyo, D.F., Pate, J.L., 1992. Tumor necrosis- α alters bovine luteal cell synthesis
438 capacity and viability. *Endocrinology*. 130, 854–860.
- 439 Berardinelli, J.G., Adair, R., 1989. Effect of prostaglandin F $_{2\alpha}$ dosage and stage of
440 estrous cycle on the estrus response and corpus luteum function in beef heifers.
441 *Theriogenology*. 32, 301–314.
- 442 Bridges, G.A., Helser, L.A., Grum, D.E., Mussard, M.L., Gasser C.L., Day M.L. 2008.
443 Decreasing the interval between GnRH and PGF $_{2\alpha}$ from 7 to 5 days and lengthening
444 proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology*. 69, 843–851.
- 445 Cools, S., Van den Broeck, W., De Vlieghe, S., Piepers, S., Hostens, M., Opsomer, G.,
446 2013. Topographic distribution of the different cell types, connective tissue and vascular
447 tissue/lumina with a functional bovine corpus luteum and its association with breed, type
448 of fixation protocol and stage during the cycle. *Reprod. Domest. Anim.* 48, 1-9.
- 449 Cuervo-Arango, J., Garcia-Rosello, E., Garcia-Munoz, A., Valdecabres-Torres, X.,
450 Martines-Ros, P., Gonzales-Bulnes, A., 2011. The effect of a single high dose of PGF $_{2\alpha}$
451 administered to dairy cattle 3,5 days after ovulation on luteal function, morphology, and
452 follicular dynamics. *Theriogenology*. 76, 1736-1743.
- 453 Gemmell, R. T., Stacy, B.D., Thornburn, G.D., 1976. Morphology of the regressing
454 corpus luteum in the ewe. *Biol. Reprod.* 14, 270–279.
- 455 Ginther, O.J., Silva, L.A., Araujo, R.R., Beg, M.A., 2007. Temporal association among
456 pulses of 13,14-Dihydro-15-keto-PGF $_{2\alpha}$, luteal blood flow and luteolysis in cattle.
457 *Biol. Reprod.* 76, 506-513.
- 458 Hansel, W., Alila, H.W., Dowd, J.P., 1987 Control of steroidogenesis in small and large
459 bovine luteal cells. *Aust. J. Biol. Sci.* 40, 331-47.

- 460 Houghton, P.L., Lemenager, R.P., Moss, G.E., Hendrix, K.S., 1990. Prediction of
461 postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body
462 condition score. *J. Anim. Sci.* 68, 1428-1427.
- 463 Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon
464 with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239–257.
- 465 Kindahl, H., Edqvist, L.E., Granstrom, E., Bane, A., 1976. Release of prostaglandin-
466 F2alpha as reflected by 15-Keto-13,14-Dihydroprostaglandin F2alpha in peripheral-
467 circulation during normal luteolysis in heifers. *Prostaglandins*, 11, 871-878.
- 468 McCracken, J.A., Custer, E.E., Lamsa, J.C., 1999. Luteolysis: A neuroendocrine-
469 mediated event. *Physiol. Rev.*, 79, 264-323.
- 470 Meira, C., Pessoa, V.M., Ferreira, J.C.P., Araujo, G.H., Gioso, M.M., Bicudo, S.D., Oba,
471 E., Orlandi, C., 2006. Alternative low doses and routes of administering a prostaglandin
472 F2α analogue to induce luteolysis in Nelore cows. *J. Vet. Sci.* 7, 387-390.
- 473 Miyamoto, A., Shirasuna, K., Sasahara, K., 2009. Local regulation of corpus luteum
474 development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors.
475 *Domest. Anim. Endocrin.* 37, 159-169.
- 476 Mondal, M., Schilling, B., Folger, J., Steibel, J.P., Buchnick, H., Zalman, Y., Ireland, J.J.,
477 Meidan, R., Smith, G.W., 2011. Deciphering the luteal transcriptome: potential
478 mechanisms mediating stage-specific luteolytic response of the corpus luteum to
479 prostaglandin F. *Physiol. Genomics.* 43, 447– 456.
- 480 Nascimento, A.B., Souza, A.H., Keskin, A., Sartori, R., Wiltbank, M.C., 2014. Lack of
481 complete regression of the Day 5 corpus luteum after one or two PGF2α in nonlactating
482 Holstein cows. *Theriogenology.* 81, 389-395.

- 483 Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollynson, M.K., McIntush, E.W., 2000.
484 Mechanisms controlling the function and live span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.*
485 80, 1-29.
- 486 O'Shea, J.D., Rodgers, R.J., D'Occhio, M.J.D., 1989. Cellular composition of the cyclic
487 corpus luteum of the cow. *J. Reprod. Fert.* 85, 483-487.
- 488 Friedkalns, J., Weber, A.F., 1968. Ultrastructure studies of the bovine Graafian follicle
489 and corpus luteum. *Zeitschrift fiir Zellforschung.* 91, 554-573.
- 490 Pursley, J.R., Mee, M.O., Wiltbank, M.C., 1995. Synchronization of ovulation in dairy
491 cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology.* 44, 915-23.
- 492 Quirk, S.M., Harman, R.M., Huber, S.C., Cowan, R.G., 2000. Responsiveness of mouse
493 corpora luteal cells to Fas antigen (CD95)-mediated apoptosis. *Biol. Reprod.* 63, 49-56.
- 494 Rigoglio, N.N., Fatima, L.A., Hanassaka, J.Y., Pinto, G.L., Machado, A.S.D., Gimenes,
495 J.U., Baruselli, P.S., Renno, F.P., Moura, C.E.B., Watanabe, I., Papa, P.C., 2013. Equine
496 chorionic gonadotrophin alter luteal cell morpologic features related to progesterone
497 synthesis. *Theriogenology.* 79, 673-679.
- 498 Roughton, S.A., Lareu, R.R., Bittles, A.H., Dharmarajan, A.M., 1999. Fas and Fas ligand
499 messenger ribonucleic acid and protein expression in the rat corpus luteum during
500 apoptosis-mediated luteolysis. *Biol. Reprod.* 60, 797-804.
- 501 Sakumoto, R., Vermehren, M., Kenngott, R.A., Okuda, K., Sinowatz, F., 2011.
502 Localization of gene and protein expressions of tumor necrosis factor- α and tumor
503 necrosis factor receptor types I and II in the bovine corpus luteum during the estrous
504 cycle. *J. Anim. Sci.* 89, 3040-3047.
- 505 Sawyer, H.R., Niswender, K.D., Braden, T.D., Niswender, G.D., 1990. Nuclear changes
506 in ovine luteal cells in response to PGF2a. *Domest. Anim. Endocrinol.* 7, 229-238.

- Schams, D., Berisha, B., 2004. Regulation of corpus luteum function in cattle - an overview. *Reprod. Dom. Anim.* 39, 241-251.
- Shaw, D. W., and J. H. Britt. 1995. Concentrations of tumor necrosis factor α and progesterone within the bovine corpus luteum sampled by continuous-flow microdialysis during luteolysis in vivo. *Biol. Reprod.* 53, 847–854.
- Shen, W., Hu, Z., Kraemer, F., Azhar S., 2014. Scavenger receptor class B type I (SR-BI): a versatile receptor with multiple functions and actions. *Metabolism.* 63, 875-886,
- Shrestha, H.K., Beg, M.A., Imam, S., Ginther, O.J., 2010. Luteal blood flow and concentration of circulating progesterone and other hormone associated with a simulate pulse of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 α in heifers. *Reproduction.* 139, 673-683.
- Silvia, W.J., Lewis, G.S., McCracken, J.A., Thatcher, W.W., Wilson, L., Jr. 1991. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2 alpha during luteolysis in ruminants. *Biol. Reprod.* 45, 655-663.
- Skarzynski, D.J., Ferreira-Dias, G., Okuda, K., 2008. Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal contro, imune mechanisms and intercelular communication. *Repro. Dom. Anim.* 43, 57-65.
- Skarzynski, D.J., Piotrowska-Tomala, K.K., Lukasik, K., Galvão, A., Farberov, S., Zalman, S., Meidan, R., 2013. Growth and Regression in Bovine Corpora Lutea: Regulation by Local Survival and Death Pathways *Reprod. Dom. Anim.* 48, 25–37.
- Stellflug, J.N., Louis, T.M., Gorewit, R.C., Oxender, W.D., Hafs, H.D., 1977. Luteolysis induced by prostaglandin F2alpha before and after hysterectomy in heifers. *Biol Reprod.* 17, 535-540.

- 530 Tandeski, T.R., Juengel, J.L., Nett, T.M., Niswender, G.D., 1996. Regulation of mRNA
531 encoding low density lipoprotein receptor and high density lipoprotein-binding protein in
532 ovine corpora lutea. *Reprod. Fertil. Dev.* 8, 1107–1114.
- 533 Taniguchi, H., Yokomizo, Y., Okuda, K., 2002. Fas-Fas ligante system mediates luteal
534 cell death in bovine corpus luteum. *Biol. of Reprod.* 66, 745-759.
- 535 Trevisol, E., Destro, F.C., Ferreira, J.C., Marques Filho, W.C., Camargos, A.S.,
536 Ackermann, C.L., Amaral, J.B., Ferreira, J.C.P. Morphological and physiological
537 changes in bovine corpus luteum after challenges with low dose of prostaglandin F2 α
538 analogue. Abstract in 17Th International Congress of Animal Reproduction,
539 Reproduction in Domestic Animals, v.47, 2012.
- 540 Wiltbank, M.C., Diskin, M.G., Flores, J., Niswender, G.D., 1990. Regulation of the
541 corpus luteum by protein kinase C II inhibition of lipoprotein-stimulated steroidogenesis
542 by prostaglandin f2 α . *Biol. of Reprod.* 42, 239-245.

CAPITULO II

CARACTERÍSTICAS DO CORPO LÚTEO BOVINO EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL APÓS DESAFIOS COM SUB-DOSE DE CLOPROSTENOL SÓDICO.

Este artigo será submetido ao periódico Livestock Science e encontra-se de acordo com as normais de submissão exigidas. Contudo, está sendo utilizado a língua portuguesa e as figuras estão entre os parágrafos dos resultados apenas para facilitar a leitura e discussão da tese.

Título: Características do corpo lúteo bovino em diferentes fases do ciclo após desafios com sub-dose de Cloprostenol sódico.

Autores: Eduardo Trevisol¹, Wander Lacerda², Camila L. Ackermann¹, Jackson B. Amaral², Milo Wiltbank³, João C.P. Ferreira¹.

Filiações: 1 – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, São Paulo, Brasil. 2 – Instituto de Zootecnia, APTA – SAA, São Paulo, Brasil. 3 – Departamento de Zootecnia, Universidade de Wisconsin – Madison, Wisconsin, USA.

Resumo:

O objetivo foi determinar a sensibilidade e as características do CL em diferentes fases do ciclo estral em bovinos desafiados com sub-dose de cloprostenol sódico. Para o estudo, 39 vacas foram divididas em dois grupos e submetidas a sincronização da ovulação (Ovsynch + P4), sendo das vacas que iniciaram, 34 ovularam entre 24 e 32 h após último GnRH (Dia 0) do protocolo. Os animais utilizados nos grupos (D7 e D12) foram sincronizados de modo que as coletas de dados fossem no mesmo dia. Com isso cada dia do ciclo foi submetido aos três tratamentos, iguais aos descritos no artigo I; D7 (2XPGF, n=5; 1/6PGF, n=5; Controle, n=6) e D12 (2XPGF, n=6; 1/6PGF, n=6; Controle, n=6). Amostras de sangue e volume luteal, foram coletadas antes dos tratamentos e a cada 8 h durante às 48 h de observações. Também foram coletadas duas biopsias de CL nos momentos 0 e 18 h pós-tratamento. Valores com $P < 0,05$ foram considerados diferentes estatisticamente. Não foram observadas alterações na concentração de P4 após o tratamento 1/6PGF e Controle no D7, contudo, no D12 a P4 diminuiu progressivamente a partir de 16 h até o último momento (48 horas). A concentração de P4 e marcações para

StAR diminuíram no tratamento 2XPGF em ambos os dias D7 e D12 após 18 horas e a P4 permaneceram baixas nas demais observações. No D12, o tratamento 1/6PGF diminuiu a P4, assim como as marcações de StAR no momento 18 h. As marcações de COX-2, FAS e FAS-L esteve presente em todos CL tratados com PGF_{2α}, porém com maior intensidade após tratamento 2XPGF e 1/6PGF no D12. Baseado nos resultados citados, conclui-se que o CL no D12 é mais sensível a ação de sub-dose de cloprostenol sódico.

Palavras-chave: prostaglandina F2α, progesterona, volume luteal, imunoistoquímica.

Introdução

O corpo lúteo (CL) em bovinos é fundamental para o sucesso reprodutivo. A regressão do CL é necessária para a continuidade do ciclo reprodutivo, por outro lado, estender a vida do CL e a secreção de progesterona é fundamental para a manutenção da gestação, por isso há a necessidade do bom entendimento dos mecanismos que regulam o CL e a luteólise. Em um ciclo estral, na ausência de um embrião viável intrauterino, o CL irá regredir dando continuidade ao ciclo reprodutivo (Niswender et al., 2000; Schams e Berisha, 2004). A regressão ocorre pela liberação pulsátil de prostaglandina F2α (PGF_{2α}) pelo endométrio, a qual irá chegar ao CL e desencadear uma série de reações que levará a luteólise funcional e estrutural do CL (McCracken et al., 1999).

A administração exógena de PGF_{2α} também desencadeia a regressão luteal, seja ela injetada em dose única, utilizadas em protocolos de sincronização de estro (Pursley et al., 1995) ou mesmo mimetizando os pulsos naturais para fins de pesquisa (Ginther et al., 2009; Atli et al., 2012). Ao longo dos anos pesquisas demonstraram os diferentes efeitos da PGF_{2α} nas fases lúteas (desenvolvimentos, estabilização, final e regressão; revisado por Myamoto et al., 2009). Alguns estudos caracterizaram a falta de responsividade na

fase inicial, até 4 dias pós ovulação (Cuervo-Arango et al., 2011; Nascimento et al., 2014) ou as diferentes dinâmicas de regressão nas demais fases (Pursley et al., 1995; Shrestha et al., 2010).

Foi caracterizado que o CL no D10 desafiado com única dose intra-uterina de Dinoprost (4 mg; aproximadamente 1/6 da dose i.m. recomendada) não desencadeia a luteólise completa, a concentração de P4 diminui até 24 h, chegando a concentrações próximo de 2 ng/mL e volta a ter um aumento subsequente (Shrestha et al., 2010). Ainda no D10, Meira et al. (2006) observaram concentrações de P4 abaixo de 1,0 e acima de 2,0 ng/mL utilizando dose convencional e ¼, respectivamente, após 24 h dos tratamentos.

Apesar de estudos caracterizando as respostas do CL à $\text{PGF}_{2\alpha}$ em fase de desenvolvimento e estabilização já terem sido desenvolvidos, ainda não se conhece os efeitos da administração de sub-dose de análogos da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no D7 e D12 do ciclo estral, ambos dias sabidamente responsivos a este hormônio. Assim, objetivamos caracterizar os efeitos funcionais e morfológicos do CL após administração de sub-dose de cloprostenol sódico no D7 e D12 do ciclo estral em bovinos.

Material e métodos

Este trabalho foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu, no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, em parceria com o Laboratório de Reprodução Animal do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa no período de março de 2012 a julho de 2014.

Animais e instalações experimentais

Foram utilizadas 39 vacas primíparas da raça Caracu adultas com atividade cíclica regular e escore corporal entre 3 e 4 pontos (escala de 1 a 5, Houghton et al., 1990), pesando entre 550 e 630 kg e idade entre 4 e 6 anos. Durante o experimento os animais

permaneceram em piquetes com capim Braquiária (*Brachiaria decumbens*), sal mineral e água *ad libitum*, seguindo o manejo nutricional, assim como sanitário do Instituto de Zootecnia.

Sincronização da ovulação

Inicialmente as vacas foram submetidas a sincronização da ovulação através do seguinte protocolo: Dia -9 (D-9 - início do protocolo): aplicação de 50 µg de Lecirelina (Gestran plus®, Tecnopec - São Paulo – Brasil; IM) e colocação de dispositivo intravaginal de P4 (DIB®, Syntex - Argentina); D-2,5: aplicação de 500 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ouro Fino – São Paulo – Brasil; IM); D-2: aplicação de 250 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, IM) e retirada do dispositivo intravaginal de P4; e D0: administração de 50 µg de Lecirelina (Gestran plus®, IM). Posteriormente a administração da última dose de Lecirelina os ovários de todas as vacas foram examinados a cada 8 horas até a detecção da ovulação, através de ultrassonografia transretal (Mindray DP 3300 Vet®, Shenzhen Mindray Bio – Medical electronics CO Ltd, Keji, China) com transdutor de 7,5 MHz (dia da ovulação = dia 1 do ciclo estral).

Grupos experimentais

No dia 7 ou 12 após GnRH, as vacas que ovularam entre 24 e 32 horas após último GnRH do protocolo, foram divididas aleatoriamente entre os tratamentos citados abaixo. As vacas foram sincronizadas de modo que os tratamentos no D7 ou D12 iniciassem ao mesmo tempo (figura 1).

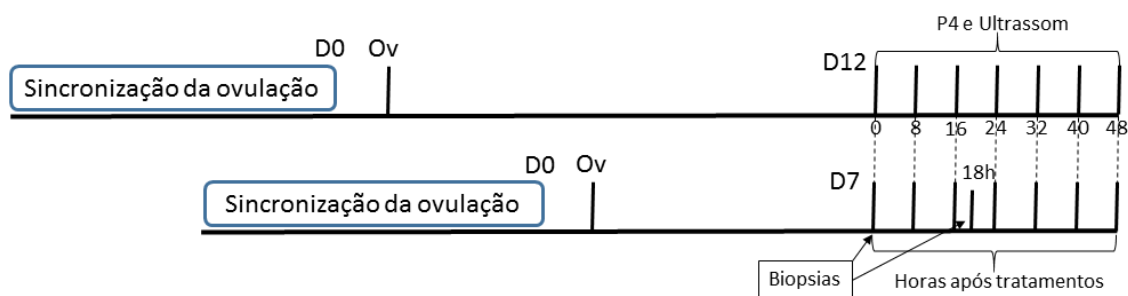


Figura 1: Modelo representativo do delineamento experimental. Iniciando com a sincronização da ovulação; Dia -9 (D-9 - início do protocolo): aplicação de GnRH e colocação de dispositivo intravaginal de P4; D-2,5: aplicação de PGF_{2α}; D-2: aplicação de PGF_{2α} e retirada do dispositivo intravaginal de P4 e D0: aplicação de GnRH. A ovulação foi detectada entre 24 e 32 horas após ultimo GnRH. As coletas de sangue e imagens ultrassonográficas iniciaram no D7 e D12 e se estenderam a cada 8 horas por 48 horas. Duas biopsias foram coletadas, sendo uma antes dos tratamentos e outra com 18

Controle D7 (n=6): 2 mL de solução fisiológica (0,9%) IM.

Controle D12 (n=6) 2 mL de solução fisiológica (0,9%) IM.

2XPGF D7 (n=5): 2 doses de 500 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, IM) aplicadas com intervalo de 2 horas.

2XPGF D12 (n=6): 2 doses de 500 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, IM) aplicadas com intervalo de 2 horas.

1/6PGF D7 (n=5): 83,33 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, IM).

1/6PGF D12 (n=6): 83,33 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, IM).

Devido ao pequeno volume da dose a ser administrado para o tratamento 1/6PGF (0,33 mL), esta foi diluída em 1,0 mL de solução fisiológica (0,9%) para maior precisão da concentração administrada.

A determinação do dia do ciclo e a dose de cloprostenol empregados no projeto foram determinadas a partir do estudo anterior no nosso laboratório (Trevisol et al., 2012).

Avaliações ultrassonográficas

Imediatamente antes do tratamento (momento 0) e posteriormente a cada 8 horas por 48 horas (momento 48h) os animais foram submetidos a avaliações ultrassonográficas transretais no modo B (usando transdutor multi-frequencial - 5 a 9 Mhz). O exame ultrassonográfico em modo-B do CL baseou-se nos princípios, técnicas e interpretação descrito por Ginther (2007). Nesse exame realizou-se a avaliação do aspecto geral do corpo lúteo e foi determinado o seu volume empregando-se recurso do próprio equipamento que realiza esse cálculo a partir de três medidas do diâmetro (vertical, horizontal e oblíqua). As três medidas foram obtidas de imagens congelada realizadas na seção de maior tamanho do CL avaliado previamente.

Coleta de Biopsia luteal

As amostras de biopsias luteais foram coletadas em dois momentos, 0 e 18 horas após tratamentos. Previamente as vacas recebiam anestesia epidural induzida com 5 mL de cloridrato de lidocaína (Lidojet – União Quimica, São Paulo, Brasil). Após antisepsia de todo posterior do animal, um transdutor convexo acoplado a uma guia transvaginal, foi inserida na vagina. Uma agulha tipo Tru-Cut passava por dentro da guia e posicionada próximo ao fundo vaginal. O ovário contendo o CL foi monitorado, baseado nas imagens do ultrassom e posicionado na frente da guia. A agulha era inserida no CL e uma amostra de tecido coletada quando o gatilho da agulha disparava. A agulha era removida e em seguida analisada a presença ou não de tecido luteal. O tecido luteal apresenta coloração alaranjada, tecido que não tinha essa característica era desprezado. Amostra contendo tecido luteal era lavada em PBS e seguia para fixação em solução de 4% de paraformaldeído “overnight”, em seguida desidratado em soluções de metanol (25%,

50%, 75% e 100%), após desidratação o tecido era armazenado em 100% de metanol no freezer -20°C para futura confecção de laminas e marcação imunoistoquímica.

Imunoistoquímica

Após a inclusão das amostras de tecido luteal em parafina, foram realizados cortes histológicos de 4 µm. A técnica da imunoistoquímica teve início com a desparafinização tecidual em cuba contendo xilol e reidratação em soluções de álcool. Posteriormente, as lâminas foram imersas em cuba contendo solução de citrato de sódio a 2,1% pH 6,0 e submetidas ao tratamento térmico para recuperação antigênica na Pascal ou Microondas.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio a 32% por 15 minutos, seguido da inibição das ligações inespecíficos utilizando solução de caseína a 3% por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas com solução tampão Tris – HCL 1M (6% de Tris base, pH 7,65; 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl).

Após a lavagem, as lâminas foram incubadas em câmara úmida com o anticorpo primário StAR (sc-25806; 200µg/mL; coelho; 1:500), PGDH (sc-98907; 200µg/mL; coelho; 1:200), FAS (sc-715; 200µg/mL; coelho; 1:300) e FAS-L (sc-956; 200µg/mL; coelho; 1:500) da empresa Santa Cruz Biotechnology – Inc (Dallas, Texas – USA), e COX-2 (k-20; 126µg/mL; rato; 1:200) da empresa Dako (Cytomation California Incorporation, Carpinteria, CA, USA), *overnight* a 4°C. Após incubação com primário, o anticorpo secundário N-Histofine® Simple Stain (Cosmo Bio USA, CA, USA) foi incubado por 30 minutos. As lâminas foram lavadas com solução TRIS duas vezes por 5 minutos. A revelação com o cromógeno DAB foi realizada por 2 minutos. A reação foi interrompida com 2 banhos de TRIS por 5 minutos. As lâminas foram contra-coradas com HE por 2 minutos e reidratada em álcool para posterior montagem. Todas as lâminas foram

fotografadas usando microscópio óptico Leica DM50® equipado com uma câmera Leica® DC300F nos aumentos de 400X.

Colheita de sangue e determinação das concentrações plasmáticas de P4.

Após cada exame ultrassonográfico amostras de sangue foram colhidas por punção dos vasos coccígeos utilizando agulha (BD Vacutainer® BD Diagnostics - Preanalytical Systems – São Paulo – Brasil; 25x8 mm) e tubo de 10 mL heparinizados (BD Vacutainer®), acondicionadas em caixa térmica com gelo, transportadas para o laboratório e imediatamente centrifugadas a 2500 X g por 15 minutos. O plasma obtido foi acondicionado em criotubos de 1,5 mL identificados e armazenado em freezer a -20°C.

As amostras foram quantificadas quanto as concentrações de progesterona pelo método de radioimunoensaio utilizando o kit comercial específico (Progesterone: Coat-a-Count – DPC, Los Angeles, CA – USA) com sensibilidade de 0,01 ng/mL. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4,3%. As dosagens foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia da FMVZ- UNESP.

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e as variáveis não apresentaram distribuição normal, com isso as concentrações de progesterona foram transformadas em logaritmo e volume luteal em raiz quadrada. As variáveis transformadas foram submetidas ao PROC MIXED do programa estatístico SAS (SAS® 9.3 Institute Inc.) para determinar o efeito de tratamento, momento e interação, e foi realizado o teste TUKEY para comparação das médias entre momentos. Foram considerados como significativamente diferentes quando $P < 0,05$.

Resultados

Das 39 sincronizações de ovulações realizadas, em 34 (87,17%) foi observada ovulação entre 24 e 32 horas após aplicação da segunda dose de Lecirelina e sendo as vacas que não foram utilizadas, foi observado ovulação dupla ou ausência de ovulação dentro do período observado.

Os resultados da concentração plasmática de P4 no D7 (figura 2) ou D12 (figura 4) e volume luteais no D7 (figura 3) ou D12 (figura 5) dos grupos experimentais, estão representados nos gráficos na forma de média e erro padrão, respectivamente.

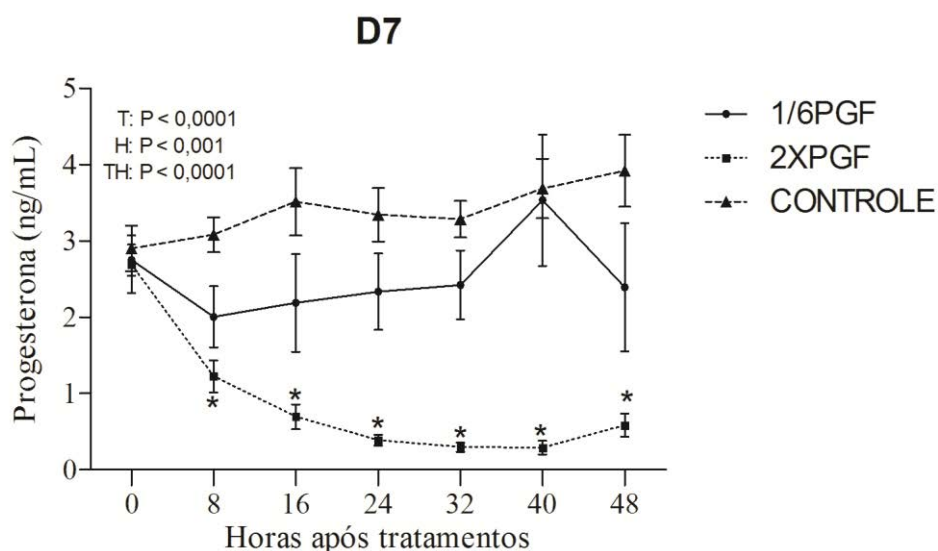


Figura 2: Media e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) após três diferentes tratamentos no D7 do ciclo estral: Controle (2 mL, salina, i.m.; n=6), 2XPGF (Luteólise – duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.; n=5) ou 1/6PGF (Luteólise Parcial – 83.3 µg de clorprostenol sódico, i.m.; n=5). As diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) a partir do momento 0 são indicados pelo asterisco (*) e entres tratamento (T), momento (H) e interação tratamento – momento (TH) estão demonstradas.

O tratamento 1/6PGF no D7 não foi observado alterações ($P > 0,05$) quando analisado na média geral, porém individualmente, 3/5 animais submetidos ao tratamento, apresentaram luteólise parcial. Os três animais citados anteriormente tiveram a redução da concentração de P4 nos momentos seguintes ao tratamento, com posterior recuperação da concentração nos últimos momentos observados (40 e 48h).

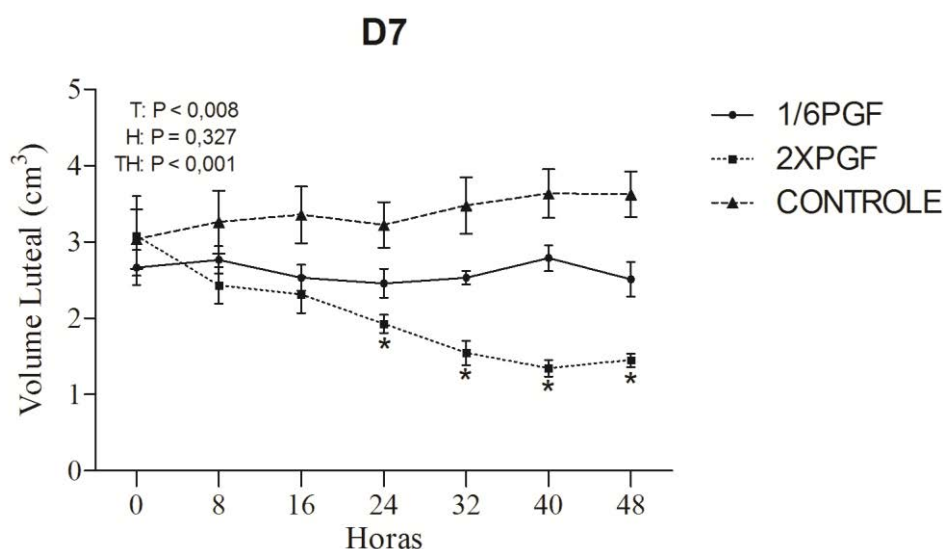


Figura 3: Média e erro padrão do volume luteal (cm³) após três diferentes tratamentos no D7 do ciclo estral: Controle (2 mL, salina, i.m.; n=6), 2XPGF (Luteólise – duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.; n=5) ou 1/6PGF (Luteólise Parcial – 83.3 µg de cloprostenol sódico, i.m.; n=5). As diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) a partir do momento 0 são indicados pelo asterisco (*) e entres tratamento (T), momento (H) e interação tratamento – momento (TH) estão demonstradas.

No D7, a diminuição volume luteal ocorreu com 24 horas ($P = 0,037$) após o tratamento 2XPGF.

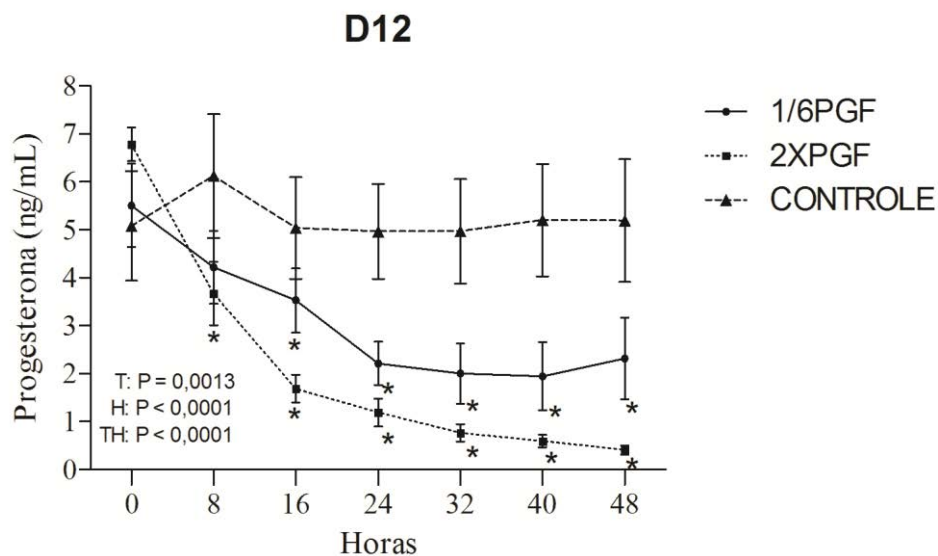


Figura 4: Media e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) após três diferentes tratamentos no D12 do ciclo estral: Controle (2 mL, salina, i.m.; n=6), 2XPGF (Luteólise – duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.; n=6) ou 1/6PGF (Luteólise Parcial – 83.3 µg de clorprostenol sódico, i.m.; n=6). As diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) a partir do momento 0 são indicados pelo asterisco (*) e entres tratamento (T), momento (H) e interação tratamento – momento (TH) estão demonstradas.

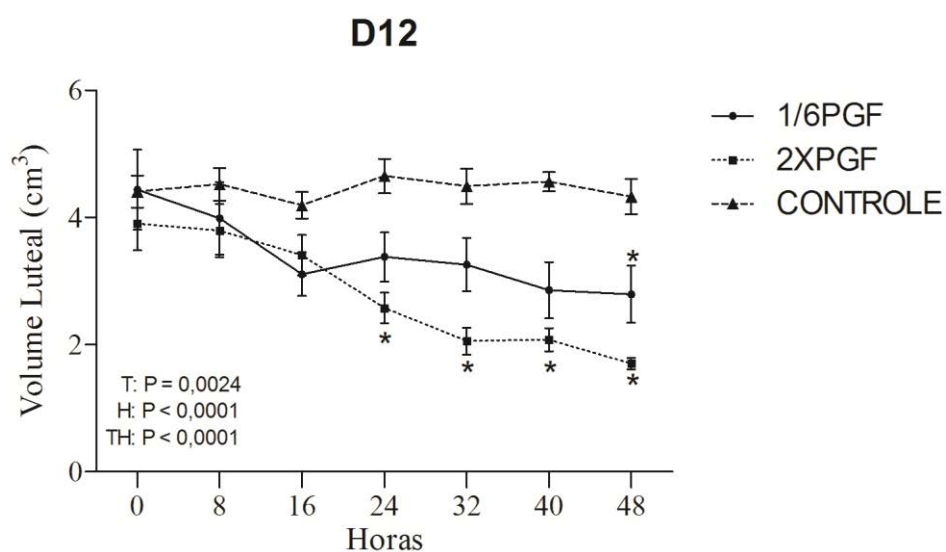


Figura 5: Media e erro padrão do volume luteal (cm³) após três diferentes tratamentos no D12 do ciclo estral: Controle (2 mL, salina, i.m.; n=6), 2XPGF (Luteólise – duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.; n=6) ou 1/6PGF (Luteólise Parcial – 83.3 µg de clorprostenol sódico, i.m.; n=6). As diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) a partir do momento 0 são indicados pelo asterisco (*) e entres tratamento (T), momento (H) e interação tratamento – momento (TH) estão demonstradas.

As alterações nas concentrações de P4 foram mais evidentes no tratamento com 2XPGF, tanto no D7 como no D12, observando uma diminuição a partir de 8 horas ($P < 0,02$). A diminuição se estendeu ao longo as observações seguintes, até as 48 h ($P < 0,001$). Perfil semelhante foi observado no tratamento 1/6PGF do grupo D12, porem as concentrações de P4 diminuíram a partir de 24h ($P = 0,043$) e permaneceram baixas nos demais momentos ($P < 0,05$). Dos 6 animais do tratamento, 2 tiveram concentrações de P4 abaixo de 1,0 ng/mL 32 horas pós-tratamento e 4 animais com 48 horas.

O volume luteal diminuiu após os tratamentos 2XPGF e 1/6PGF no D12, sendo observado a partir de 24 e 48 horas, respectivamente ($P < 0,01$). Para o tratamento Controle no D7 e D12 ou 1/6PGF no D7 o volume luteal não alterou ao longo das observações ($P > 0,05$).

A imuno marcação para StAR e COX-2 (figura 6) esteve presente no citoplasma das células luteais grandes e pequenas em todos os tratamentos e momentos. Sendo mais evidente a marcação para StAR no tratamento Controle (figura 6; C e F) nos dois dias do ciclo e momentos. O tratamento 2XPGF de ambos os grupos alteraram a intensidade, sendo menos visível as marcações 18 horas após o tratamento. A marcação para COX-2

(figura 6; K), FAS e FAS-L (figura 7; H e K) foram visualmente mais intensas nas 18 horas após os tratamentos 2XPGF em ambos os dias e após 1/6PGF no D12.

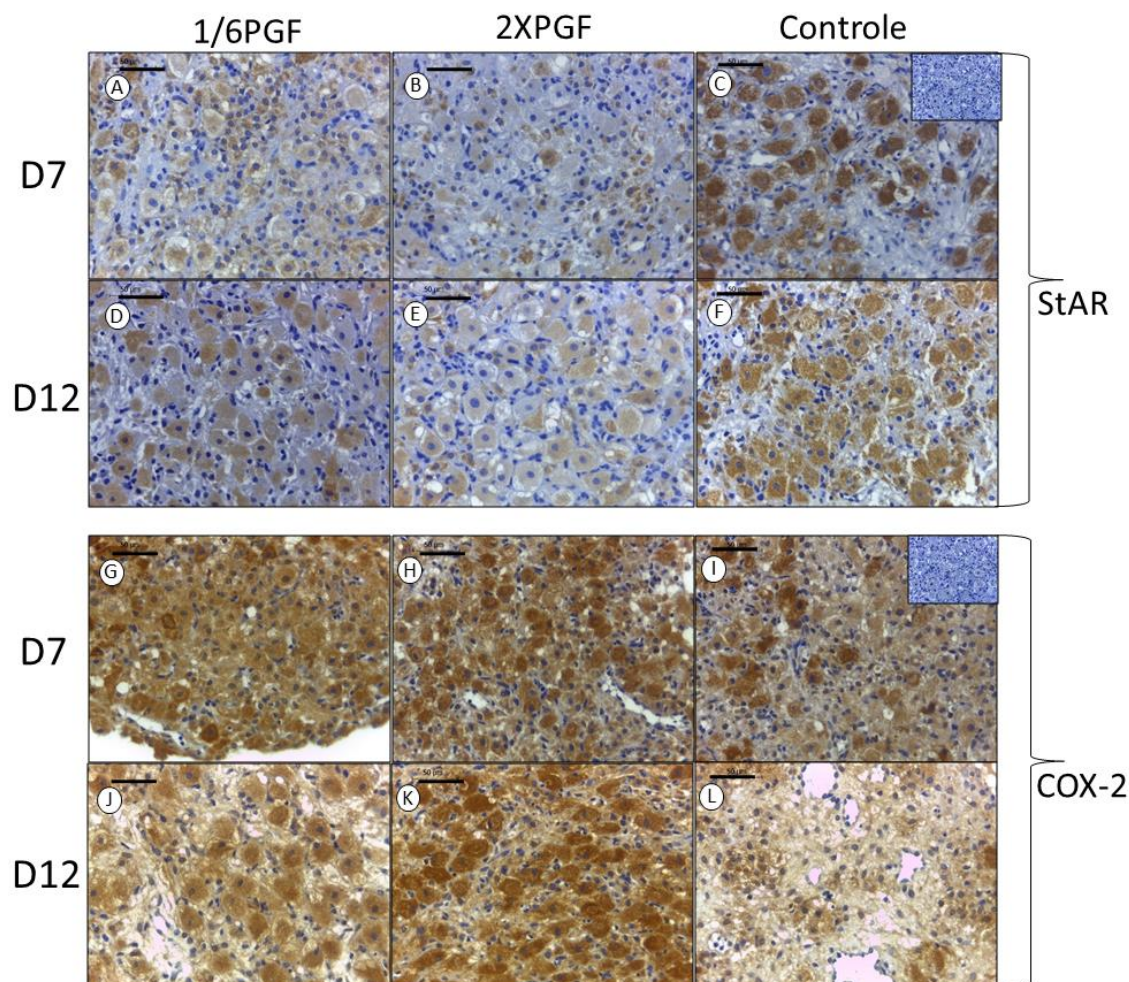


Figura 6: As imagens representam a marcação imunoistoquímica para StAR (proteína reguladora aguda esteroidogénica) e COX-2 (ciclo-oxigenase 2) no corpo lúteo bovino do dia 7 e 12, 18 horas após tratamento com; 1/6PGF (83.3 µg de clorprostenol sódico, i.m.), Controle (2 mL, salina, i.m.), 2XPGF (duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.). As imagens foram capturadas no aumento de 400X, e as barras em preto representa o tamanho de 50 µm.

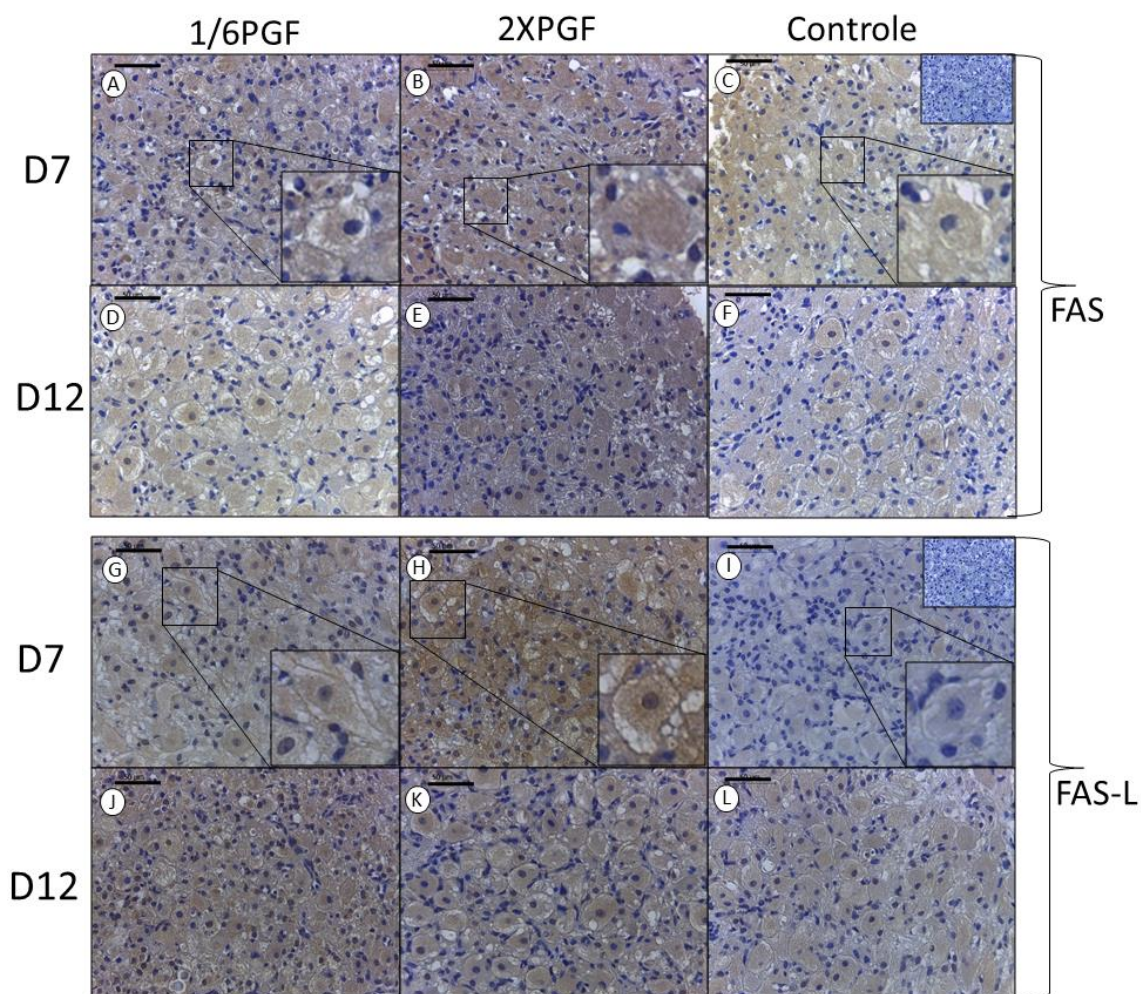


Figura 7: As imagens representam a marcação imunoistoquímica para FAS e FAS-Ligante nas células do corpo lúteo bovino no dia 7 e 12 do ciclo estral, 18 horas após tratamento com 1/6PGF (83.3 µg de clorprostenol sódico, i.m.), Controle (2 mL, salina, i.m.), 2XPGF (duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com 2 horas de intervalo, i.m.). As imagens foram capturadas no aumento de 400X, e as barras em preto representa o tamanho de 50 µm.

Discussão

A administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em diferentes concentrações e fases do CL tem sido demonstrada por vários trabalhos (Berardinelli e Adair, 1989, Meira et al., 2006, Ginther et al., 2009, Nascimento et al., 2014) e além de ser testada durante as fases do ciclo estral,

também foi utilizada em vaca no estágio inicial de prenhez (Ferguson et al., 2014). A partir desses estudos ficou bem evidente as caracterizar das oscilações hormonais, principalmente de P4 após administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Os resultados apresentados em nosso estudo reforçaram ainda mais os achados anteriores e contribuiu principalmente para o entendimento entre fatores intraluteais, progesterona e volume luteal, comparando nos dias do ciclo estral e concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ administradas.

As concentrações de P4 e do volume luteal observadas após administração de sub-dose de cloprostenol nas duas fases do ciclo estral, demonstram que há uma sensibilidade maior do CL à ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no D12. Após o tratamento 1/6PGF do grupo D12, ocorreu uma diminuição progressiva das concentrações de P4, concomitante às marcações de StAR no CL. Uma maior marcação de COX-2 nesse mesmo dia, pode ser um indício que existe uma maior produção intraluteal de $\text{PG}_{2\alpha}$ F, favorecendo a ação da sub-dose nesse dia do ciclo. Os mecanismos inter e intraluteal envolvidos na secreção intraluteal de $\text{PGF}_{2\alpha}$ são estimulados pela própria $\text{PGF}_{2\alpha}$. Na fase luteal final, pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ são secretados pelo endométrio, se ligando a receptores luteais de prostaglandina (PTGFR), e sinalizando as vias de estimulação da síntese local de ocitocina e de $\text{PGF}_{2\alpha}$. A auto-amplificação de PGF intraluteal é mediada pela prostaglandina sintetase 2 (PTGS2 ou COX-2) e prostaglandina F sintetase (PGFS) sendo esse um progresso a favor da luteólise (Kumagai et al., 2014).

Um estudo utilizou a genômica para comparar os perfis de expressão, induzidas após o tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$, em CL inicial (coletado no D4 do ciclo estral) ou CL estabilizado (D11). Foi observado, que no D11, a PGF induziu o aumento de genes relacionados com a síntese intraluteal de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (COX-2 e PTGFS) em comparação ao D4, quando esse aumento não foi observado (Mondal et al., 2011). Acreditamos que o uso de sub-dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no D7 provavelmente tem ação similar a uma dose

convencional administrada no D4, sendo que nos dois casos não ocorre regressão luteal. A falta de responsividade do CL à ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode estar relacionada à falta de retroalimentação positiva intraluteal.

Berardinelli e Adair, (1989), também observaram o aumento da sensibilidade do CL a doses reduzidas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (dinoprost 5mg), ao longo da fase luteal. O contrário das fases tardias, o CL em desenvolvimento (entre os dias 1 e 5 do ciclo), não foi responsivo à ação de uma única dose convencional de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Cuervo-Arango et al., 2011; Nascimento et al., 2014). Os resultados dos trabalhos citados anteriormente, favorecem nossos achados, no qual não foi observada luteólise após tratamento com 1/6PGF no D7, possivelmente por ser uma fase em desenvolvimento e os fatores intraluteais não favoreceram a regressão como no D12.

Foi observado que vacas que receberam 1/5 da dose convencional de cloprostenol (125 μg) no D8 via subcutâneo, tiveram luteólise parcial. As concentrações de P4 foram mais baixas após 24 horas, e quando observado entre 48 e 96 h pós-tratamentos, as concentrações foram iguais ou maiores que às obtidas inicialmente. Nos animais que receberam a mesma dose, porém por via intramuscular, as concentrações de P4 ficaram pouco acima de 1,0 ng/mL entre 24 e 72 horas do tratamento (Colazo et al., 2002). A diferença de 41,7 μg de cloprostenol sódico pode ser a razão pela qual não observamos alterações da P4 no tratamento 1/6PGF no D7.

Acreditava-se que a falta de responsividade do CL em desenvolvimento à ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ ocorria devido à presença de poucos receptores de $\text{PGF}_{2\alpha}$, impedindo a luteólise. Porém, Wiltbank et al. (1995) demonstraram a existência desses receptores durante toda fase luteal, não sendo este fator um limitante para ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$. Contudo, ainda não foi comprovado se existe diferença nas expressões dos receptores de $\text{PGF}_{2\alpha}$ específicos para células luteais grandes e células endoteliais, ao longo do ciclo do CL. Sabe-se que quando

a $\text{PGF}_{2\alpha}$ se liga, a cada um desses receptores, respostas diferentes são desencadeadas (Niswender et al., 2000). Outro ponto a ser observado, é que existem diversos subtipos de receptores para $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Sakamoto et al., 2002) e que esses receptores são expressos diferentemente entre as fases do CL (Shirazuna et al., 2012), não sabemos se cada um desses subtipos tem mais afinidade à $\text{PGF}_{2\alpha}$ em diferentes fases luteais e/ou doses administradas, podendo apresentar respostas diferentes, como foi observado em nosso estudo entre o D7 e D12.

A dose luteolítica de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no tratamento 2XPGF diminuiu a marcação de StAR após 18 horas da aplicação, em ambas as fases do ciclo. Juengel et al. (2000) também observaram que doses luteolíticas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ diminuíram a expressão mRNA para StAR e além disso, aumentaram a formação de oligonucleosomos no tecido luteal. A formação de oligonucleosomo é considerada uma indicadora de apoptose, e estão presentes nas células luteais após diminuição da concentração de P4 (Juengel et al., 1993). Corroborando com esses achados, também pudemos observar a presença de núcleos fragmentados 18 horas após tratamento com 2XPGF em ambos os dias, momento esse em que as concentrações de P4 já estavam diminuindo.

Juengel et al. (2000) também comparou diferentes doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no CL de fase média de ovinos e observou que o CL consegue recuperar sua função após ação de doses baixas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (3mg/60kg – 10% da dose convencional), mesmo quando existe a presença de oligonucleosomos em 80% dos animais, 9 horas após tratamento. As concentrações de P4 diminuíram aproximadamente 45% 10 horas pós-tratamentos e com 24 horas, as concentrações foram semelhantes as iniciais. Nesse mesmo grupo, 24 horas após o tratamento, apenas 20% do tecido luteal das ovelhas continham oligonucleosomos. No tratamento com 1/6PGF no D12 as concentrações de P4 diminuíram 45% entre 16 e 24 horas, e foi observado poucas células com núcleo fragmentado 18h pós-tratamento.

A diminuição no volume luteal no tratamento de 2XPGF em ambos os dias do ciclo e também com o tratamento 1/6PGF no D12 é sugestivo de apoptose das células luteais. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ causa a diminuição na síntese de P4 e aumento de cálcio intracelular, sinais esses que desencadeiam a morte celular. A primeira evidencia que a célula está em apoptose é o aparecimento de núcleo fragmentado contendo degeneração da cromatina. Estes fragmentos de células ou corpos apoptóticos são alvos de células fagocíticas do sistema imune. Macrófagos aumentam o processo apoptótico na população de células luteais fagocitando fragmentos de células (Niswender et al., 2000).

Mondal et al. (2011) também observaram que, quando comparada, a estimulação no D11 e D4, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ induziu um aumento no número de genes no D11 principalmente genes relacionados ao sistema imune. Acreditamos que essa mesma resposta possivelmente ocorrerá se compararmos sub-dose no D7 e D12. A sub-dose administrada no D12 possivelmente aumentou o $\text{PGF}_{2\alpha}$ intraluteal estimulada pelo recrutamento de células do sistema imune. Observamos também a presença de marcação para FAS e FAS-L nos animais desse tratamento. Taniguchi et al. (2002), observaram que a presença de FAS e FAS-L está envolvida com a apoptose das células luteais após administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e após cultivo *in vitro* com células do sistema imune. Ainda nesse estudo os autores observaram que quanto mais FAS-L presente no meio de cultivo, mais células entraram em apoptose.

Com os resultados obtidos em nosso estudo e com os já publicados podemos indicar muitos fatores que tornam o CL mais resistente com o passar do desenvolvimento. Acreditamos que a principal diferença entre eles, seja a auto-amplificação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, porem quem é responsável por essa característica, trabalhos futuros serão necessários. O que chega mais próximo a uma resposta, seria a presença de um embrião secretando substancias que sinalizem sua presença e torne o CL resistente, como na fase inicial.

Conclusão

Conclui-se que uma única aplicação de sub-dose de cloprostenol sódico no D12 desencadeia uma série de reações intraluteais, fazendo com que o CL perca sua capacidade secretória de P4 assim como a estrutura. Essas alterações foram essenciais para torná-lo mais sensível do que no D7.

Referencias bibliográficas

- Atli, M., Bender, R.W., Mehta, V., Bastos, M., Luo, W., Vezina, C.M., Wiltbank, M.C., 2012. Patterns of gene expression. In the bovine corpus luteum following repeated intra-uterine infusions of low doses of prostaglandin F2alpha. Biol. Reprod. 86, 1-13.
- Beindorff, N., Nagai, K., Shirasuna, K., Herzog, K., Hoeffmann, K., Sasaki, M., Bollwein, H., 2010. Miyamoto A. Vascular changes in the corpus luteum during early pregnancy in the cow. J. Reprod. Dev. 56, 263-70.
- Berardinelli, J.G., Adair, R., 1989. Effect of prostaglandin F2α dosage and stage of estrous cycle on the estrus response and corpus luteum function in beef heifers. Theriogenology. 32, 301–314.
- Colazo, M.G., Martinez, M.F., Kastelic, J.P., Mapletoft, R.J., 2002. Effect of dose and rote of administration of clorprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. Anim. Reprod. Sci. 72, 47-62.
- Chohan, K.R., 1998. Estrus synchronization with lower dose of PGF2α and subsequent fertility in subesteous Buffalo. Theriogenology. 50, 1101-08.
- Cuervo-Arango, J., Garcia-Rosello, E., Garcia-Munoz, A., Valdecabres-Torres, X., Martines-Ros, P., Gonzales-Bulnes, A., 2011. The effect of a single high dose of PGF2α

administered to dairy cattle 3,5 days after ovulation on luteal function, morphology, and follicular dynamics. *Theriogenology*. 76, 1736-1743.

Ginther, O.J., Silva, L.A., Araujo, R.R., Beg, M.A., 2007. Temporal association among pulses of 13,14-Dihydro-15-keto-PGF₂ α , luteal blood flow and luteolysis in cattle. *Biol. Reprod.* 76, 506-513.

Ginther, O.J., Araujo, R.R., Palhão, M.P., Rodrigues, B.L., Beg, M.A., 2009. Necessity of sequential pulses of prostaglandin F₂ α for complete physiologic luteolysis in cattle. *Biol. Reprod.* 80, 641-648.

Juengel, J.L., Haworth, J.D., Rollyson, M.K., Silva, P.J., Sawyer, H.R., Niswender, G.D., 2000. Effect of dose of prostaglandin F₂ α on steroidogenic components and oligonucleosomes in ovine luteal tissue. *Biology of Reproduction*. 62, 1047-1051.

Junegel, J.L., Garverick, H.A., Jonhson, A.L., Youngquist, R.S., Smith, M.F., 1993. Apoptose during luteal regression in cattle. *Endocrinology*. 132, 24-32.

Kumagai, A., Yoshioka, S., Sakumoto, R., Okuda, K. 2014. Auto-amplification system for prostaglandin F₂ α in bovine corpus luteum. *Mol. Reprod. Development*. 81, 646-654.

Houghton, P.L., Lemenager, R.P., Moss, G.E., Hendrix, K.S., 1990. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. *J. Anim. Sci.* 68, 1428-1427.

McCracken, J.A., Custer, E.E., Lamsa, J.C., 1999. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 79, 264-323.

Meira, C., Pessoa, V.M., Ferreira, J.C.P., Araujo, G.H., Gioso, M.M., Bicudo, S.D., Oba, E., Orlandi, C., 2006. Alternative low doses and routes of administering a prostaglandin F₂ α analogue to induce luteolysis in Nelore cows. *J. Vet. Sci.* 7, 387-390.

435 Miyamoto, A., Shirasuna, K., Sasahara, K., 2009. Local regulation of corpus luteum
436 development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors.
437 *Domest. Anim. Endocrin.* 37, 159-169.

438 Mondal, M., Schilling, B., Folger, J., Steibel, J.P., Buchnick, H., Zalman, Y., Ireland, J.J.,
439 Meidan, R., Smith, G.W., 2011. Deciphering the luteal transcriptome: potential
440 mechanisms mediating stage-specific luteolytic response of the corpus luteum to
441 prostaglandin F α . *Physiol Genomics*. 43, 447-456.

442 Nascimento, A.B., Souza, A.H., Keskin, A., Sartori, R., Wiltbank, M.C. Lack of complete
443 regression of the Day 5 corpus luteum after one or two PGF 2α in nonlactating Holstein
444 cows. *Theriogenology*. 81, 389-395, 2014.

445 Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollynson, M.K., McIntush, E.W., 2000.
446 Mechanisms controlling the function and live span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 80,
447 1-29.

448 Pursley, J.R., Mee, M.O., Wiltbank, M.C., 1995. Synchronization of ovulation in dairy
449 cows using PGF 2α and GnRH. *Theriogenology*. 44, 915-23.

450 Sakamoto, K., Ishii, Y., Onodera, T., Sugano, T., 2002. Cloning and characterization of
451 the novel isoforms for PGF 2 α receptor in the bovine corpus luteum. *DNA Seq*, 13,
452 307-11.

453 Schams, D., Berisha, B., 2004. Regulation of corpus luteum function in cattle - an
454 overview. *Reprod. Dom. Anim.* 39, 241-251

455 Shirazuna, K., Akabane, Y., Beindorff, N., Nagai, K., Sasaki, M., Shimizu, T., Bollwein,
456 H., Meidan, R., Miyamoto, A., 2012. Expression of prostaglandin F 2α (PGF 2α) receptor
457 and its isoforms in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and PGF 2α -
458 induced luteolysis. *Dom. Anim. Endocr.* 43, 227-238.

459 Shrestha, H.K., Beg, M.A., Imam, S., Ginther, O.J., 2010. Luteal blood flow and
460 concentration of circulating progesterone and other hormone associated with a simulate
461 pulse of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 α in heifers. *Reproduction*. 139, 673-
462 683.

463 Tanaka, J., Acosta, T.J., Berisha, B., Tetsuka, M., Matsui, M., Kobayashi, S., Schams,
464 D., Miyamoto, A., 2004. Relative change in mRNA expression of angiopoietins and
465 receptors Tie in bovine corpus luteum during estrus cycle and prostaglandin F2 α -induced
466 luteolysis: A possible mechanism for the initiation of the luteal regression. *J. Reprod.*
467 *Develp.* 50, 619-626.

468 Taniguchi, H., Yokomizo, Y., Okuda, K. Fas-Fas ligante system mediates luteal cell death
469 in bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 66, 745-759, 2002.

470 Trevisol, E., Destro, F.C., Ferreira, J.C., Marques Filho, W.C., Camargos, A.S.,
471 Ackermann, C.L., Amaral, J.B., Ferreira, J.C.P. Morphological and physiological
472 changes in bovine corpus luteum after challenges with low dose of prostaglandin F2 α
473 analogue. Abstract in 17Th International Congress of Animal Reproduction,
474 *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, 2012.

475 Weems, Y.S., Ma, Y., Ford, S.P., Nett, T.M., Vann, R.C., Lewis, A.W., Neuendorff, D.A.,
476 Welsh, Jr. T.H., Randel, R.D., Weems, C.W., 2014. Effects of intraluteal implants of
477 prostaglandin (PG) E1 or E2 (PGE1, PGE2) on the angiogenic growth factors vascular
478 endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), angiopoietin-1
479 (ANG-1), and angiopoietin-2 (ANG-2) in luteal tissue of Angus and Brahman cows,
480 *Theriogenology*.

481 Wiltbank, M.C., Shio, T.F., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., 1995. Prostaglandin F2 α
482 receptor in the early bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 52, 74–78

Considerações finais

Considerações finais

De modo geral acreditamos que sub-dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no D6 e D7, não é capaz de produzir uma serie de reações em cadeia que levam a morte generalizada das células luteais, como o aumento de fatores imunológicos, apoptóticos e principalmente o aumento intraluteal de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Essas características após ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no CL em desenvolvimento não foram observadas no CL estabilizado (D12), como esquematizado na figura 8.

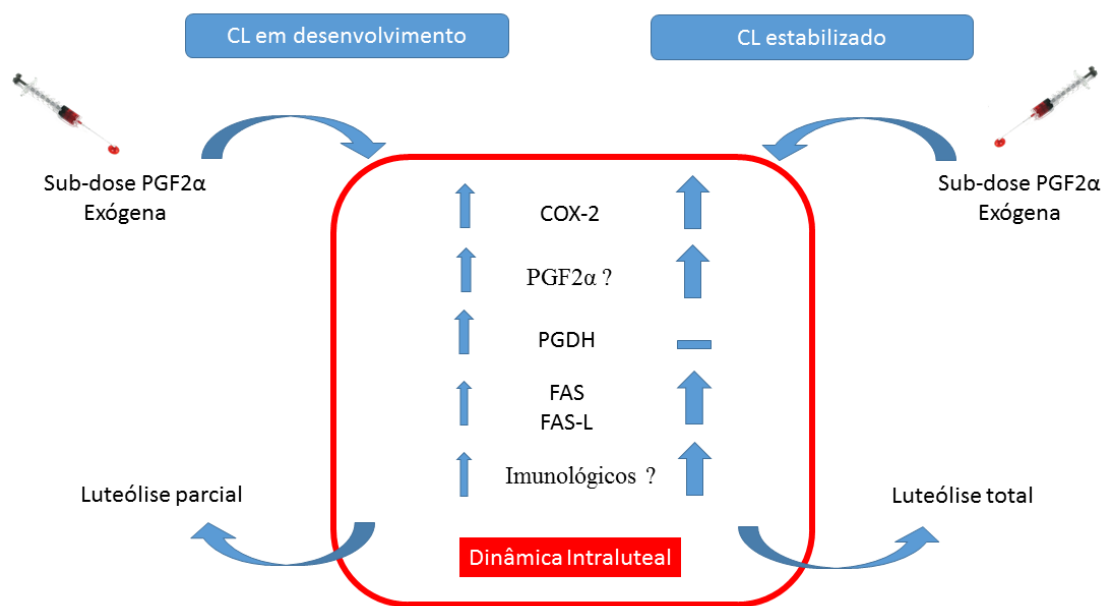


Figura 1: Esquema representativo da ação de sub-dose de cloprostenol sódico no corpo lúteo em desenvolvimento e estabilizado. Em ambas as fases notamos o aumento de Ciclo-oxigenase 2 (COX-2), FAS e FAS-L, com isso acreditamos haver um aumento intraluteal de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e fatores imunológicos. Contudo, a diferença entre as fases está relacionada a intensa expressão no CL estabilizado de cada fator e principalmente o aumento da expressão de 15- hidroxiprostaglandin-desidrogenase (PGDH) na fase em desenvolvimento.



ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE

An International Journal

**AUTHOR
INFORMATION PACK**

TABLE OF CONTENTS

ISSN: 0378-4320

- **Description** p.1
- **Audience** p.1
- **Impact Factor** p.1
- **Abstracting and Indexing** p.2
- **Editorial Board** p.2
- **Guide for Authors** p.3

DESCRIPTION

Animal Reproduction Science publishes original research and timely reviews on topics relating to **reproduction** and **fertility** in **animals**. This includes both fundamental research and applied studies, including management practices that increase our understanding of the **biology** and **manipulation** of reproduction. The focus is on animals that are useful to humans including food- and fibre-producing; companion/recreational; captive; and endangered species including zoo animals, but excluding laboratory animals unless the study reveals new information that impacts our basic understanding of the biology or manipulation of reproduction applicable to the animals listed above.

The journal's scope includes the study of reproductive physiology and endocrinology, reproductive cycles, natural and artificial control of reproduction, preservation and use of gametes and embryos, pregnancy and parturition, infertility and sterility, diagnostic and therapeutic techniques.

Animal Reproduction Science has decided not to publish papers that exclusively examine the *in vitro* development of oocytes and embryos; however, it will consider papers that include *in vitro* studies where the source of the oocytes and/or development of the embryos beyond the blastocyst stage is part of the experimental design.

1.1.1 Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

1.1.2 Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/anirep>.

1.1.3 Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

1.1.4 Article structure

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive use of italics to emphasize part of the text.

1.1.4.1 *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

The introduction "sets the scene" for your work. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 500 words (approximately two manuscript pages).

1.1.4.2 *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

1.1.4.3 Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

1.1.4.4 Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

1.1.5 Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

1.1.6 Abstract

A concise and factual abstract is required of not more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

1.1.7 Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

1.1.8 Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

1.1.9 Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

1.1.10 Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

1.1.11 Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

1.1.12 Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

1.1.13 Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

1.1.14 Artwork

1.1.14.1 *Electronic artwork General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

1.1.14.2 Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

1.1.15 Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

1.1.15.1 Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

1.1.15.2 Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci.*

Commun. 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

1.1.16 Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web) • Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print • If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at

<http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

1.1.17 Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes.

Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

1.1.18 Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

1.1.19 Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.



LIVESTOCK SCIENCE

An International Journal

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

ISSN: 1871-1413

- **Description** p.1
- **Audience** p.1
- **Impact Factor** p.1
- **Abstracting and Indexing** p.2
- **Editorial Board** p.2
- **Guide for Authors** p.4

DESCRIPTION

Livestock Science promotes the sound development of the **livestock sector** by publishing original, peer-reviewed research and review articles covering all aspects of this broad field. The journal welcomes [submissions](#) on the avant-garde areas of **animal genetics, breeding, growth, reproduction, nutrition, physiology**, and **behaviour** in addition to **genetic resources, welfare, ethics, health, management** and **production systems**. The high-quality content of this journal reflects the truly international nature of this broad area of research.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

1.1.20 Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

1.1.21 Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/livsci/>

1.1.22 Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

1.1.23 Article structure

Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasise part of the text.

Manuscripts in general should be organised in the following order:

- Title should be clear, descriptive and not too long
- Abstract
- Keywords (indexing terms)
- Introduction
- Material studied, area descriptions, methods, techniques
- Results
- Discussion

- Conclusion
- Acknowledgment and any additional information concerning research grants, and so on
- References
- Figure captions
- Figures (separate file(s))
- Tables (separate file(s))

1.1.24 Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

1.1.25 Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not be longer than 400 words.

1.1.26 Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

1.1.27 Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

1.1.28 Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

1.1.29 Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

1.1.30 Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are *P< 0.05, **P< 0.01 and ***P< 0.001.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .
Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .

The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

1.1.31 Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

1.1.32 Artwork

1.1.32.1 *Electronic artwork General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

1.1.32.2 **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.** *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

1.1.33 Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

1.1.34 Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

1.1.35 References

References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

1.1.35.1 Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

1.1.35.2 *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

1.1.36 **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web) • Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print • If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

1.1.37 Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

1.1.38 Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

1.1.39 Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>