

Marcelo Rezende Luz

FUNÇÃO LUTEAL E LUTEÓLISE EM CADELAS:
ASPECTOS MORFO-FUNCIONAIS

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.

Orientadora: **Profa. Dra. Maria Denise Lopes**

Co-orientador: **Prof. Dr. Mario Binelli**

Botucatu – SP

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Luz, Marcelo Rezende.

Função luteal e luteólise em cadelas : aspectos morfo-funcionais / Marcelo
Rezende Luz. – 2004.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, 2004.

Orientadora: Maria Denise Lopes

Co-orientador: Mario Binelli

Assunto CAPES: 50504002

1. Cão - Reprodução

CDD 636.089267

Palavras-chave: Cadela; Corpo lúteo; Luteólise; Função luteal; Caspase-3

DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais, Célia e Sérgio.
Pelo apoio constante, carinho, amor e atenção.
Obrigado Mãe. Obrigado Pai.*

“O estudo da gramática não faz poetas. O estudo da harmonia não faz compositores. O estudo da psicologia não faz pessoas equilibradas. O estudo das "ciências da educação" não faz educadores. Educadores não podem ser produzidos. Educadores nascem. O que se pode fazer é ajudá-los a nascer. Para isso eu falo e escrevo: para que eles tenham coragem de nascer. Quero educar os educadores. E isso me dá grande prazer porque não existe coisa mais importante que educar. Pela educação o indivíduo se torna mais apto para viver: aprende a pensar e a resolver os problemas práticos da vida. Pela educação ele se torna mais sensível e mais rico interiormente, o que faz dele uma pessoa mais bonita, mais feliz e mais capaz de conviver com os outros. A maioria dos problemas da sociedade se resolveria se os indivíduos tivessem aprendido a pensar.”

Rubem Alves

“Houve um tempo em que minha janela se abria sobre uma cidade que parecia ser feita de giz. Perto da janela havia um pequeno jardim quase seco. Era uma época de estiagem, de terra esfarelada, e o jardim parecia morto. Mas todas as manhãs vinha um pobre com um balde e, em silêncio, ia atirando com a mão umas gotas de água sobre as plantas. Não era uma rega: era uma espécie de aspersão ritual, para que o jardim não morresse. E eu olhava para as plantas, para o homem, para as gotas de água que caíam de seus dedos magros e meu coração ficava completamente feliz.

Às vezes abro a janela e encontro o jasmineiro em flor. Outras vezes encontro nuvens espessas. Avisto crianças que vão para a escola. Pardais que pulam pelo muro. Gatos que abrem e fecham os olhos, sonhando com pardais. Borboletas brancas, duas a duas, como refletidas no espelho de ar. Marimbondos que sempre me parecem personagens de Lope de Vega. Às vezes, um galo canta. Às vezes, um avião passa. Tudo está certo, no seu lugar, cumprindo o seu destino. E eu me sinto completamente feliz.

Mas, quando falo dessas pequenas felicidades certas, que estão diante de cada janela, uns dizem que essas coisas não existem, outras que só existem diante das minhas janelas, e outros, finalmente, que é preciso aprender a olhar.”

“A arte de ser feliz”

Cecília Meireles

AGRADECIMENTOS

A ajuda de muitos foi imprescindível para a conquista desta etapa. Mas, primeiramente, agradeço a **Deus**, por toda a força e saúde nesta jornada. Gostaria imensamente de agradecer à minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Denise Lopes**, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela confiança, e pela oportunidade de ser seu orientado. Agradeço pelo constante incentivo nas horas boas e também nas difíceis. Finalmente, agradeço por me proporcionar crescimento profissional na Reprodução de Cães e Gatos. Agradeço ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Mario Binelli**, por ter me proporcionado a possibilidade de trabalhar em seu laboratório, e de integrar sua equipe. Obrigado pelo constante entusiasmo e pelo espírito científico e crítico. À **FAPESP**, *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*, pelo financiamento desse projeto. Ao **Prof. Dr. John Verstegen** e **Dr. Karine Onclin**, da Université de Liège - Bélgica, pelas sugestões no delineamento inicial deste projeto. Ao **Prof. Dr. William W. Thatcher**, da University of Florida - EUA, pela concessão dos anticorpos utilizados para dosagem de prostaglandinas. Agradeço muito à amiga e colega **Cláudia Bertan**, por toda a ajuda na realização das análises hormonais de prostaglandinas, pelos bate-papos, desabafos e risadas. Também à querida amiga **Carla Celeghini**, pelo carinho e por estar sempre pronta a ajudar. Seu apoio foi fundamental para esta conquista, valeu. Aos meus irmãos, **Hélio, Olavo e Carolina**, minhas avós, ao querido **Pedro**, e **Geuza**, pelo apoio irrestrito. À **Rosane Pereira de Oliveira**, pelos primeiros degraus. Às amigas do Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS), **Isabel**

Martins (Bel), Fabiana, Isabel Candia (Bel), Vivi, Jussara, Chris, LÍlian e Carla, por toda a ajuda neste período. Aos amigos **Fernando de Biasi, Renée e Rogério Amorim, Marcelo Chacur, Osimar Sanches, Raimundo Tostes, Cecília e Vamilton, Josélia Brandão, Adriana Brandão, Cláudia Acosta, Marcelo e Érika Roncoletta, Renata Navarro, Renato Sampaio, Adauto Mariz e Fabíola Lopes, Ivo Guilherme**, pelos bons momentos nesta trilha. Às queridas amigas do VRA-USP-Pirassununga, **Pauline Martins, Patrícia Miguez, Jamile, Vanessa Marques e Fabiana (Martini)**: obrigado por tudo! Especialmente ao amigo, colega e ex-aluno **Ronaldo de Alcântara Tamamaru**, pela ajuda nas incansáveis colheitas. Valeu, Ronaldo! À **Profa. Dra. Renata Navarro Cassu e Profa. MS. Gláucia** (Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE), pela realização das anestésias. Aos amigos da 'casa do VRA', pelo alojamento, farras e 'chapinhas'. Ao **João Gustavo e Gutão**, pelo apoio inicial. Aos ex-alunos e amigos **Ilka, Raquel, Carol e Thaís**, por toda a ajuda na etapa de colheitas. À **Profa. MS. Rosa Barilli** (UNOESTE), pela concessão dos animais utilizados neste trabalho. Aos meus **ex-alunos, aos funcionários** (canil, farmácia, laboratórios, HV) e **professores** da UNOESTE, por todo o apoio na colheita de materiais, cirurgias e pós-operatórios. À **Carla Pattini**, minha ex-residente na UNOESTE, por toda a ajuda nas colheitas. Ao **Prof. Dr. Antônio Fluminhan**, à **Ana Messas** e aos funcionários do Laboratório de Genética Molecular da UNOESTE, pela cessão do laboratório e toda ajuda. À **Profa. Dra. Eunice Oba**, pela oportunidade de realização das dosagens de progesterona no Laboratório de Endocrinologia da FMVZ-UNESP-Botucatu. Ao **Prof. Dr. Cláudio Alvarenga e à Érika** – VRA-USP, pela oportunidade de dosagem de estradiol junto ao Laboratório de Hormônios (LDH). À **Profa. Dra. Maria Dalva Cesário**, pela ajuda na realização do estudo morfológico deste trabalho. À **Viviane e Silvia Carambula**, da FZEA-USP, pela ajuda na mensuração de Caspase. Aos **Professores**

Drs. Sony Dimas Bicudo, Nereu Carlos Prestes e João Carlos Pinheiro, da FMVZ-UNESP-Botucatu, por toda a ajuda e ensinamentos ao longo desta jornada. A todos os colegas da pós-graduação, pelo apoio constante; Ao amigo e ex-residente **Renato Leandro Spera**, por toda a ajuda na fase inicial e pelas bagunças. Aos **Prof. Drs. Ed Hoffmann Madureira, Rubens Arruda e Aneliese Traldi (Kiky)**, pela atenção durante os trabalhos no VRA-USP-Pirassununga. Aos amigos **Paola e Zé Rodrigo**, pelas descontrações. A todos os professores da FMVZ-UNESP-Botucatu, por toda a ajuda e ensinamentos. Ao **Edílson, Marquinho, Cristina e Meire (biblioteca)** e demais funcionários da FMVZ-UNESP-Botucatu, por toda a atenção; À **Bel** e todos os funcionários da FMVZ-VRA-USP, por toda a atenção. À **Profa. Dra. Gleize Carbonell**, da FESB, pela ajuda fundamental na Comissão de Estágio Supervisionado. À **Néia**, por toda ajuda e carinho. Ao meu querido e estimado cão, **Hall's**, pelo companheirismo em todas e nas difíceis horas. Valeu, **Hall's**! Pode ser que eu tenha me esquecido de alguém que não deveria, mas agradeço desde já a todos que direta ou indiretamente me ajudaram na conquista desta tão sonhada etapa.

A todos vocês, Muito Obrigado!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 O Ciclo Estral da Cadela	16
3.2 O Corpo Lúteo	18
3.3 Controle da Função Luteal em Cadelas	23
3.4 Luteólise	28
3.4.1 Aspectos Funcionais	28
3.4.2 Aspectos Morfológicos e Atividade de Caspase-3	35
 4 ESTUDO 1: <i>Concentrações Plasmáticas de 13,14-diidro-15-ceto-prostaglandina F2α (PGFM), Progesterona e Estradiol em Cadelas Gestantes e em Diestro</i>	39
4.1 Material e Métodos	39
4.1.1 Animais	39
4.1.2 Grupos Experimentais.....	39
4.1.3 Obtenção das Amostras Seriadas de Plasma para as Dosagens Hormonais	40
4.1.4 Radioimunoensaios de PGFM	41
4.1.4.1 Obtenção de Plasma Canino Livre de Prostaglandinas (PCLP) ...	41
4.1.4.2 Preparo das Referências de 13,14 diidro-ceto-prostaglandina F2 α (PGFM) em Plasma Canino	42
4.1.4.3 Técnica de Diluição e Determinação da Capacidade de Ligação do Anticorpo Anti-PGFM ("Teste de Binding")	42
4.1.4.4 Técnica de Determinação da Concentração de 13,14 diidro-15-ceto-prostaglandina F2 α (PGFM) no Plasma Canino por Radioimunoen-	

saio (RIE)	43
4.1.5 Radioimunoensaios de Progesterona	44
4.1.6 Radioimunoensaios de Estradiol	44
4.1.7 Análise Estatística	45
4.2 Resultados e Discussão	47
4.2.1 PGFM	47
4.2.2 Progesterona	54
4.2.3 Estradiol	67

5 **ESTUDO 2:** *Produção in vitro de PGF2 α por Explantes de Endométrio e Corpo Lúteo de Cadelas em Diestro e Gestantes, e Placenta de Cadelas*

<i>Gestantes</i>	74
5.1 Material e Métodos	74
5.1.1 Animais	74
5.1.2 Grupos Experimentais	74
5.1.3 Colheita dos Tecidos para Cultivo	75
5.1.4 Processamento dos Ovários, Útero e Placenta	75
5.1.5 Cultivo de Explantes de Endométrio, Corpo Lúteo e Placenta	76
5.1.6 Radioimunoensaios de PGF2 α	77
5.1.6.1 Preparo das Referências de PGF2 α	77
5.1.6.2 Técnica de Diluição e Determinação da Capacidade de Ligação do Anticorpo Anti-PGF2 α ("Teste de Binding").....	77
5.1.6.3 Determinação da Concentração de PGF2 α por Radioimunoensaio	78
5.1.7 Análise Estatística	79
5.2 Resultados e Discussão	80
5.2.1 Validação	80
5.2.2 Produção de PGF2 α por Explantes de Endométrio e Corpo Lúteo de Cadelas nos dias 65, 75 e 85 do Diestro	81
5.2.3 Produção de PGF2 α por Explantes de Endométrio, Corpo Lúteo e Placenta de Cadelas Gestantes, nos dias 63, 64 e parto	86
5.2.4 Produção de PGF2 α por Explantes de Endométrio e Corpo Lúteo de Cadelas, no dia 65 do Diestro ou Gestação (parto)	90

6 ESTUDO 3: Caracterização Morfológica e Atividade de Caspase-3 na Luteólise de Cadelas Gestantes e em Diestro	95
6.1 Material e Métodos	95
6.1.1 Animais	95
6.1.2 Grupos Experimentais	95
6.1.3 Processamento dos Ovários	96
6.1.4 Análise Morfológica por Concentração Mínima de Eletrólitos (CEC)	96
6.1.5 Análise Morfológica por Hematoxilina e Eosina (HE)	97
6.1.6 Mensuração de Atividade de Caspase-3	98
6.1.7 Análise Estatística	99
6.2 Resultados e Discussão	100
6.2.1 Análise Morfológica	100
6.2.2 Mensuração de Atividade Caspase-3	113
7 DISCUSSÃO GERAL	118
8 CONCLUSÕES	127
9 REFERÊNCIAS	128
10 ANEXOS	145
Resumo	149
Abstract	150

Lista de Figuras

Figura 1 –	Porcentagem de ligação (B/B0) de amostras de plasma bovino ou canino contendo concentrações crescentes de PGFM. O = B/B0 em plasma controle bovino; ♦ = B/B0 em plasma controle canino	48
Figura 2 –	Médias das concentrações plasmáticas de PGFM de cadelas ao longo do diestro (D10 a 86). O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH (Lsmeans ± EPM)	49
Figura 3 –	Médias das concentrações plasmáticas de PGFM de cadelas ao longo da gestação e do diestro. O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; (Lsmeans ± EPM)	52
Figura 4 –	Médias das concentrações plasmáticas de progesterona de cadelas no diestro. O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; (Lsmeans ± EPM)	55
Figura 5 –	Perfis individuais de secreção de progesterona e PGFM em cadelas em diestro	57
Figura 6 –	Médias das concentrações plasmáticas de progesterona de cadelas gestantes e em diestro. O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; (Lsmeans ± EPM)	62
Figura 7 –	Perfis individuais de secreção de progesterona e PGFM em cadelas gestantes	64
Figura 8 –	Médias das concentrações plasmáticas de estradiol de cadelas gestantes e em diestro, do dia 40 a 66. O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; (Lsmeans ± EPM)	68
Figura 9 –	Perfis individuais de secreção de estradiol por cadelas gestantes (animais n. 12, n. 13 e n. 16) ou em diestro (animais n. 2, n. 5 e n. 8)	70

Figura 10 –	Porcentagem de ligação (B/B0) de concentrações crescentes de PGF2 α diluída em soluções contendo diferentes proporções de Meio Ham-F10 (Sigma) e Tris-HCl	81
Figura 11 –	Médias das concentrações de PGF2 α produzidas por explantes de endométrio e corpo lúteo de cadelas em diestro, nos dias 65, 75 e 85. O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; Preto = controle; branco = PDBu. (Lsmeans $\pm$ EPM)	83
Figura 12 –	Médias das concentrações de PGF2 α produzidas por explantes de endométrio, corpo lúteo e placenta de cadelas gestantes, nos dias 63, 64 e parto. O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; Preto = controle; branco = PDBu; (Lsmeans $\pm$ EPM)	88
Figura 13 –	Médias das concentrações de PGF2 α produzidas por explantes de endométrio e corpo lúteo de cadelas gestantes e no diestro, no dia 65. O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; Preto = controle; branco = PDBu; (Lsmeans $\pm$ EPM)	91
Figura 14 –	Corte histológico do corpo lúteo de uma cadela utilizado como teste para o Método de CEC. Seta = células apoptóticas. 1720X	102
Figura 15 –	(A – F) Cortes histológicos de corpos lúteos de cadelas gestantes (63, 64 dias) e imediatamente após o parto evidenciando células luteais íntegras (cl) e algumas apoptóticas (seta). Em F observa-se a presença de melanomacróforo (*). A, C, E = HE. B, D, F = CEC. 1720X	103
Figura 16 –	(A – C) Cortes histológicos de corpos lúteos de cadelas aos 65 dias do diestro evidenciando células luteais íntegras (cl). A = HE; B, C = CEC. vs = vaso sanguíneo; f = fibroblasto. 1720X	104
Figura 17 –	(A – F) Cortes histológicos de estruturas ovarianas de cadelas aos 75 e 85 dias do diestro evidenciando a presença de adipócitos (a); vasos sanguíneos (vs) e fibroblastos (f). Material sugestivo de <i>corpus albicans</i> . A, C, E = HE; B, D, F = CEC. 1720X	106
Figura 18 –	(A, B) Cortes histológicos de corpo lúteo de cadela aos 85 dias do diestro. cl = célula luteal íntegra. A = HE, 860X. B = CEC, 1720X ...	107

Lista de Tabelas

Tabela 1 –	Análise de variância das concentrações plasmáticas de PGFM de cadelas no diestro	48
Tabela 2 –	Análise de variância das concentrações plasmáticas de PGFM de cadelas gestantes	51
Tabela 3 –	Análise de variância das concentrações plasmáticas de PGFM de cadelas gestantes e em diestro, até o D65	54
Tabela 4 –	Análise de variância das concentrações plasmáticas de progesterona de cadelas gestantes e em diestro, até o D65	61
Tabela 5 –	Análise de variância das concentrações plasmáticas de progesterona de cadelas no diestro	61
Tabela 6 –	Análise de variância das concentrações plasmáticas de estradiol, de cadelas gestantes e no diestro a partir do D40	67
Tabela 7 –	Análise de variância das concentrações plasmáticas de PGF2 α produzidas pelo endométrio e corpo lúteo, ao longo do diestro, em 6 horas (DIF 6)	82
Tabela 8 –	Análise de variância das concentrações de PGF2 α , produzidas pelo endométrio, corpo lúteo ou placenta de cadelas gestantes, nos dias 63, 64 e parto, em 6 horas (DIF 6)	87
Tabela 9 –	Análise de variância das concentrações de PGF2 α produzida pelo endométrio e corpo lúteo de cadelas no dia 65 do diestro ou gestação (parto), em 6 horas (DIF 6)	90
Tabela 10 –	Média das concentrações de UAF/ μ g/ptn de Caspase-3 em cadelas gestantes e em diestro	114
Tabela 11 –	Concentrações individuais de UAF/ μ g/ptn de Caspase-3 de tecido ovariano de cadelas, sugestivo de <i>corpus albicans</i>	115

1 INTRODUÇÃO

Evidências arqueológicas sugerem que o cão tenha sido a primeira espécie domesticada pelo homem, há mais de 10.000 anos atrás, e que os cães foram importantes indivíduos na Era Mesopotâmia. No Egito antigo, Greyhounds e Wolfhounds eram usados em caças e como cães-de-guarda (Johnston, 2003). Atualmente, os cães desempenham importante papel na sociedade como animais de estimação ou companhia, além das finalidades de caça, guarda de rebanhos, guarda de domicílios e propriedades, através de diversas raças especializadas. Serve também como modelo para estudos aplicáveis a outras espécies, como o próprio homem, e aos carnívoros selvagens em extinção.

O ciclo reprodutivo dos cães (*Canis familiaris*) tem sido estudado nas últimas décadas com vistas à compreensão dos eventos que regulam a ciclicidade das fêmeas e a fertilidade nos machos.

A fisiologia reprodutiva da espécie canina é única em diversos pontos: a ciclicidade ovariana parece não ser controlada pela função uterina (Olson et al., 1984a; Hoffmann et al., 1996); a duração do diestro pode ser semelhante ou prolongada quando comparada com o período da gestação (Smith e McDonald, 1974; Onclin e Verstegen, 1997b); a prolactina é um fator luteotrófico primário (Okkens et al., 1990; Onclin et al., 1993; Onclin e Verstegen, 1997a).

Embora alguns estudos tentem elucidar aspectos da função luteal em cadelas, até o presente momento poucas pesquisas foram conduzidas para a compreensão da luteólise nesta espécie. Pesquisas demonstraram o envolvimento da $\text{PGF2}\alpha$ na luteólise ao término da gestação, em decorrência do aumento das concentrações

plasmáticas de 13,14-diidro-15-ceto-prostaglandina F2-alfa (PGFM) (Concannon et al., 1988). Entretanto, não se caracterizou a produção de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio de cadelas, assim como nas espécies de produção (Hoffmann et al., 1996). Além disso, não se sabe se há envolvimento de $\text{PGF2}\alpha$ no término do diestro na espécie canina.

A duração da fase luteal em cadelas, ou diestro, é variável conforme o critério adotado para sua caracterização, como detalhado na revisão de literatura (Concannon e DiGregorio, 1986). Percebe-se, no entanto, que o decréscimo da progesterona (P4) a concentrações basais é longo, tanto na gestação como no diestro.

O aumento de PGFM no pré-parto e pós-parto imediato de cadelas já foi demonstrado, sugerindo o envolvimento da $\text{PGF2}\alpha$ como fator luteolítico ao término da gestação em cadelas (Concannon et al., 1988), pelo fato da $\text{PGF2}\alpha$ exógena ser luteolítica em cães (Concannon e Hansel, 1977).

Em várias espécies animais e no homem, a apoptose está envolvida no fenômeno da luteólise (Juengel et al., 1993; Shikone et al., 1996; McCormack et al., 1998; Rueda et al., 1999). Entretanto, até o presente momento, não há relatos do envolvimento da caspase-3, executor primário da apoptose (Carambula et al., 2002), na luteólise da espécie canina.

O conhecimento dos aspectos morfo-funcionais do corpo lúteo de cadelas, os mecanismos envolvidos na síntese de progesterona, o controle dos mecanismos luteotróficos e luteolíticos, associado a ações autócrinas e parácrinas de substâncias durante o diestro e gestação, aumentariam nosso entendimento e permitiriam o controle reprodutivo nesta espécie.

2 OBJETIVOS

Em vista do exposto, o objetivo geral deste trabalho foi estudar os aspectos funcionais e morfológicos da fase luteal e da luteólise em cadelas, com vistas a entender os mecanismos que controlam a função do corpo lúteo. Para tal, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- validar a técnica de radioimunoensaio (RIE) para mensuração de 13,14-diidro-15-ceto-prostaglandina F2-alfa (PGFM);
- avaliar as concentrações plasmáticas de 13,14-diidro-15-ceto-prostaglandina F2-alfa (PGFM) e de progesterona, durante toda a fase luteal (diestro e gestação), e de 17- β -estradiol ao final da fase luteal (diestro e gestação), na espécie canina;
- validar a técnica de radioimunoensaio (RIE) para mensuração de PGF2 α em cultivo de explantes de endométrio, corpo lúteo e placenta de cadelas;
- estudar a produção “*in vitro*” de PGF2- α em cultivo de explantes de endométrio, corpo lúteo e placenta de cadelas, com e sem indução com PDBu (forbol éster).
- avaliar morfológicamente a regressão luteal, assim como características de apoptose dos corpos lúteos ao final da gestação e diestro de cadelas;
- caracterizar a participação da enzima Caspase-3 na luteólise de fêmeas caninas;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O Ciclo Estral da Cadela

O ciclo estral da cadela é dividido em quatro fases distintas: proestro, estro, diestro ou metaestro, e anestro (Johnston et al., 2001), e apresenta aspectos únicos, quando comparado ao ciclo estral dos demais animais domésticos. A cadela é monoéstrica e predominantemente não-estacional, com intervalo interestro de 5-12 meses, e ovócitos primários são liberados dos folículos durante o processo de ovulação, necessitando de maturação nas tubas uterinas previamente à fertilização (Concannon et al., 1989).

A fase folicular do ciclo é compreendida pelo proestro (Concannon et al., 1989), e o período fértil estende-se do final do proestro ao meio do estro. No proestro ocorre desenvolvimento folicular ovariano, aumento das concentrações plasmáticas de estradiol, atração de machos, edema vulvar e perineal, e secreção vaginal sero-sanguinolenta. Entretanto, nesta fase a fêmea ainda não é sexualmente receptiva ao macho (Concannon et al., 1989). Tem duração de 1 a 2 semanas, com variação de 3 dias a 3 semanas (Concannon et al., 1989). Em termos endócrinos, o proestro termina com o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH). Desta forma, ocorre a transição da fase folicular para fase luteal, e inicia-se o estro (Concannon et al., 1977; Concannon et al., 1989).

O estro é caracterizado pela receptividade sexual e aumento crescente das concentrações plasmáticas de P4, com duração média de uma semana, podendo variar de dois dias a três semanas (Concannon et al., 1989). Na maioria dos ciclos, o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) ocorre um dia antes da transição comportamental de proestro a estro, embora o início do estro e a primeira cobertura possam ocorrer 2-3 dias antes ou até 4-5 dias após o pico de LH (Concannon et al., 1989).

Outra particularidade do ciclo estral da cadela é a ocorrência do fenômeno de luteinização folicular pré-ovulatória (Concannon et al., 1977). A fase luteal do ciclo pode ser então compreendida pelo estro (quando ocorre o início da formação do corpo lúteo) e pelo diestro (Concannon et al., 1977; Concannon et al., 1989).

O diestro ou metaestro corresponde à fase de atividade do corpo lúteo, seguida ao estro. Em países como França e Bélgica, alguns autores referem-se a metaestro como sendo a fase imediatamente após o estro, onde ocorre descamação maciça do epitélio vaginal, com duração de 2-3 dias, e diestro como o período de atividade do corpo lúteo seguida ao metaestro, com duração de 70-120 dias (Silva, 1995).

O início da formação dos corpos lúteos se dá através da luteinização folicular pré-ovulatória, que se completa após as ovulações, desencadeadas pelo pico pré-ovulatório de LH. A duração do diestro varia conforme a classificação utilizada. Pode-se considerar sua duração como sendo “em torno” de dois meses, assim como na gestação; 2-3 meses em função do desenvolvimento mamário associado com a pseudo-gestação evidente ou não; por volta de 80 dias, ao se considerar o decréscimo da P4 a valores de 1 ng/mL; 100 a 160 dias quando se considera a queda das concentrações de

P4 a valores basais de anestro inferiores a 0,5 ng/mL; ou 120 a 140 dias quando o efeito da P4 no endométrio já não é mais evidente (Concannon e DiGregorio, 1986).

O anestro é o período associado a baixas concentrações circulantes de P4, estradiol e LH (Jeffcoate, 1992; 1993), e altas concentrações de hormônio folículo-estimulante (FSH) (Olson et al., 1982). É a fase do ciclo estral onde ocorre involução uterina, sendo o intervalo entre o final da fase luteal na fêmea não-gestante ou término da gestação, e o início do próximo proestro (Jeffcoate, 1998).

Mudanças transcricionais ocorrem no receptor de FSH no anestro, impedindo a resposta a estímulos gonadotróficos (McBride et al., 2001). De acordo com Kooistra e Okkens (2001), a progressão do início ao final do anestro está associada com aumento da secreção de FSH, sem aumento concomitante de LH, indicando que o aumento de FSH deve ser considerado como o evento crítico para o início da foliculogênese e conseqüente término do anestro.

3.2 O Corpo Lúteo

O corpo lúteo (CL) ou corpo amarelo foi descoberto por Coiter em 1573 (Senger, 1999) e foi assim denominado por Marcello Malpighi (1628-1694).

A primeira descrição detalhada foi realizada por Regnier De Graaf, em 1672. Foi relatado inicialmente o aparecimento de “corpos globulares” no ovário após o coito em coelhas, os quais permaneciam até o parto, e que o número destas estruturas estava

relacionado à quantidade de filhotes (Niswender et al., 2000). Em 1898, Prenant, ao examinar cortes histológicos de corpos lúteos, afirmou que não havia dúvidas de que o corpo lúteo agiria como uma glândula de secreção interna (Short, 1977, apud Smith et al., 1994). Frank, em 1903 (apud Smith et al., 1994), descobriu que a remoção dos ovários de coelhas gestantes interrompia a gestação, levando Gustav Born's a sugerir que os corpos lúteos são necessários para o processo de implantação (Smith et al., 1994). E em 1929, Corner e Allen (apud Verstegen e Onclin, 2002) identificaram a P4 como sendo o principal produto primário secretado pelo corpo lúteo.

O corpo lúteo é uma glândula endócrina transitória, oriunda do rápido crescimento, diferenciação e luteinização das células da teca e granulosa (Concannon et al., 1977), tecido remanescente do folículo ovulatório (Davis e Rueda, 2002). É composto por células luteais esteroidogênicas e células não-esteroidogênicas, como fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imune (Webb et al., 2002). Todas as características estruturais e funcionais desta glândula parecem ter um objetivo maior: a produção de P4 (Verstegen e Onclin, 2002).

Macrófagos e linfócitos T estão normalmente presentes no corpo lúteo, particularmente no momento de luteólise. Os macrófagos realizam ingestão de restos oriundos da morte celular, embora hajam indícios de que estas células imunes também participem do processo de destruição celular e perda da capacidade de esteroidogênese (Pate e Keyes, 2001).

O desenvolvimento do corpo lúteo está associado com um dramático aumento da quantidade de vasos sanguíneos (Webb et al., 2002). As células esteroidogênicas luteais secretam P4 para iniciar o processo de quiescência uterina e formação glandular em preparo para o estabelecimento de uma gestação (Niswender, 2002).

Nos diversos mamíferos, os principais fatores luteotróficos são o LH, a prolactina, a gonadotrofina coriônica e a insulina (Gibori et al., 1988). Em cadelas, as luteotrofinas são a prolactina e o LH, ambas de origem hipofisária (Okkens et al., 1990; Verstegen e Onclin, 2002). Há uma variação temporal na dependência hormonal do CL (Verstegen e Onclin, 2002) e estudos evidenciaram ser a prolactina o principal destes fatores luteotróficos (Okkens et al., 1990; Onclin e Verstegen, 1997a).

Em ratas, a população de receptores para LH é prolactina-dependente (Murphy e Rajkumar, 1985) e desta forma, em cadelas, pode também existir uma co-dependência (Onclin e Verstegen, 1997a). De acordo com Rothchild (1981), o efeito luteotrófico da prolactina é um evento crônico, ocorrendo um prolongamento da meia-vida luteal, ao invés de uma elevação na secreção de P4.

Uma particularidade da cadela é que mesmo na ausência de gestação, no período de diestro, o corpo lúteo é mantido por um período semelhante (Olson et al., 1984a; Chakraborty, 1987; Onclin e Verstegen, 1997a).

O colesterol é o precursor para a biosíntese da P4. A síntese de colesterol ocorre no fígado, e o transporte aos tecidos esteroideogênicos, como córtex adrenal, folículos, testículos e corpo lúteo, ocorre na forma de lipo-proteínas de baixa densidade (LDL) e alta densidade (HDL). Em condições de deprivação de lipídios, as células luteais são capazes de sintetizar colesterol a partir de acetato (Niswender et al., 2000). Na célula luteal, o colesterol é transportado para o interior de mitocôndrias, via proteína STAR ("steroidogenic acute regulatory protein"), receptores periféricos tipo-benzodiazepinas e endozepinas. A enzima P-450 SCC é responsável pela conversão de colesterol em pregnenolona, que é convertida a P4 pela enzima 3 β -hidroxi-esteróide desidrogenase

(3β -HSD) no retículo endoplasmático liso (Niswender, 2002), estando pronta para difusão.

Não há evidências de que a P4 possa ser estocada em altas quantidades no tecido luteal (Niswender et al., 2000). Fatores de crescimento semelhantes à insulina, IGF-I e IGF-II (“insulin-like growth factors I e II”), estão envolvidos na esteroidogênese e angiogênese luteal, assim como na proteção contra apoptose. As enzimas P-450 SCC e 3β -HSD são alvos da ação IGF, demonstrada tanto pelo aumento da expressão gênica, como pelo aumento da atividade enzimática em resposta ao estímulo de IGF-I em ratas (Magoffin e Weitsman, 1993).

Estudo de Fernandes et al. (1987) demonstrou que ao longo do diestro, concentrações baixas e constantes de receptores para LH estão presentes no corpo lúteo de cadelas. As concentrações de receptores para prolactina no CL foram similares dos dias 2 a 40, com decréscimo não significativo dos dias 40 a 70.

Papa (2001) evidenciou a presença de receptores para P4 e estradiol nas células luteais de cadelas, mas apenas a expressão de receptores para P4 foi relacionada à fase do ciclo. Já a expressão de receptores para estradiol foi correlacionada à expressão de receptor de P4. A concentração plasmática de P4 foi negativamente correlacionada com o número de células luteais expressando receptores para P4 e às outras células positivas ao receptor de P4.

Estudos imunohistoquímicos não demonstraram a ocorrência de esteroidogênese na placenta de cadelas, devido à ausência de enzimas esteroidogênicas, como P-450 SCC, 3β -HSD, 17α -hidroxilase (C17), 20β -hidroxilase (C17) e aromatase (Kiso e

Yamauchi, 1984; Nishiyama et al., 1999). Desta forma, a única fonte de P4 em cadelas é o corpo lúteo.

Embora a P4 seja o esteróide primário secretado pelo CL, em outras espécies algumas substâncias também são secretadas em grandes quantidades, como 20 β -hidroxi, preg 4-ene, 3-one pelo CL bovino, estrógenos na fase luteal do ciclo menstrual de primatas (Niswender et al., 2000) e ocitocina (Stormshak, 2003).

Dentre as enzimas esteroidogênicas presentes em células luteais de cadelas, a aromatase foi detectada a partir do dia 40 da gestação, sendo evidenciada em grande quantidade no terço final da gestação (D50 a 60), o que indica a biosíntese de estrógeno no corpo lúteo de cadelas. Entretanto, os sítios dos precursores do estrógeno ainda são desconhecidos (Nishiyama et al., 1999).

Em cadelas, mesmo na ausência de gestação, o corpo lúteo permanece no ovário durante todo o diestro, que possui duração semelhante à gestação. Ao término da fase luteal, as concentrações de P4 atingem valores basais, inferiores a 1 ng/mL, e a fêmea passa ao anestro (Concannon e DiGregorio, 1986). Desta forma, em cadelas, não há necessidade de um mecanismo de reconhecimento materno da gestação, pois não é preciso bloquear a síntese de PGF2 α , já que a fêmea só voltará a apresentar proestro/estro após alguns meses.

Estudos demonstraram que a P4 é a responsável pela manutenção da gestação em cadelas, já que o uso de acetato de medroxiprogesterona em cadelas ovariectomizadas é capaz de manter a gestação (Concannon et al., 1977).

3.3 Controle da Função Luteal em Cadelas

Normalmente, o controle da função luteal é realizado por um balanço de fatores luteotróficos e luteolíticos. Entretanto, em cadelas, estudos demonstraram que uma luteolisina de origem uterina parece não estar envolvida na regulação do corpo lúteo cíclico (Olson et al., 1984a; Okkens et al., 1985a;b).

Onclin e Verstegen (1997b) não observaram diferenças significativas entre as concentrações plasmáticas de P₄ em cadelas gestantes ou em diestro, embora após o D40 da gestação as concentrações de P₄ foram maiores nas fêmeas gestantes. Os autores enfatizaram que houve um término abrupto do período luteal nas cadelas gestantes, e que nas cadelas em diestro este término foi mais progressivo.

Olson et al. (1984a) estudaram a influência da histerectomia em diferentes momentos da gestação ou diestro, sobre a regulação luteal de cadelas. Foi observado um decréscimo transitório da P₄ circulante nas 24 horas seguintes à cirurgia, mas com manutenção de valores superiores a 1 ng/mL até por volta dos dias 57-60 da fase luteal, indicando que não há necessidade do útero gestante ou cíclico para manutenção da função luteal.

Na mesma linha de pesquisa, Hoffmann et al. (1992) estudaram o efeito da histerectomia na função luteal de cadelas no diestro. A histerectomia foi realizada nos dias 35-40 após o início do proestro, e as cadelas foram acompanhadas por 2 ciclos consecutivos. Não foi observada diferença significativa nas concentrações de P₄, estradiol, prolactina e hormônio do crescimento (GH) entre os grupos

histerectomizados e controle, e entre os ciclos. Os autores concluíram que a regressão luteal em cadelas no diestro não é dependente de fatores luteolíticos de origem uterina, embora o útero possa influenciar a duração do anestro, já que o intervalo interestro foi dramaticamente diminuído (97 x 149 dias) após a histerectomia.

Steinetz et al. (1989) encontraram concentrações de P4 em cadelas no diestro 56% inferiores às gestantes, com valores máximos entre a 2^a e 5^a semanas. Já concentrações de relaxina só foram detectáveis nas cadelas gestantes, e após a 4^a semana. As cadelas gestantes ovariectomizadas e suplementadas com progestágeno apresentaram concentrações de relaxina inferiores às cadelas gestantes intactas, e decréscimo nas concentrações de P4. Os autores sugeriram que a placenta e os ovários poderiam contribuir com a produção de relaxina, ou que a ablação dos ovários removeu substâncias tróficas ovarianas que potencializam a secreção de relaxina por outros tecidos. Já Buff et al. (2001) demonstraram que concentrações de relaxina podem ser detectadas precocemente, após o dia 19 do pico de LH.

Smith e MC Donald (1974) observaram concentrações de P4 superiores a 0,5 ng/mL até o dia 80 do diestro, em cadelas não-cobertas ou cobertas com machos vasectomizados.

Gräf (1978) encontraram concentrações individuais flutuantes de estrógeno ao longo da gestação, e aumento das concentrações de prolactina na segunda metade da gestação. As concentrações de P4 atingiram valores máximos duas semanas após a cobertura, permaneceram elevadas até o D35, e decresceram gradualmente até o parto.

De acordo com Okkens et al. (1986), o corpo lúteo da cadela é independente de suporte hipofisário entre a ovulação e o dia 24 do período luteal, sendo este necessário, entretanto, na segunda metade deste período.

Trabalhos de Concannon associados ou não a colaboradores (1980; 1987) demonstraram que o LH é um fator luteotrófico na cadela. Foi demonstrada a inibição da secreção de P4 com uso de soro anti-LH ou com bromocriptina (inibidor da prolactina) em cadelas gestantes e no diestro, e afirmaram que a função luteal normal de cadelas é dependente de LH e de prolactina. Houve recuperação das concentrações de P4 4 a 8 dias após a aplicação do soro anti-LH, e o abortamento que se esperava não ocorreu. A bromocriptina causou queda permanente da P4 nas cadelas tratadas após o dia 42 (gestação ou diestro), e temporária nas cadelas tratadas nos dias 8 ou 22 da gestação.

Entretanto, Okkens et al. (1990) verificaram que o padrão de secreção de P4 é similar em cadelas controle e tratadas com inibidor de prolactina (bromocriptina) antes do D25. Todavia, na segunda metade da fase luteal, houve acentuado decréscimo da P4, assim como da duração da fase luteal, sugerindo ser o corpo lúteo dependente de prolactina neste período. O uso de hormônio liberador de LH (LHRH) não potencializou a produção de P4 após o D33, e o uso de LHRH suprimiu a secreção de LH, mas não a produção de P4, sugerindo que o LH pode não ser um fator luteotrófico na cadela. Entretanto, a supressão do LH neste estudo de Okkens e seus colaboradores pode não ter sido tão eficiente como no trabalho de Concannon et al. (1987).

Onclin et al. (1993) observaram declínio nas concentrações de P4 a valores < 2 ng/mL e abortamento em 100% das cadelas (n=5) tratadas com cabergolina (inibidor da prolactina) após o dia 40 da gestação, e em 66% das cadelas (n=6) tratadas após o dia

30 da gestação. Em dois animais, com as doses mais altas, as concentrações de P₄ declinaram, mas não atingiram valores ≤ 2 ng/mL. Em cadelas (n=4) tratadas após o dia 25, as concentrações de P₄ declinaram, mas apenas uma cadela atingiu valores < 2 ng/mL e abortou.

O uso de cabergolina associada a alfaprostol ou cloprostenol foi capaz de induzir abortamento e queda das concentrações de P₄ em cadelas tratadas na metade da gestação (Onclin et al., 1995). Embora as concentrações de prolactina observadas no diestro sejam baixas, comparado à gestação, a inibição deste hormônio, com o uso de cabergolina, ocasionou como consequência o declínio plasmático da P₄ em cadelas gestantes ou em diestro, confirmando o efeito luteotrófico da prolactina em ambos os estados reprodutivos (Onclin e Verstegen, 1997b).

Gerstenberg e Nöthling (1995) detectaram declínio transitório das concentrações de P₄ após o uso de metergolina, e após um segundo tratamento com metergolina associada a dinoprost, em cadelas gestantes, bem como recuperação das concentrações de P₄ entre os tratamentos. Em 87% das cadelas o abortamento só ocorreu no segundo tratamento.

Chakraborty (1987) comparou o perfil hormonal entre cadelas da raça Labrador, gestantes e em diestro. As concentrações de estrona foram superiores nas cadelas gestantes. Nas 4 semanas seguintes à ovulação, as concentrações de 17- β -estradiol foram maiores nas cadelas em diestro que nas gestantes. As concentrações de P₄ foram superiores nas cadelas gestantes que nas cadelas em diestro. As concentrações de LH foram estáveis até a 6^a semana do diestro ou estação, mas entre a 6^a e 9^a

semanas foram encontradas concentrações elevadas de LH em ambos os estados reprodutivos.

Similarmente, Hoffmann e Schneider (1993) demonstraram um aumento da disponibilidade de LH do início para o final do diestro, e início do anestro, com aumento da amplitude dos pulsos de LH.

Fernandes et al. (1987) demonstraram que as concentrações de receptores para LH na hipófise decrescem do proestro ao dia 2 do diestro, com aumento até o dia 80. Já as concentrações de receptores para prolactina na hipófise permanecem relativamente constantes até o dia 80 do diestro.

É relatado que o aumento das concentrações periféricas de estradiol promove a síntese de receptores para estradiol e para P4. Entretanto, em cadelas, as concentrações de receptores para estradiol no endométrio aumentam do final do proestro ao dia 10 do diestro, com decréscimo nos dias 30-40, aumento após o dia 40, quando as concentrações de P4 circulantes começam a declinar, e valores significativamente maiores nos dias 60-80 do diestro. As concentrações de receptores para P4 aumentam do final do proestro ao dia 2 do diestro, declinam e permanecem baixas até o dia 40. Quando as concentrações de P4 declinam na circulação, há aumento e manutenção constante das concentrações de receptores no endométrio até o dia 80 (Fernandes et al., 1989).

Onclin et al. (2002) estudaram o padrão de secreção de estradiol e das gonadotrofinas hipofisárias em cadelas. Elevadas concentrações plasmáticas de estradiol foram encontradas nas cadelas no diestro e gestação, com valores entre 21-42 pg/mL. Os autores sugeriram o possível envolvimento do estradiol na regulação do “complexo luteotrófico” de cadelas. As concentrações de LH foram significativamente

diferentes nos 2 grupos entre os dias 10-40. Entre os dias 40 e 65, foram detectadas concentrações basais de LH, entre 2 picos, em ambos os grupos, com maior frequência de pulsatilidade e variabilidade nas cadelas em diestro. Concentrações de 3-6 ng/mL de FSH foram detectadas ao longo do diestro, enquanto nas fêmeas gestantes foram detectadas concentrações de até $10,3 \pm 1,5$ ng/mL dos dias 40 a 65, com valores basais próximo ao parto. Entretanto, em ambos os grupos, foram detectados aumentos significativos de FSH e LH na segunda metade da gestação.

O papel da relaxina e da prolactina na função luteal de cadelas e a variação diurna de P4, relaxina, prolactina e 17- β -estradiol foi investigada por Steinetz et al. (1990). Foi evidenciada uma variação diurna na produção de P4, com concentrações duas vezes superiores pela manhã (8h) do que à tarde (15h). Injeções de prolactina ovina em cadelas no diestro foram capazes de promover aumento significativo nas concentrações de P4. Não foi demonstrada variação diurna na produção de relaxina, prolactina e 17- β -estradiol. Bioatividade de relaxina foi detectada em extratos placentários e ovarianos de cadelas gestantes, sugerindo a dupla origem da relaxina em cadelas gestantes. Não foi demonstrada relação entre produção de relaxina e prolactina na cadela.

3.4 Luteólise

3.4.1 Aspectos Funcionais

A palavra luteal origina-se do latim *luteolus* e significa amarelo, enquanto lysis, do grego *lyo*, significa perda, dissolução ou quebra (Davis e Rueda, 2002).

Luteólise é o mecanismo de desintegração ou decomposição do corpo lúteo, processo no qual o CL sofre degeneração irreversível caracterizada por uma queda nas concentrações plasmáticas de P4, sendo que em muitas fêmeas domésticas a PGF2 α é responsável por este processo (Senger, 1999). Entretanto, em cadelas o papel da PGF2 α na luteólise do diestro é obscuro, assim como em sagüis, embora em ambas as espécies a PGF2 α possui ação luteolítica por via exógena (Concannon et al., 1977; Hoffmann et al., 1996; Fraser et al., 1999). Na luteólise dois eventos ocorrem: a perda da capacidade de síntese de P4 (luteólise funcional) e a perda das células que compõem o corpo lúteo (luteólise estrutural) (Niswender et al., 2000).

Rodgers et al. (1988) relataram que prostaglandinas são secretadas por células luteais bovinas. De acordo com Leymarie e Martal (1993), em primatas, ocorre secreção de PGF2 α no interior do ovário e a mesma age no corpo lúteo de maneira autócrina/parácrina.

Nas diversas espécies animais, a luteólise ocorre por ação da PGF2 α no corpo lúteo. Em espécies onde a secreção de PGF2 α ocorre no útero, caso não ocorra gestação e inibição da secreção de PGF2 α pelo concepto (Thatcher et al., 1997), a PGF2 α atinge o CL via circulação sistêmica, como nos eqüinos (Del Campo e Ginther, 1973), ou por um mecanismo de contra-corrente entre a veia útero-ovariana e a artéria ovariana, como ocorre em bovinos e ovinos (Ginther et al., 1973; Senger, 1999).

Em cadelas, estudos têm demonstrado não existir um fator luteolítico de origem uterina para causar luteólise (Hoffmann et al., 1992), não tendo sido demonstrada a

transferência de $\text{PGF2}\alpha$ no citado sistema arterial. Entretanto, de acordo com Del Campo e Ginther (1974), também em cadelas a associação entre a veia útero-ovariana com a artéria ovariana permitiria a passagem de $\text{PGF2}\alpha$.

As prostaglandinas são eicosanóides (compostos bioativos derivados de ácidos graxos com 20 carbonos), derivados da clivagem do ácido araquidônico, presente nas membranas celulares, por ação da enzima fosfolipase A_2 (PLA_2). Em bovinos, a ligação da ocitocina a receptores de células endometriais estimula a ação da fosfolipase C (PLC), que cliva fosfolipídios da membrana celular em diacilglicerol (DAG) e trifosfato inositol (IP3). O DAG e o IP3 agem como mensageiros secundários, ativam a proteína Kinase C (PKC) (Johnson et al., 1995), e aumentam a concentração intracelular de cálcio (Ca^{++}). A PKC e o cálcio estimulam a ação da fosfolipase A_2 (PLA_2), que dá início à cascata específica de produção de prostaglandinas (Burns et al., 1998). O ácido araquidônico é transformado em prostaglandina H_2 (PGH_2) pela ação da enzima prostaglandina H_2 -sintase (coloquialmente conhecida como ciclo-oxigenase 2), e a PGH_2 é convertida a $\text{PGF2}\alpha$ pela enzima prostaglandina $\text{F2}\alpha$ -sintase (Funk, 2001).

Em bovinos, as células epiteliais endometriais luminais são as principais responsáveis pela produção de $\text{PGF2}\alpha$ (Asselin et al., 1996), que atinge o ovário via mecanismo de contra-corrente (Ginther et al., 1973) e causa luteólise. Embora em cadelas a $\text{PGF2}\alpha$ possua ação luteolítica, quando aplicada por via exógena (Concannon e Hansel, 1977), o sítio de produção de $\text{PGF2}\alpha$ ainda não foi determinado (Hoffmann et al., 1996).

Em bovinos existem sinais anti-luteolíticos enviados pelo concepto ao endométrio para impedir a luteólise. O interferon-tau é responsável por regular a expressão gênica

de forma a atenuar a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio, favorecendo a manutenção do corpo lúteo em vacas prenhes (Thatcher et al., 1997; Binelli et al., 2000). Em cadelas, diferentemente, a ausência de gestação não interfere na duração do diestro (Chakraborty, 1987; Hoffmann et al., 1996; Onclin e Verstegen, 1997a,b).

A passagem pela circulação pulmonar é responsável pela inativação de aproximadamente 98% da $\text{PGF2}\alpha$ produzida, que é transformada em 13,14 diidro-15 ceto prostaglandina $\text{F2}\alpha$ (PGFM), em cães, gatos, ratos e cobaias (Piper et al., 1970). Assim, a produção de $\text{PGF2}\alpha$ é normalmente mensurada, *in vivo*, através de seu principal metabólito, a PGFM.

Graves et al. (1995) clonaram o receptor para $\text{PGF2}\alpha$ de células luteais de ovinos, e demonstraram que a expressão de RNAm para receptores de $\text{PGF2}\alpha$ é dependente da fase do ciclo, com grande expressão no meio do ciclo e baixa no momento da luteólise.

Irons et al. (1997) relataram a ocorrência de falha na luteólise com conseqüente prolongamento da gestação em cadela, a qual possuía 5 fetos no corno uterino esquerdo com 5 CLs no ovário ipsilateral, além de 1 CL no ovário contra-lateral. Os autores hipotetizaram que o corno uterino sem fetos poderia não ter produzido quantidade suficiente de $\text{PGF2}\alpha$ necessária para a lise do CL, e que mesmo que houvesse transporte de $\text{PGF2}\alpha$ do corno esquerdo ao direito, via anastomoses venosas (Del Campo e Ginther, 1974), a mesma poderia ter sido diluída no sangue deste corno uterino.

Onclin e Verstegen (1999) estudaram os efeitos do abortamento de cadelas com combinações de cloprostenol associado a agonistas dopaminérgicos (cabergolina ou

bromocriptina). Em todos os grupos tratados foi observado abortamento, queda das concentrações plasmáticas de P4, diminuição do intervalo interestro e manutenção da fertilidade.

Hori et al. (2002) demonstraram que o efeito luteolítico do fenprostalene em cadelas, um análogo de $\text{PGF2}\alpha$ de longa ação, é dose dependente, onde quanto maior a dose utilizada, mais rápido o declínio da P4 plasmática, e mais rápido o reaparecimento de estro. O intervalo tratamento-estro variou de 45 a 95 dias, em média, em função da dose utilizada, havendo diminuição do intervalo interestro. As taxas de prenhez no estro subsequente, nas cadelas tratadas com doses maiores (50-150 μg) foram inferiores às taxas de prenhez dos animais do laboratório dos autores, mas as taxas de prenhez das cadelas tratadas com doses inferiores (5-25 μg), foi similar (87,5%). Houve maior fertilidade nas cadelas que apresentaram estro dois meses após o tratamento, possivelmente devido ao tempo para reparação uterina.

Em cadelas, estudos demonstraram que a duração do diestro é semelhante à duração da gestação (Onclin e Verstegen, 1997b), que o corpo lúteo na primeira metade da fase luteal é independente de suporte gonadotrófico e na segunda metade dependente de LH e de prolactina (Hoffmann et al., 1996), que a $\text{PGF2}\alpha$ é luteolítica nesta espécie (Concannon e Hansel, 1977), e que a placenta não se constitui um sítio de produção de $\text{PGF2}\alpha$ (Nishiyama et al., 1999). Entretanto, a produção *in vivo* de $\text{PGF2}\alpha$ ao longo da fase luteal e *in vitro* através de cultivos de explantes de tecidos, ainda não foi investigada.

No final da gestação, eventos fisiológicos controlam o desencadeamento do parto. Há necessidade da remoção do bloqueio progesterônico para que ocorram

contrações miométriais, expulsão fetal e placentária. Em ovinos, o cortisol fetal produzido em estímulo ao ACTH fetal promove a síntese de enzimas que convertem a P4 em estradiol. Ocorre desta maneira a síntese de $\text{PGF2}\alpha$ que ajuda no mecanismo de luteólise e queda das concentrações plasmáticas de P4 (Senger, 1999).

As prostaglandinas foram identificadas como mediadores-chave em eventos do parto, como na abertura cervical, contratilidade uterina, ruptura de membranas, circulação sanguínea uteroplacentária e adaptação fetal ao processo do parto. Recentes evidências têm sugerido que o aumento da produção fetal de corticóides aumenta diretamente a produção intra-uterina de prostaglandinas e o início do parto (Whittle et al., 2001).

Concannon et al. (1988) evidenciaram o aumento nas concentrações de $12,13$ dihidro-15ceto-prostaglandina $\text{F2}\alpha$ (PGFM) concomitante à diminuição das concentrações de P4 no pré-parto de cadelas, evidenciando o envolvimento da $\text{PGF2}\alpha$ na luteólise pré-parto. Após o nascimento do último filhote, as concentrações declinaram, e não foi observada relação entre tamanho de ninhada e concentração de PGFM.

Concannon et al. (1989) enfatizaram que na cadela os eventos do parto não são idênticos aos eventos nos ruminantes. Na cadela ocorre um rápido declínio da P4 24-36 horas pré-parto, com moderada ou nenhuma elevação do estrógeno. Desta forma, e também por não haver produção placentária de estrógeno no final da gestação, não se pode explicar a liberação de prostaglandinas na cadela como sendo um mecanismo similar ao descrito para ovinos e outros ruminantes (Concannon et al., 2001). Os autores afirmaram que a queda das concentrações plasmáticas de P4 refletem lise do

corpo lúteo, mas que alterações no metabolismo da P4 possam estar envolvidos. No dia anterior ao parto (24 horas), as concentrações de cortisol estão elevadas (40-80 ng/mL) e declinam no momento do parto (10-25 ng/mL).

Desta forma, o cortisol poderia agir direta ou indiretamente, alterando a produção esteroidal na placenta, para promover a liberação de quantidades luteolíticas de $\text{PGF2}\alpha$ placentária ou uterina, já que não ocorre aumento agudo de estrógeno no pré-parto (Concannon et al., 1977; Concannon et al., 1978; Concannon et al., 2001).

Os corticóides parecem aumentar as enzimas sintetizadoras de prostaglandina no âmnion e córion de primatas, pela expressão da prostaglandina-sintetase, direta ou indiretamente, pela ação intermediária de um efector parácrino como o fator liberador de corticotrofina. Logo, o cortisol parece suprimir a 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase e assim reduzir o catabolismo da prostaglandina nestes tecidos. Mecanismo semelhante pode ocorrer na cadela (Concannon et al., 2001).

Hoffmann et al. (1996) estudaram a capacidade da indometacina em bloquear a ciclo-oxigenase, com conseqüente inibição da produção de $\text{PGF2}\alpha$ em cadelas (n=4) no pré-parto. As concentrações de P4 permaneceram inalteradas e as concentrações de PGFM no limite inferior de detecção.

Estudos através de cultivos *in vivo* e *in vitro* de tecidos têm sido realizados para estudo da função luteal em várias espécies. Olson et al. (1984b) demonstraram um aumento de PGE_2 *in vitro* no endométrio de cadelas no D15 da gestação, diferentemente de cadelas em diestro no mesmo período, e especularam a possibilidade desta substância possuir função luteotrófica na cadela gestante. As concentrações de $\text{PGF2}\alpha$ foram similares no plasma e endométrio, entre cadelas

gestantes e no diestro, entretanto as concentrações de $\text{PGF2}\alpha$ no plasma obtido de veia uterina foram superiores ao plasma obtido de jugular.

Jarry et al. (1990) demonstraram em sistema de microdiálise *in vivo*, a produção pelo corpo lúteo suíno de P4 e ocitocina, com episódios de secreção de P4 coincidindo com a secreção de ocitocina e a ocitocina estimulando a secreção de P4 e de E_2 , de forma dose-dependente. Foi descrito também estímulo também de E_2 sobre a produção de P4.

Em corpos lúteos bovinos submetidos à microdiálise, ocorre estímulo da $\text{PGF2}\alpha$ para produção de P4 e de ocitocina, enquanto a PGI_2 inibe a secreção hormonal em baixas doses, mas estimula em doses altas (Miyamoto et al., 1993).

Buhi et al. (1992) demonstraram não haver diferenças no padrão de proteínas secretórias entre cadelas gestantes e em diestro, mas com variação entre os dias estudados da fase luteal (D3, D7 e D10).

3.4.2 Aspectos Morfológicos e Atividade de Caspase-3

Estudos de microscopia eletrônica de Abel et al. (1975) demonstraram não haver diferenças morfológicas entre CLs de cadelas gestantes e em diestro, durante o período de formação e de regressão luteal. Os primeiros sinais de regressão luteal, por volta do D28, coincidiram com a queda das concentrações de P4, presença de grandes gotas de

lipídio intra-citoplasmáticas, grandes corpos densos ao redor do complexo de Golgi, mitocôndrias que perderam o formato pleomórfico e com crista túbulo-vesicular reduzida em número e gradualmente retornando ao formato lameliforme. Ao redor do D45, núcleos picnóticos, gotas de lipídio fusionadas ou parcialmente digeridas, grandes corpos densos e autofagossomas apresentavam-se presentes em toda a célula. Todavia, o colapso do complexo de Golgi e do retículo plasmático liso não foi visualizado até a metade do anestro.

Dore (1989) demonstrou que no dia 60 após o pico de LH, os corpos lúteos de cadelas apresentavam características de regressão funcional, com acúmulo de lipídios. Aos 120 dias pós pico de LH os corpos lúteos apresentavam células intactas com acúmulo de lipídios, e aos 180 dias as células apresentavam características de autólise e invasão por macrófagos. Entretanto, a autora citou que a luteólise funcional estava completa no dia 120, e a luteólise estrutural teve grande avanço no dia 180, e completou-se no dia 240.

Em várias espécies animais e no homem, o mecanismo de apoptose está envolvido na regulação da luteólise (Juengel et al., 1993; Shikone et al., 1996; McComarck et al., 1998; Rueda et al., 1999), entretanto, até o presente momento, não há relatos para a espécie canina.

Apoptose, ou morte celular programada, é o suicídio ordenado de células na ausência de uma reação inflamatória, e deve ocorrer em resposta a eventos fisiológicos que regulam a homeostasia. Uma das reações iniciais associadas à apoptose é a ativação de endonucleases cálcio-magnésio dependentes, resultando em clivagem do DNA celular em fragmentos de 185-200 bases nos sítios internucleossomais (Terranova

e Taylor, 1999). Ela envolve processos morfológicos e bioquímicos bem organizados caracterizados por vesiculações (“blebbing”) de membrana, retração celular, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos (Johnson e Bridgham, 2002).

Em humanos, as proteínas da família Bcl-2 estão envolvidas no processo de apoptose. São onze proteínas, dentre as quais algumas promovem a apoptose e algumas regulam negativamente o processo. Estas proteínas regulam a liberação de citocinas do Citocromo C mitocondrial com conseqüente ativação de caspases (proteases ICE-like, Ich-1 e Yama/CPP32). A caspase ICE cliva CPP32 em sub-unidades 17 e 12-Kda da enzima, e CPP32 ativa realiza a clivagem e inativação da poly-ADP-ribose-polimerase (PARP). Como a polimerase PARP suprime a ação de endonucleases cálcio-magnésio dependentes, a sua inativação favorece a clivagem internucleossômica de DNA, observada na apoptose (Terranova e Taylor, 1999).

A caspase-3 é uma proteína de vertebrados, homóloga à existente em genes que codificam a morte celular no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Terranova e Taylor, 1999). Rueda et al. (1999) estudaram o envolvimento da caspase-3 no processo de luteólise em ovinos e concluíram que a família das caspases se expressa durante a luteólise, e que esta ocorre, em parte, por expressão destas proteases.

Sawyer et al. (1990) pesquisaram as alterações nucleares de células luteais de ovinos, com ou sem aplicação de PGF2 α . A ocorrência de células com núcleos condensados e/ou marginação nuclear não ocorreu de forma sincrônica nos diferentes grupos de animais, havendo células normais ou com alterações nucleares independentemente do momento examinado.

Juengel et al. (1993) estudaram a ocorrência de apoptose durante a regressão luteal espontânea e induzida por PGF2 α em bovinos. Os autores não observaram

fragmentos de DNA internucleossômicos em corpos lúteos de vacas que estavam nos dias 10 ou 15 do ciclo estral (estro = dia 0), mas os mesmos foram observados nas células luteais de vacas no dia 19. No grupo tratado com PGF2 α , foi observada a presença de fragmentos de DNA quando a ovariectomia foi realizada 24 ou 48 horas após a aplicação de PGF2 α , mas não nos ovários após 12 horas da aplicação. A formação de oligonucleossomos não foi aparente até que as concentrações de P4 começaram a decrescer.

Shikone et al. (1996) sugeriram que a regressão luteal em humanos deve ser mediada por apoptose, já que observaram aumento significativo de clivagem apoptótica de DNA em corpos lúteos, do meio da fase luteal para o final, mas sem o mesmo padrão para corpos lúteos no início do período gestacional.

Wuttke et al. (1997) demonstraram ação do TNF- α no processo de apoptose de células luteais de suínos. Os autores demonstraram que a produção de TNF- α por macrófagos pode ser estimulada pela PGF2 α e que esta citocina possui efeito inibitório direto sobre a função luteal e na estrutura do corpo lúteo.

Yuan e Giudice (1997) estudaram a ocorrência de apoptose em folículos em diferentes estágios de maturação e em corpos lúteos humanos. Sinais de fragmentação de DNA foram observados em folículos dominantes e em corpos lúteos em degeneração, mais precocemente nas células luteais grandes.

McComarck et al. (1998) evidenciaram a ocorrência de apoptose na luteólise de hamsters. Os sinais mais precoces de luteólise estrutural foram detectados no dia 3 do ciclo estral. Os autores mostraram através de eletroforese em gel de agarose que ocorreu separação de fragmentos internucleossômicos de DNA durante a luteólise

espontânea nesta espécie.

Carambula et al. (2002) em estudos com camundongas de linhagens normais ou caspase-3 deficientes, demonstraram haver necessidade funcional da caspase-3 para a apoptose na regressão luteal, mas que a mesma não é mediadora da diminuição da esteroidogênese associada à luteólise. Foi observada queda das concentrações de P4 em ambas as linhagens.

ESTUDO 1

CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE 13,14-DIIDRO-15-CETO-PROSTAGLANDINA F2-ALFA (PGFM), PROGESTERONA E ESTRADIOL EM CADELAS GESTANTES E EM DIESTRO

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Animais

Foram utilizadas 17 cadelas adultas, sem-raça-definida (SRD), clinicamente saudáveis, com peso entre 5 e 40 Kg. Os animais foram mantidos em canis individuais, com alimentação comercial e água *ad libitum*. Uma cadela que apresentou padrão diferente das demais foi designada de animal “P”.

4.1.2 Grupos Experimentais

As cadelas foram divididas em dois grupos experimentais:

Grupo 1 (Cadelas gestantes, n=8);

Grupo 2 (Cadelas em diestro, n=9)

As fêmeas do grupo 1 foram identificadas no proestro pela detecção de edema vulvar e/ou presença de secreção vaginal sero-sanguinolenta. A partir deste dia, realizou-se exame de citologia vaginal diariamente até a detecção de 80-100% de células do tipo superficial. As cadelas foram acasaladas ou inseminadas artificialmente, a cada 48 horas, até o final do estro (Holst e Phemister, 1974; Concannon & DiGregorio, 1986). O diagnóstico de gestação foi realizado por meio de exame ultra-sonográfico (Pie-Medical Scanner 480), aos 25 dias após a primeira cobertura ou inseminação artificial, com identificação das vesículas embrionárias.

As fêmeas do grupo 2 não foram acasaladas e tiveram seu ciclo acompanhado por citologia vaginal, até a detecção do primeiro dia do diestro citológico (Concannon & DiGregorio, 1986).

O pico pré-ovulatório de LH (dia zero do ciclo) foi estimado de forma subjetiva, utilizando-se o exame de citologia vaginal, onde a partir da identificação do diestro citológico, retrocedeu-se oito dias (Concannon, 2000).

4.1.3 Obtenção das Amostras Seriadas de Plasma para as Dosagens Hormonais

Para as dosagens hormonais dos animais de ambos os grupos, amostras de sangue foram colhidas através de venopunção da jugular. A partir do dia 10 do ciclo (Grupos 1 e 2), as amostras de sangue foram colhidas a cada 5 dias, passando a colheita a ser diária nos 10 dias anteriores à realização da ovariosalpingohisterectomia (OSH), e a cada 6 horas nas 72 horas antecedentes e 24 horas após a OSH, nos horários 8h, 14h, 20h e 2h. As cadelas gestantes foram submetidas a OSH por método

convencional (Fossum, 2001) aos 63 dias de gestação (n=2), 64 dias de gestação (n=3) ou imediatamente após o parto (n=3), sendo o pico de LH estimado = dia zero. As cadelas em diestro foram submetidas a OSH aos 65 dias (n=3), 75 dias (n=3) ou 85 dias (n=3) do diestro, sendo o pico de LH estimado = dia zero.

Após cada colheita de sangue, as amostras de sangue foram centrifugadas (centrífuga modelo Fanem) por 15 minutos a 600xG, o plasma retirado com auxílio de pipetadora automática, aliquotado em microtubos de 1,5 mL e congelado a -20°C para posterior dosagem hormonal por radioimunoensaio (RIE). Para as dosagens de estradiol, foram utilizadas as amostras do dia 40 da gestação ou diestro, até o dia 66.

4.1.4 Radioimunoensaios de PGFM

Os ensaios hormonais para mensuração de 13,14 dihidro-15 ceto-prostaglandina F2 α (PGFM) foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM) da FMVZ-VRA-USP.

4.1.4.1 Obtenção de Plasma Canino Livre de Prostaglandinas (PCLP)

Para a mensuração plasmática de PGFM de cadelas, pela técnica de radioimunoensaio, fez-se necessária a obtenção de plasma canino livre de prostaglandinas (PCLP - plasma controle). Para tal, foram utilizadas três cadelas SRD,

tratadas com flunixin meglumine (Banamine - Schering-Plough®), na dose de 1 mg/Kg, por via intramuscular, uma vez ao dia, durante três dias (Andrade, 2002), com o objetivo de inibir a síntese endógena de prostaglandinas. Duas bolsas de 500 mL de transfusão sanguínea foram colhidas por venopunção da jugular de cada fêmea, uma hora após a terceira aplicação de flunixin meglumine. O sangue foi transferido para tubos de ensaio e foi realizada a centrifugação por 15 minutos a 600xG. O plasma das três cadelas foi homogeneizado para obtenção de um “pool”, e foi acondicionado em tubos plásticos de 50 mL (tubos Falcon®) e armazenado a -20°C.

4.1.4.2 Preparo das Referências de 13,14 dihidro-15ceto-prostaglandina F2 α (PGFM) em Plasma Canino

As referências utilizadas nos ensaios, para avaliação dos coeficientes inter-ensaios, foram preparadas previamente a fim de se obter as concentrações de 100 e 1000 pg/mL (ou seja, baixa e alta) de PGFM (Sigma – D4143), por diluição da solução estoque padrão de PGFM (1 μ g/mL), em plasma canino livre de prostaglandinas (PCLP). As alíquotas de referências (700 μ L) foram armazenadas a - 20°C.

4.1.4.3 Técnica de Diluição e Determinação da Capacidade de Ligação do Anticorpo Anti-PGFM (Teste de “Binding”)

O anticorpo utilizado nos radioimunoensaios de PGFM foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. William W. Thatcher, da Universidade da Flórida - EUA. O anticorpo anti-PGFM

foi armazenado liofilizado e acondicionado a - 70°C. No momento do uso, e seguindo as instruções do doador, o mesmo foi reconstituído em 500 µl de água destilada e deionizada. A diluição final foi feita a fim de se obter uma solução de anticorpo em Tris-HCl na concentração necessária para se obter 30% de ligação específica antígeno-anticorpo (“specific binding”).

Validação: a técnica utilizada para mensuração de PGFM de cadelas foi validada a partir de técnica utilizada para a espécie bovina (Meyer et al., 1995). Foi realizada validação do ensaio de PGFM com uso de testes de paralelismo para verificar a influência do volume da amostra (30 a 300 µL) na eficiência do ensaio e o paralelismo das curvas com diferentes concentrações de PGFM acrescidas de plasma controle bovino ou canino. Foram testadas as seguintes diluições de anticorpo anti-PGFM: 1:4000, 1:6000, 1:8000, 1:10000 e 1:12000.

4.1.4.4 Técnica de Determinação da Concentração de 13,14 dihidro-15ceto-prostaglandina F2 α (PGFM) no Plasma Canino por Radioimunoensaio (RIE)

A técnica de radioimunoensaio utilizada foi descrita por Meyer et al. (1995) (Anexo 6.1). O resultado das leituras, expresso em DPM's (desintegrações por minuto), foi transferido para uma planilha do programa “Quatro Pro” (Corel). Este programa

monta uma curva padrão que é utilizada para transformar os dados em DPM's para pg/mL de PGFM. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 21,00% e o coeficiente de variação inter-ensaio foi de 20,48%.

4.1.5 Radioimunoensaios de Progesterona

Os ensaios para dosagens de progesterona foram realizados no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP - Campus de Botucatu. Foram utilizados “kits” comerciais de radioimunoensaio em fase sólida, sem extração química ou processo de purificação (Diagnostics Procedure Corporation – progesterone Coat-a-Count, Los Angeles, USA), validado para plasma canino (Srikandakumar et al., 1986). As dosagens foram realizadas de acordo com a recomendação do fabricante. A cada 70 tubos de amostras e no final de cada ensaio, foram colocados tubos controle, em duplicata, com os internos de 0,5 ng/mL e 20 ng/mL (controles C e F), para cálculo dos coeficientes de variação intra e inter-ensaio. As contagens foram realizadas em contador Gamma (modelo Packard). Todas as amostras foram mensuradas em duplicata. Os coeficientes de variação inter e intra-ensaio foram 8,45% e 10,75%, respectivamente.

4.1.6 Radioimunoensaios de Estradiol

O ensaio para dosagem de 17- β -estradiol foi realizado no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) da FMVZ–VRA–USP. Foram utilizados “kits” comerciais de 17- β -estradiol 3ª geração (Diagnostic Systems Procedure – DSL – Texas, USA), sem extração química ou processo de purificação. As dosagens foram realizadas de acordo com a recomendação do fabricante. A cada 30 tubos de amostras e no final do ensaio, foram colocados tubos controle de 5 pg/mL e 50 pg/mL, em duplicata, para cálculo do coeficiente de variação intra-ensaio. As contagens foram realizadas em contador Gamma (Packard). Todas as amostras foram mensuradas em duplicata. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 6,10%.

4.1.7 Análise Estatística

- **PGFM e P4**

As concentrações plasmáticas de PGFM e P4 foram analisadas e não se mostraram adequadas quanto à normalidade de resíduos (Teste de Shapiro-Wilk, $P \leq 0,01$) e homogeneidade de variâncias (Teste F, $P \leq 0,01$). Os dados foram então transformados por raiz quadrada e reanalisados. Tal transformação adequou os dados à análise de variância (Shapiro-Wilk e F; $P \geq 0,01$). Os efeitos de estado reprodutivo

(diestro ou gestação), dia, animal e suas interações foram analisados por ANOVA utilizando-se o proc GLM e o proc MIXED do programa SAS (SAS Institute, 1988). O teste de “slice” foi feito para se comparar as médias dos tratamentos dentro de uma mesma fração de tempo. Os dados foram apresentados como LSMeans $\pm$ EPM, não transformados. Para análise estatística das médias, foi utilizado um valor diário das concentrações de P4 e PGFM, através da amostra das 8 horas. Em todos os testes estatísticos, o nível de significância mínimo considerado foi de 5% ($P \leq 0,05$).

- **Estradiol**

Os dados foram analisados e mostraram-se adequados quanto à normalidade de resíduos (Teste de Shapiro-Wilk, $P > 0,01$) e homogeneidade de variâncias (Teste F, $P > 0,01$). Os efeitos de “status” reprodutivo, dia, animal e suas interações foram analisados por ANOVA utilizando-se o proc GLM e o proc MIXED do programa SAS (SAS Institute, 1988). O teste de “slice” foi feito para se comparar as médias dos tratamentos dentro de uma mesma fração de tempo. Os dados foram apresentados como LSMeans $\pm$ EPM, não transformados. Em todos os testes estatísticos, o nível de significância mínimo considerado foi de 5% ($P \leq 0,05$).

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 PGFM

Validação: Os valores de capacidade de ligação encontrados para as diluições de anticorpo anti-PGFM 1:4000, 1:6000, 1:8000, 1:10000 e 1:12000 foram 41,9%, 30,4%, 23,7%, 21,1% e 17,4%, respectivamente. A diluição determinada como a mais adequada foi estipulada em 1:7000 (capacidade de ligação ~ 30%). Desta forma, esta diluição foi utilizada nos ensaios subseqüentes. Os testes de validação evidenciaram paralelismo das curvas com diferentes concentrações de PGFM acrescidas de plasma controle bovino ou canino, e nos diferentes volumes de amostras testados (Figura 1).

Diestro: através da análise da Figura 2, pode-se notar que a concentração máxima de PGFM no diestro foi de $902,70 \pm 145,97$ pg/mL, e ocorreu no dia 15 após o pico de LH. No início do diestro foram observadas altas concentrações de PGFM, até por volta do dia 25. Do dia 30 em diante, as concentrações foram inferiores à primeira metade (efeito de dia, $P < 0,05$) (Tabela 1; Figura 2).

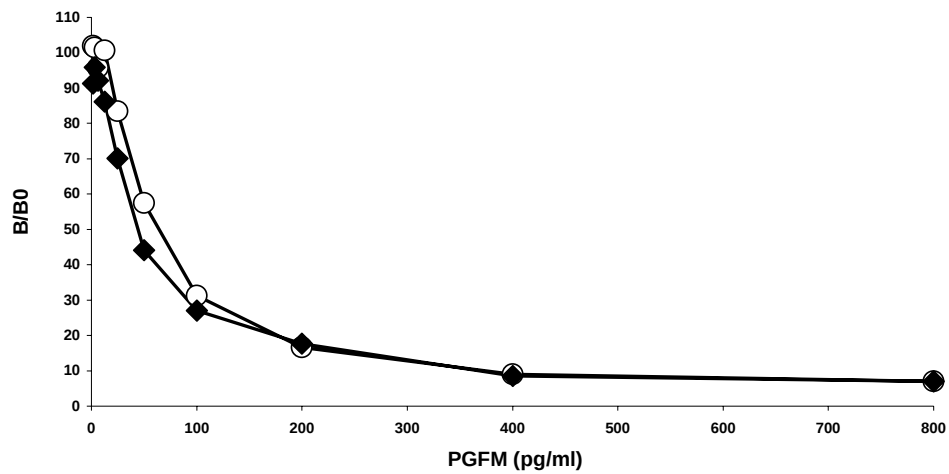


Figura 1: Porcentagem de ligação (B/B0) de amostras de plasma bovino ou canino contendo concentrações crescentes de PGFM. ○ = B/B0 em plasma controle bovino; ◆ = B/B0 em plasma controle canino.

Tabela 1 - Análise de variância das concentrações plasmáticas de PGFM de cadelas no diestro.

Fonte de variação	GL	Pr > F
Dia	42	0,05

* $r^2 = 0,27$

** dados transformados por raiz quadrada

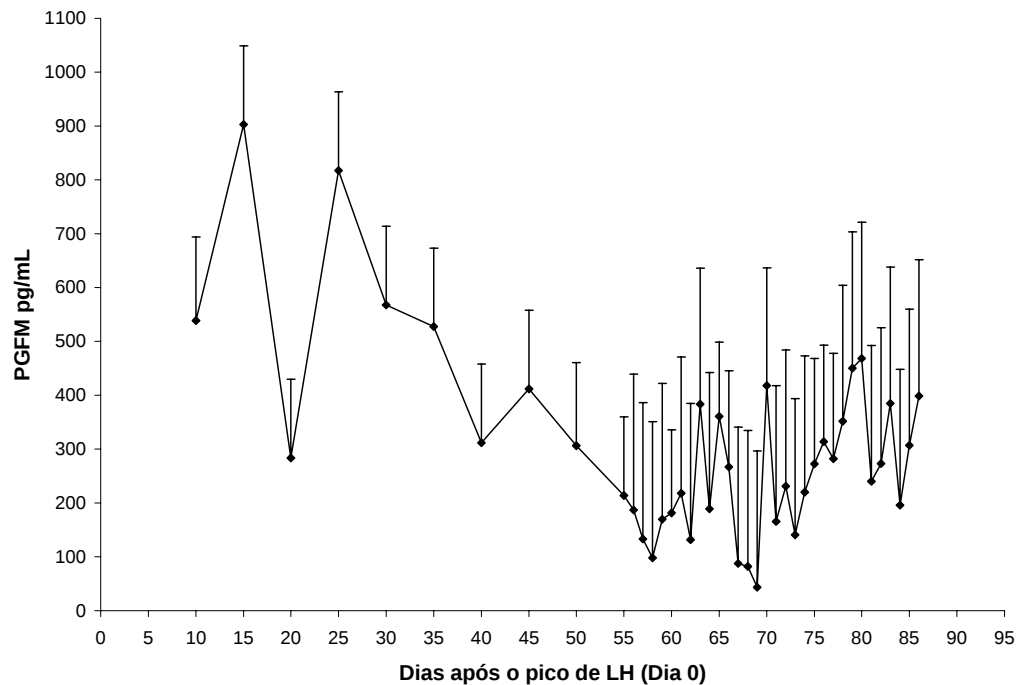


Figura 2 – Médias das concentrações plasmáticas de PGFM de cadelas ao longo do diestro (D10 a 86). O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; (Lsmeans $\pm$ EPM).

Embora a análise da Figura 2 tenha evidenciado maiores concentrações de PGFM no dia 15, observou-se que algumas cadelas apresentaram concentrações similares de PGFM ao longo do diestro e outras apresentaram concentrações máximas de PGFM em dias variados na primeira metade do diestro (Figura 6).

A prolactina possui um papel luteotrófico em cadelas; entretanto, durante o diestro as concentrações desse hormônio são inferiores às da gestação (Onclin e Verstegen, 1997b). A relaxina é um hormônio específico da gestação, e não é produzido durante o diestro (Steinetz et al., 1989; Buff et al., 2001). Trabalho de Concannon et al. (1975) demonstrou que as concentrações de estradiol são baixas ao longo do diestro, embora Onclin e Verstegen (2002) tenham encontrado altas concentrações ao longo de todo o diestro (Onclin et al., 2002).

Embora Olson et al. (1984a) e Hoffmann et al. (1992) tenham sugerido que a função luteal pode não ser controlada pela função uterina, em algumas cadelas desse estudo verificou-se um pico de secreção de PGFM observado no início do diestro (Figuras 2 e 3). Este pico poderia ser responsável pelo início da queda nas concentrações plasmáticas de P4 (luteólise funcional) observada entre os dias 10 e 30, em cadelas.

Em várias espécies animais, após a liberação de PGF2 α pelo endométrio, ocorre luteólise funcional, com queda das concentrações plasmáticas de P4 em aproximadamente 48 horas, e manifestação de estro (Senger, 1999). Tal fato não é observado em cadelas por mecanismo endógeno, e mesmo com uso exógeno de análogos de PGF2 α , ocorre queda da P4, mas sem desencadeamento de estro eminente (Hori et al., 2002). É possível, portanto, hipotetizar que em cadelas haja necessidade de uma concentração mínima de prostaglandina F2 α que, quando liberada, mesmo sem desencadear um pico, é capaz de influenciar a produção de P4 luteal.

Gestação: nas cadelas gestantes, foi observado aumento crescente das concentrações de PGFM ao longo do tempo, com a ocorrência de um pico de liberação pré-parto (efeito de dia altamente significativo, $P < 0,01$) (Tabela 2; Figura 3). A concentração máxima de PGFM na gestação foi de $7941,00 \pm 950$ pg/mL, e ocorreu em média no dia $63,37 \pm 6,3$. Entretanto, a análise em conjunto dos dados forneceu valor corrigido pelo modelo do SAS, conforme pode ser observado na Figura 3.

Tabela 2 - Análise de variância das concentrações plasmáticas de PGFM de cadelas gestantes.

Fonte de variação	GL	Pr > F
Dia	20	0,01

* $r^2 = 0,42$

** dados transformados por raiz quadrada

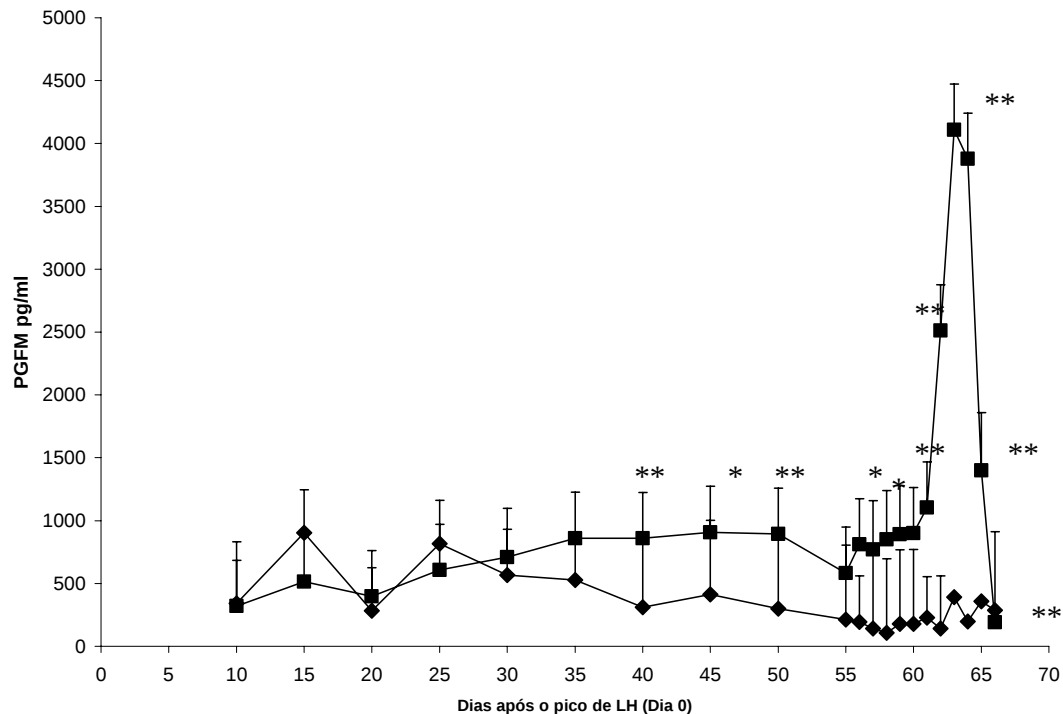


Figura 3 – Médias das concentrações plasmáticas de PGFM de cadelas ao longo da gestação e do diestro. O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; (Lsmeans $\pm$ EPM). $\blacklozenge$ = diestro; $\blacksquare$ = gestação.

* médias dos estados reprodutivos diferiram ($P \leq 0,1$);

** médias dos estados reprodutivos diferiram ($P \leq 0,05$).

No presente estudo houve necessidade de concentrações crescentes de PGFM na segunda metade da gestação, para ocorrência de um aumento final no período pré-parto.

Na segunda metade da gestação há altas concentrações plasmáticas de prolactina (Onclin et al., 2002). A manutenção da gestação é dependente de suporte

hipofisário (Okkens et al., 1990; Onclin et al., 1997a), e as concentrações de relaxina estão altas (Steinetz et al., 1989; Concannon et al., 1996; Buff et al., 2001). Há também necessidade de produção de PGF2 α pré-parto para que ocorra queda da P4 plasmática com diminuição da temperatura corporal (Concannon e Hansel, 1977), contração miometrial e expulsão fetal (Concannon et al., 1989).

Desta forma, é possível que o estradiol, de origem folicular e/ou luteal, e a ocitocina, hipofisária e/ou luteal, regulem a secreção de prostaglandina F2 α que ocorre neste período. Em bovinos, injeções de estradiol no final da fase luteal são capazes de desencadear a liberação de PGF2 α pelo endométrio, possivelmente pela estimulação da produção e/ou ativação dos receptores de ocitocina (Castro e Paula, 2003).

Diestro x Gestação: a análise das concentrações de PGFM ao longo do diestro e da gestação (Figura 3) demonstrou que após o dia 35 ocorreu um aumento gradativo da secreção de PGFM nas cadelas gestantes, que culminou com a ocorrência do pico pré-parto. Nas cadelas em diestro, após o dia 35, ocorreu decréscimo progressivo na produção de PGFM, e após o dia 55 as concentrações mantiveram-se inferiores a 500 pg/mL (efeito da interação estado reprodutivo x dia até D65, $P < 0,01$) (Tabela 3).

Esta maior liberação de PGF2 α no final da gestação ocorre presumivelmente pela ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal fetal, embora não se saiba se os corticóides, na cadela, possam aumentar a secreção de PGF2 α (Concannon et al., 2001).

Tabela 3 - Análise de variância das concentrações plasmáticas de PGFM de cadelas gestantes e em diestro, até o D65.

Fontes de variação	GL	Pr > F
Estado Reprodutivo	1	0,01
Cadela (estado reprodutivo)	15	0,01
Dia	22	0,01
Status x dia	20	0,01

* $r^2 = 0,57$

** dados transformados por raiz quadrada

4.2.2 Progesterona

A concentração máxima de P4 no diestro foi de $32,93 \pm 3,9$ ng/mL, e ocorreu no dia 15 (Figura 4). A concentração basal de P4 no diestro (dia em que a concentração de $P_4 < 1$ ng/mL; Onclin e Verstegen, 1997b) foi atingida em média no dia 66.

No trabalho de Onclin e Verstegen (1997b) a concentração de P4 atingiu um platô no dia 7, com manutenção de concentrações elevadas por três semanas e posterior decréscimo. Estes autores colheram amostras diárias das cadelas desde o final do anestro, o que permitiu a padronização dos momentos exatos em que ocorreu aumento, platô, ou decréscimo das concentrações hormonais. No presente estudo, as amostras foram colhidas a partir do dia 10 após o pico de LH estimado, e assim foi possível detectar apenas o momento em que a P4 já havia atingido sua concentração máxima.

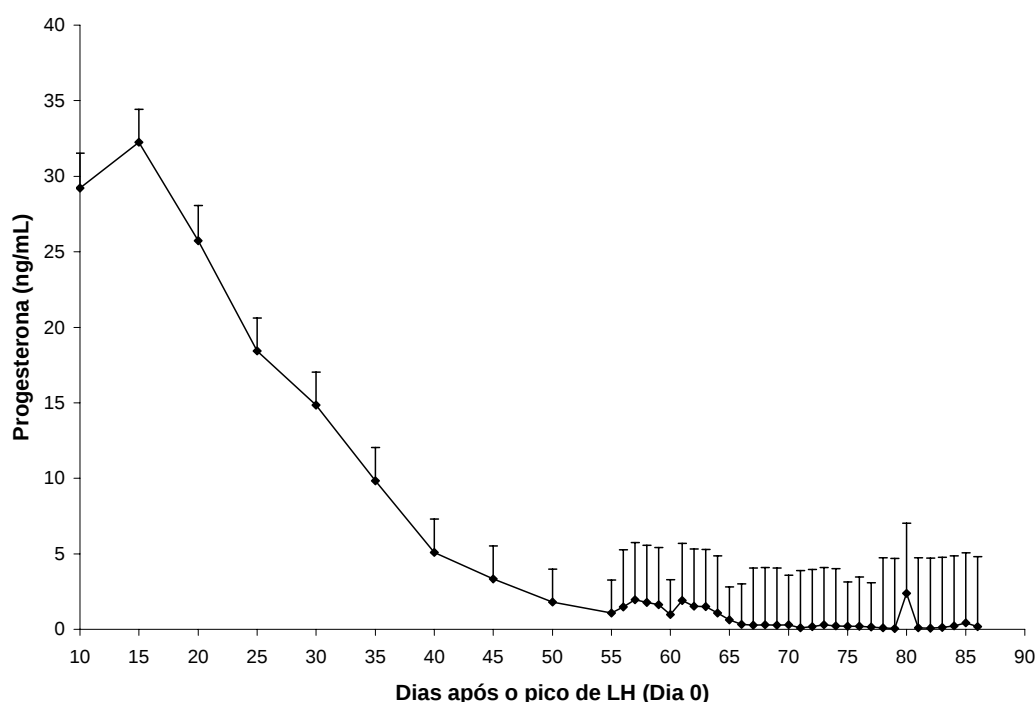


Figura 4 – Médias das concentrações plasmáticas de progesterona de cadelas no diestro. O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; (Lsmeans $\pm$ EPM).

A concentração máxima de P4 encontrada nesse estudo ($32,93 \pm 3,9$ ng/mL) não diferiu das concentrações citadas por Onclin e Verstegen (1997b), de $35,10 \pm 2,6$ ng/mL, mas diferiu de Chakraborty (1987) que encontrou média de concentrações máximas de $10,5 \pm 0,9$ ng/mL.

Ao contrário de Onclin e Verstegen (1997b), e de acordo com Concannon et al. (1975), Nett et al. (1975) e Chakraborty (1987), no presente trabalho foram observadas variações individuais no pico máximo de P4 entre as cadelas (Figura 6), com concentração mínima e máxima de 14,83 e 50,16 ng/mL, respectivamente.

Vários fatores podem ter interferido nesta secreção individual de P4. Esta variação entre animais pode refletir uma diferente capacidade de esteroidogênese, taxas diferentes de captação de colesterol, ou diferença na biotransformação intracelular, embora Spies et al. (1974) tenham demonstrado haver mudança na sensibilidade das células que secretam P4 mesmo com estímulo constante.

É possível ainda que, embora a alimentação das cadelas fosse padronizada, tenha ocorrido também diferentes taxas de metabolização entre esses animais, como ocorre em bovinos de leite que recebem grandes quantidades de suplementação na ração. Uma taxa alta de metabolização hepática de P4 e estradiol tem sido observada em vacas muito suplementadas (Sangsritavong et al., 2001). Essa variação individual também pode ter sido pelo uso de cadelas sem-raça-definida, de vários tamanhos, com folículos pré-ovulatórios de diversos diâmetros e corpos lúteos com massa luteal variada.

Concentrações basais de P4 foram observadas em média no dia 66 do diestro, semelhante aos estudos de Onclin e Verstegen (1997b), que encontraram concentrações basais no dia 67. Mas diferiu dos trabalhos de Smith e McDonald (1974) e Chakraborty (1987), que evidenciaram concentrações elevadas de P4 até o dia 80 do diestro. Com o intuito de determinar o comprimento do diestro, no presente estudo as colheitas em um grupo de cadelas (D85; n=3) foram realizadas até o dia 85 após o pico de LH. Entretanto, as avaliações demonstraram que as concentrações de P4 alcançaram valores basais em média no dia 66.

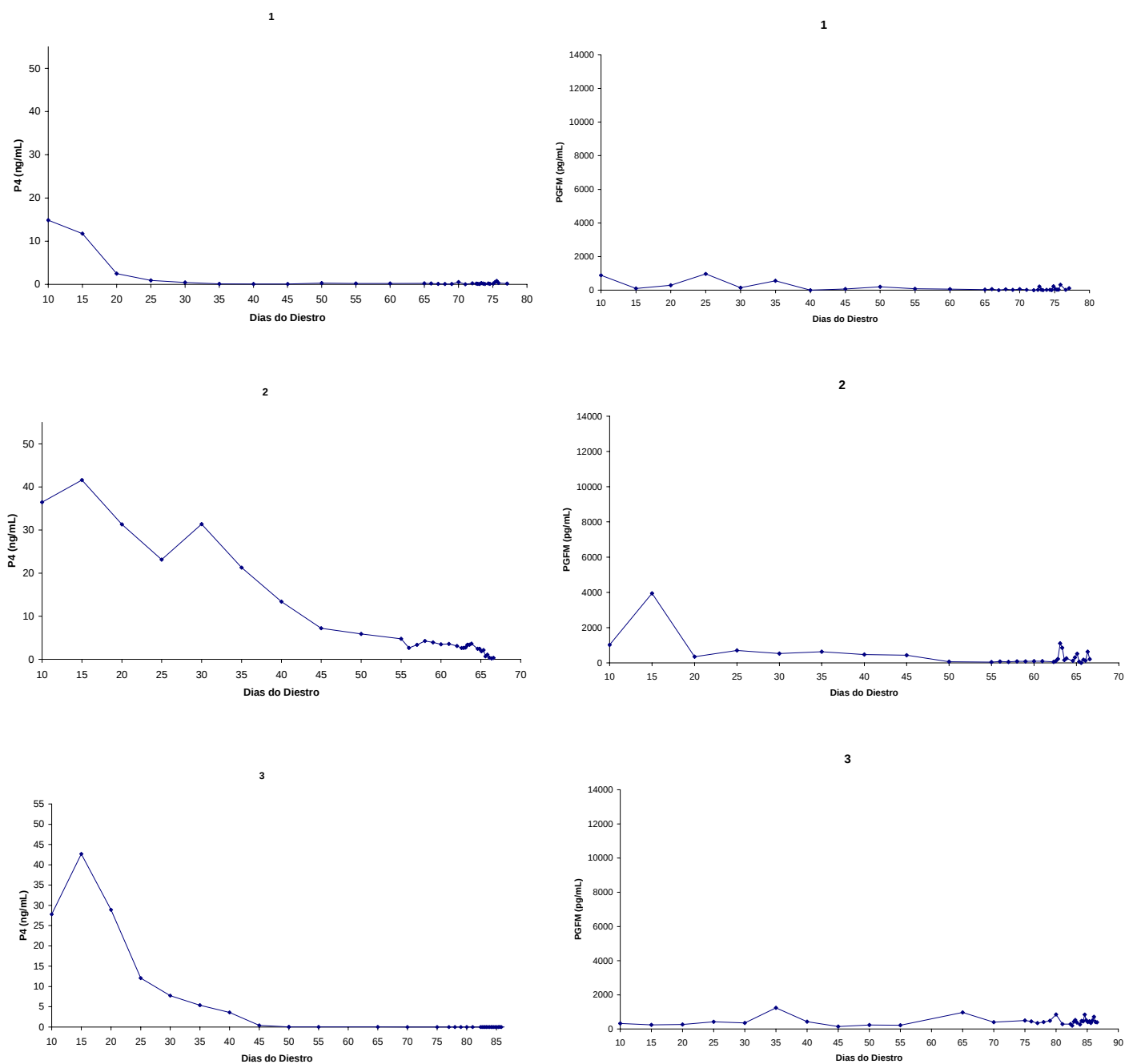


Figura 5 – Perfis individuais de secreção de P4 e PGFM em cadelas no diestro.

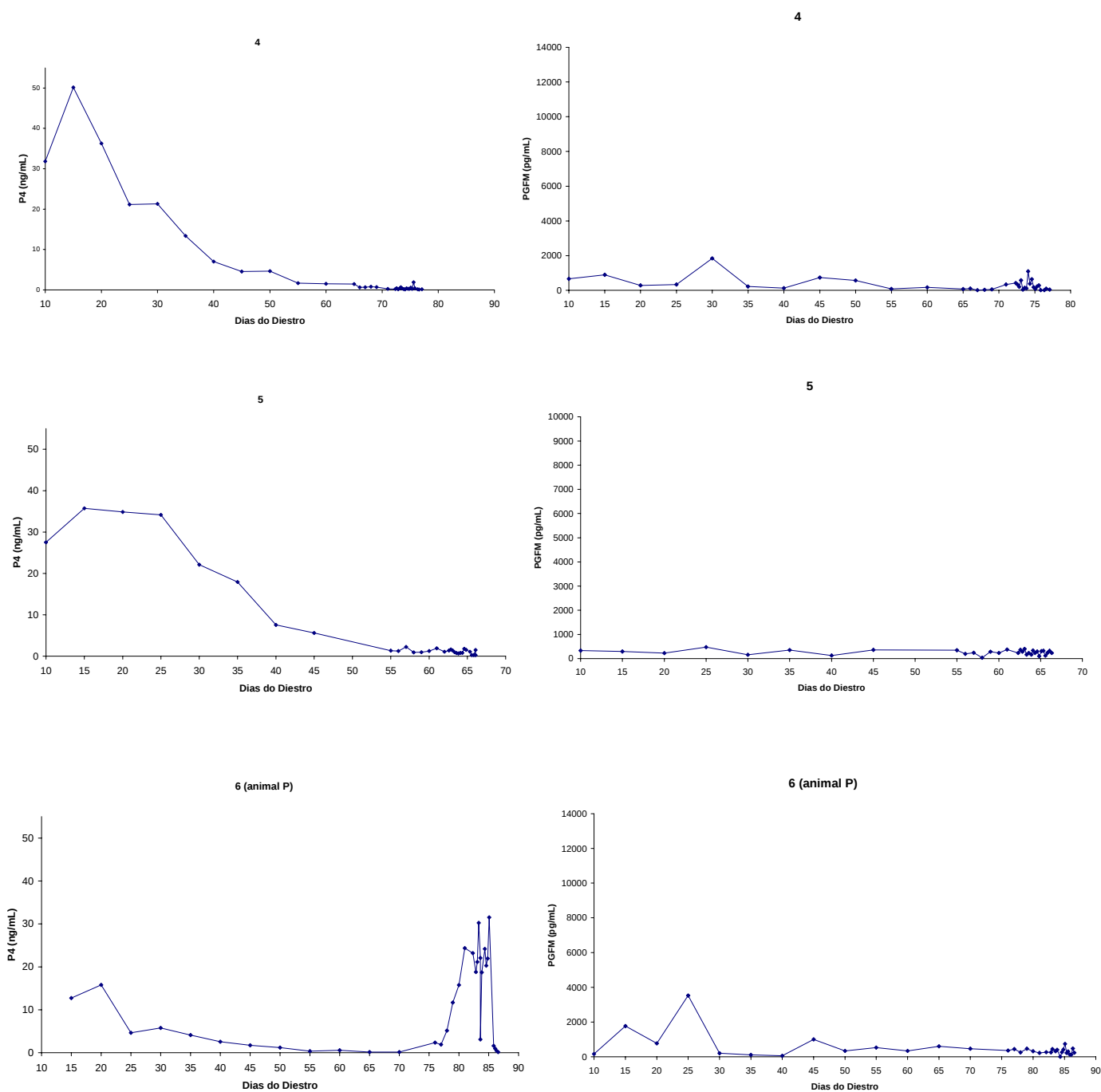


Figura 5 – Perfis individuais de secreção de P4 e PGFM em cadelas no diestro.
(continuação...)

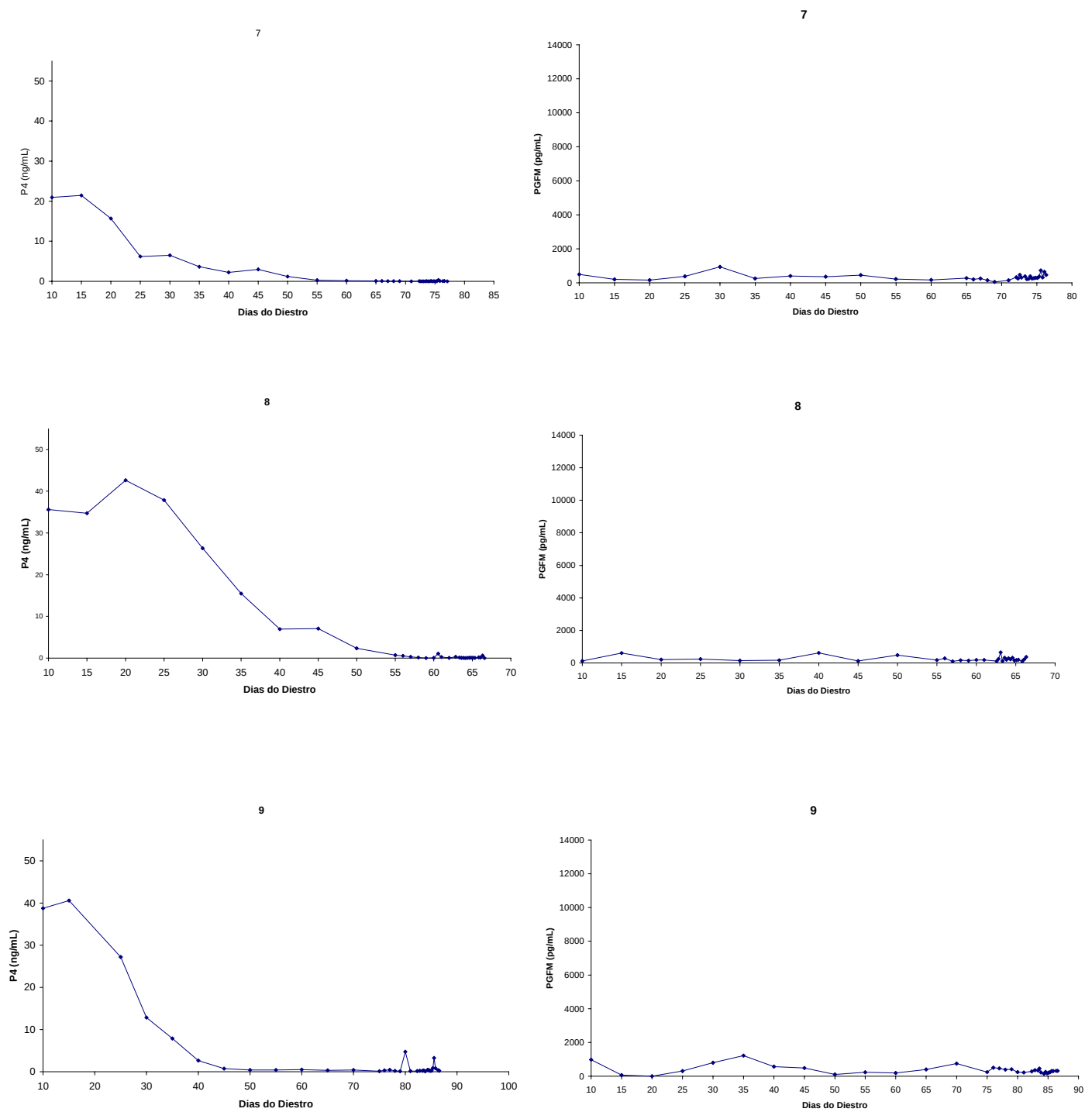


Figura 5 – Perfis individuais de secreção de P4 e PGFM em cadelas no diestro.
(continuação...)

Nas cadelas gestantes, a concentração máxima de P4 foi de $33,38 \pm 4,1$ ng/mL (estados reprodutivos não diferiram quanto a concentração máxima de P4, $P \leq 0,94$), e ocorreu em média no dia 18,75 (tendência a efeito de estados reprodutivos para dia da maior concentração de P4, $P < 0,07$) (Figura 6). Este resultado foi semelhante ao descrito por Onclin e Verstegen (1997b) e Benetti (2001), que verificaram concentrações de 36,9 ng/mL.

A concentração basal de P4 foi atingida em média no dia 63 (efeito significativo de estado reprodutivo, $P \leq 0,04$). Após o pico máximo, em ambos os estados reprodutivos, foi observado um declínio lento das concentrações de P4 até atingir a concentração basal. Este declínio lento refletiu uma luteólise funcional gradativa, tanto na gestação, como no diestro.

Na análise em conjunto das concentrações de P4 no diestro e gestação, foi observado que após o dia 15 do diestro e após o dia 20 da gestação ocorreu um lento declínio das concentrações de P4, até atingirem valores basais inferiores a 1 ng/mL. Nas cadelas em diestro, a concentração basal foi atingida oito dias antes das cadelas gestantes (efeito de interação entre estados reprodutivos e dia, $P < 0,01$) (Tabela 4; Figura 6).

Tabela 4 - Análise de variância das concentrações plasmáticas de progesterona, de cadelas gestantes e em diestro, até o D65.

Fontes de variação	GL	Pr > F
Estado Reprodutivo	1	0,01
Cadela (estado reprodutivo)	15	0,01
Dia	22	0,01
Status (dia)	20	0,01

* $r^2 = 0,90$

** dados transformados por raiz quadrada

Tabela 5 – Análise de variância das concentrações plasmáticas de progesterona de cadelas no diestro.

Fonte de variação	GL	Pr > F
Dia	41	0,01

* $r^2 = 0,79$

** dados transformados por raiz quadrada

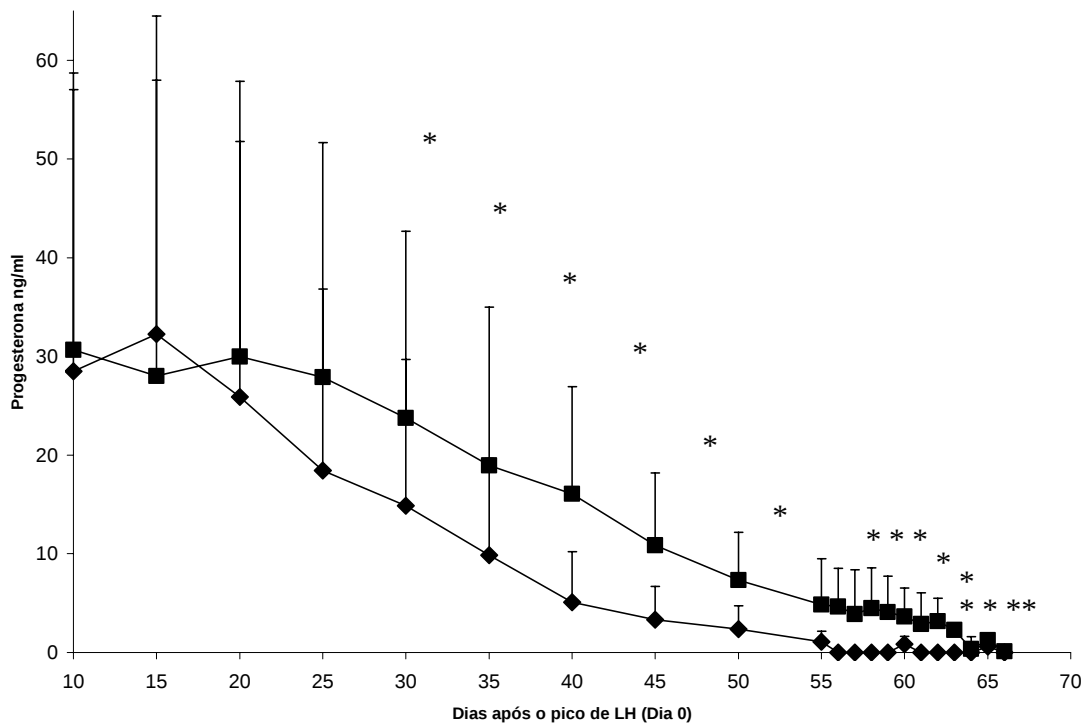


Figura 6 – Médias das concentrações plasmáticas de progesterona de cadelas gestantes e em diestro. O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; (Lsmeans $\pm$ EPM). ◆ = diestro; ■ = gestação.

* médias dos estados reprodutivos diferiram ($P \leq 0,1$).

** média dos estados reprodutivos diferiram ($P \leq 0,05$).

Como citado, a concentração máxima observada nas cadelas gestantes ocorreu em média no dia 18,75. Houve diferença em relação ao trabalho de Onclin e Verstegen (1997b), onde a concentração máxima ocorreu no dia 7, e em relação ao trabalho de Chakraborty (1987), onde ocorreu no dia 6. O início das colheitas no dia 10 pode ter influenciado este resultado, assim como discutido para as cadelas em diestro, embora os perfis individuais de secreção de P4 das cadelas (Figura 6) parecem não evidenciar que tenha ocorrido um platô, fato também não evidenciado por Smith e McDonald (1974).

O dia em que a P4 atingiu concentrações basais nas cadelas gestantes não diferiu do encontrado por outros pesquisadores (Chakraborty, 1987; Onclin e Verstegen, 1997b). Foi evidenciado que as concentrações de P4 atingiram concentrações basais no período pré-parto, fenômeno necessário para o desencadamento do parto (Concannon et al., 1988).

Nas três cadelas gestantes onde o parto ocorreu espontaneamente, com previsão para o dia 65 ± 1 após o pico de LH estimado, o parto ocorreu no dia 64 (n=1) ou 65 (n=2). Este resultado deu suporte ao delineamento inicial deste trabalho, que utilizou o exame de citologia vaginal para realizar a estimativa do dia do pico de LH e da data prevista do parto, através da detecção do primeiro dia do diestro citológico (Holst e Phemister, 1974; Concannon, 2000).

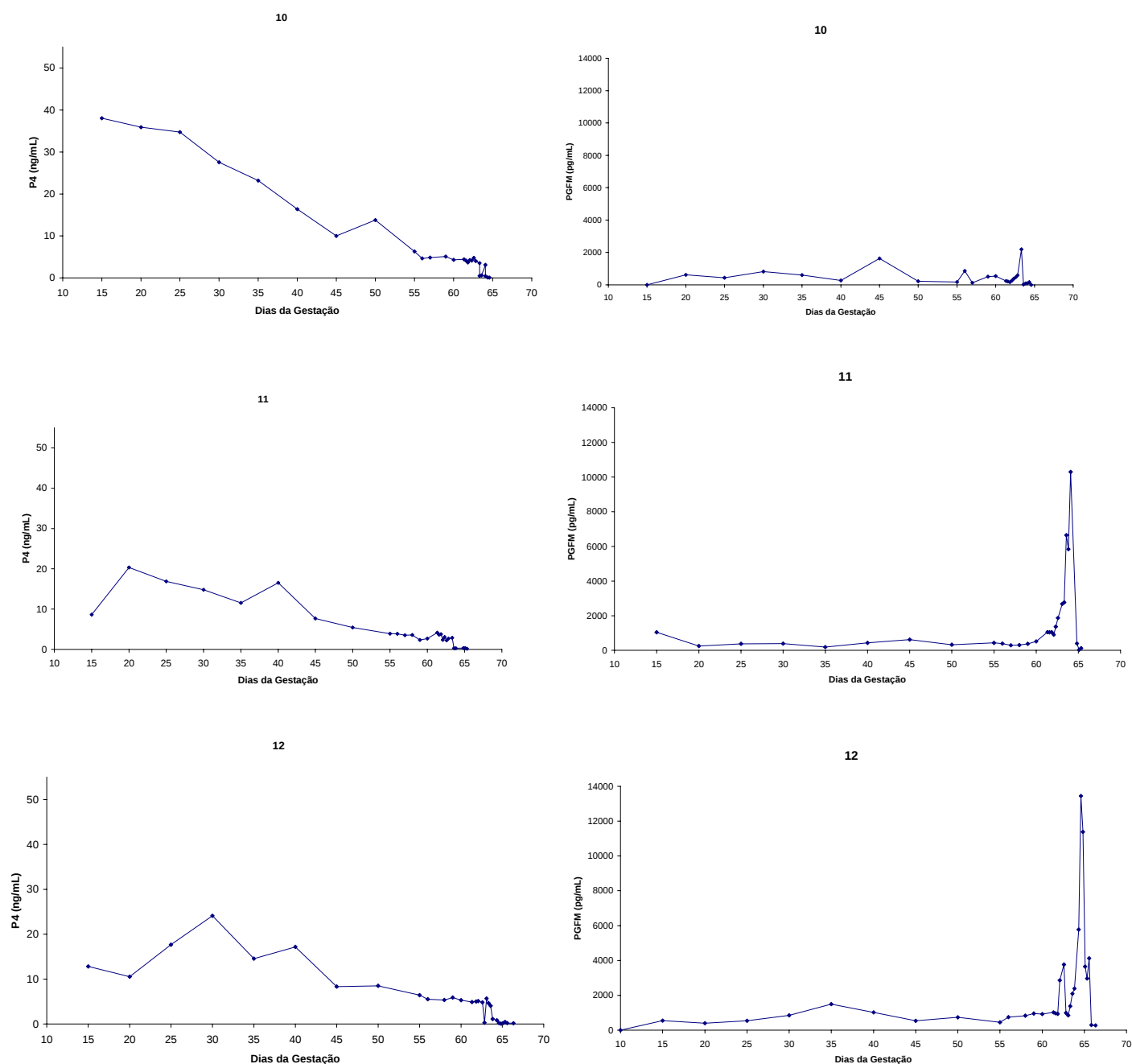


Figura 7 – Perfis individuais de secreção de P4 e PGFM em cadelas gestantes.

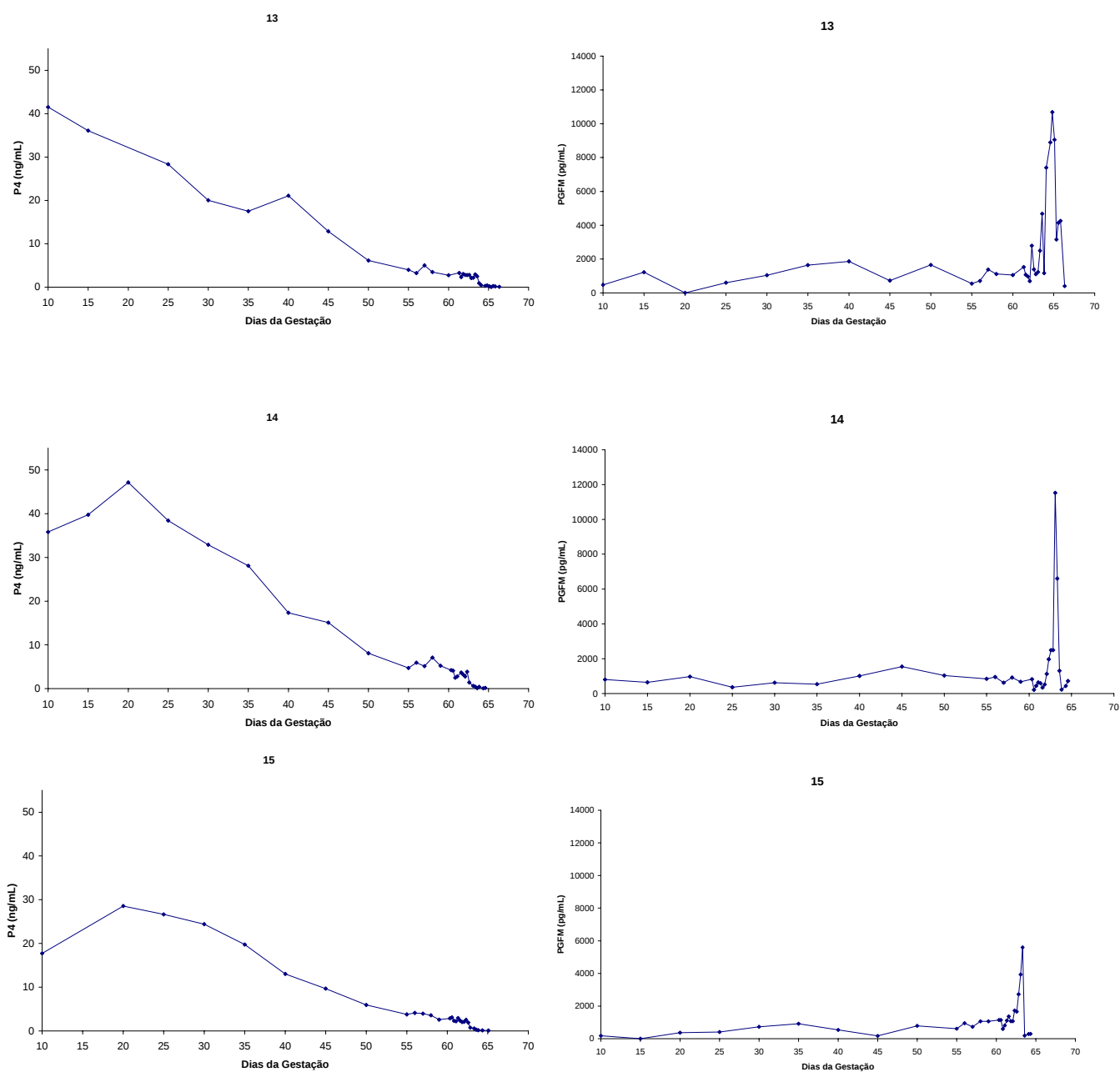


Figura 7 – Perfis individuais de secreção de P4 e PGFM em cadelas gestantes.
(continuação...)

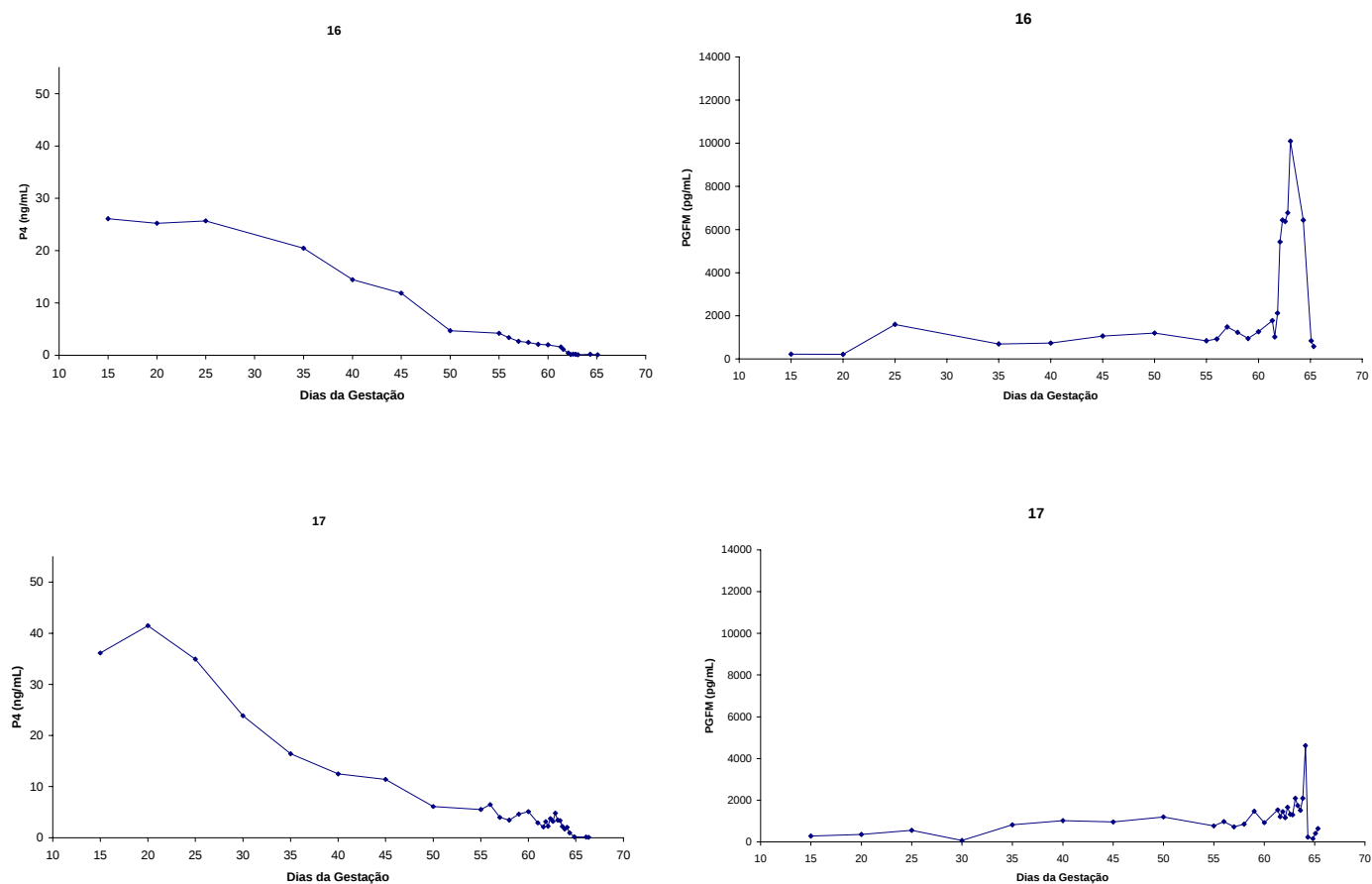


Figura 7 – Perfis individuais de secreção de P4 e PGFM em cadelas gestantes.
(continuação...)

4.2.3 Estradiol

Não foi observado efeito de dia nas concentrações de estradiol ($P > 0,1$).

Verificou-se que a concentração média de estradiol no diestro foi $20,58 \pm 6,25$ pg/mL, e na gestação foi $26,76 \pm 6,56$ pg/mL (diferença significativa entre os 2 estados reprodutivos, $P > 0,1$) (Tabela 6; Figura 8).

Tabela 6 - Análise de variância das concentrações plasmáticas de estradiol, de cadelas gestantes e no diestro à partir do D40.

Fontes de variação	GL	Pr > F
Estado Reprodutivo	1	0,57
Cadela (estado reprodutivo)	4	0,01
Dia	14	0,48
Estado reprodutivo x dia	14	0,2

* $r^2 = 0,70$

** dados sem transformação

Concannon et al. (1975) encontraram concentrações elevadas de 20-30 pg/mL ao longo da gestação, mas não no diestro. Chakraborty (1987) encontrou concentrações basais de estradiol ao longo da gestação e concentrações significativamente superiores no diestro, até a 3ª semana, com valores basais após a 5ª semana, além de altas concentrações de estrona.

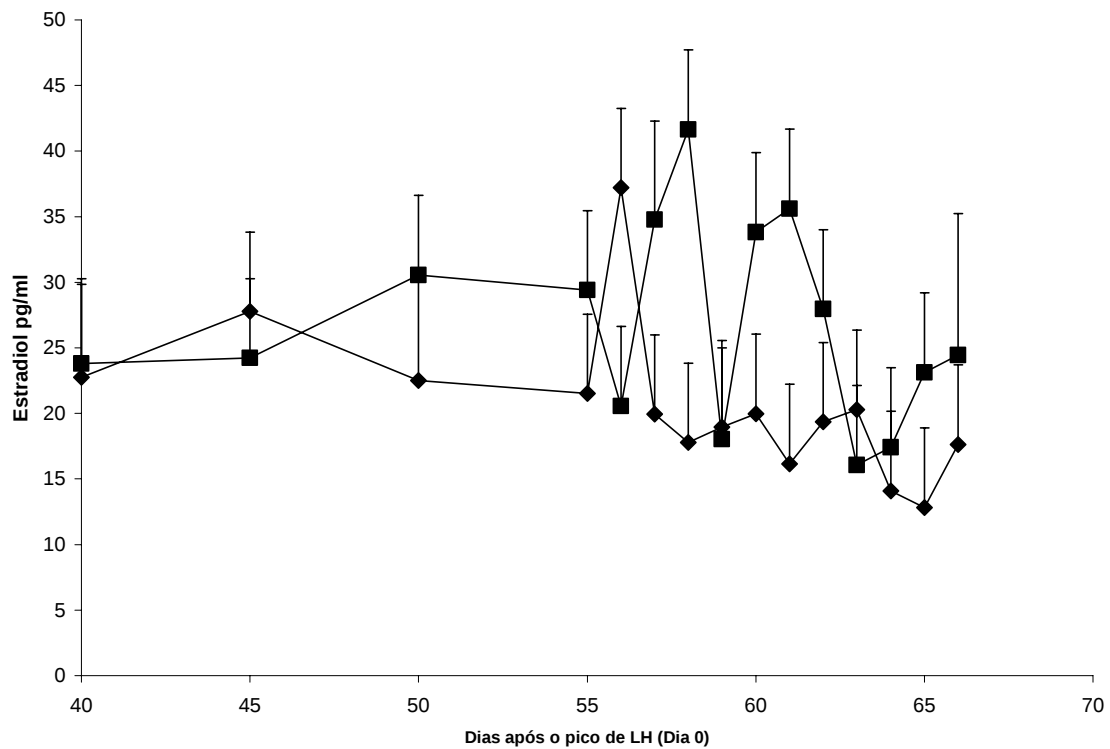


Figura 8 – Médias das concentrações plasmáticas de estradiol de cadelas gestantes e em diestro, do dia 40 a 66. O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; (Lsmeans $\pm$ EPM). ◆ = diestro; ■ = gestação.

Já Onclin et al. (2002) encontraram concentrações elevadas de estradiol a partir do dia 10 da gestação ou do diestro, que permaneceram elevadas durante todo o período luteal, variando entre 21 e 42 pg/mL. Estes autores afirmaram que não houve reação cruzada com estrona, assim como citado no trabalho de Steinetz et al. (1990).

As concentrações citadas nos trabalhos acima diferiram das encontradas no presente estudo, que variaram entre 5,19 a 83,01 pg/mL, do dia 40 ao 65. Entretanto, outros autores não encontraram mudanças nas concentrações de estradiol ou estrógenos totais em cadelas gestantes ou em diestro (Edqvist et al., 1975; Nett et al., 1975; Austad et al., 1976; Gräf, 1978; De Coster et al., 1979).

No presente trabalho não foi detectado um pico pré-parto de estradiol, o que dificulta o entendimento do estradiol em poder agir como um fator determinante ou estimulador da síntese de PGF2 α que ocorre no pré-parto, como considerado em outras espécies (Concannon et al., 2001).

Benetti (2001) encontrou uma concentração média de 6,23 pg/mL em cadelas gestantes, mas com variação média entre 1-6 pg/mL. Hoffmann et al. (1994) não evidenciaram elevações específicas de estradiol ao longo da gestação. Mesmo assim, as concentrações de estradiol detectadas diminuíram antes do parto, juntamente ao decréscimo da P4 e elevação do cortisol e hormônio do crescimento (GH).

Embora no presente estudo não tenha ocorrido efeito de dia ($P > 0,1$) para a produção de estradiol, houve variação individual entre cadelas ($P < 0,01$) (Figura 9).

Em várias espécies animais, os estrógenos possuem papel importante no desencadeamento do parto (Olson et al., 1995). Entretanto, em cadelas, assim como em outras espécies de gestação curta, não ocorre aumento significativo de estradiol no final da gestação ou pré-parto (Gräf, 1978; Concannon et al., 1989; Hoffmann et al., 1994).

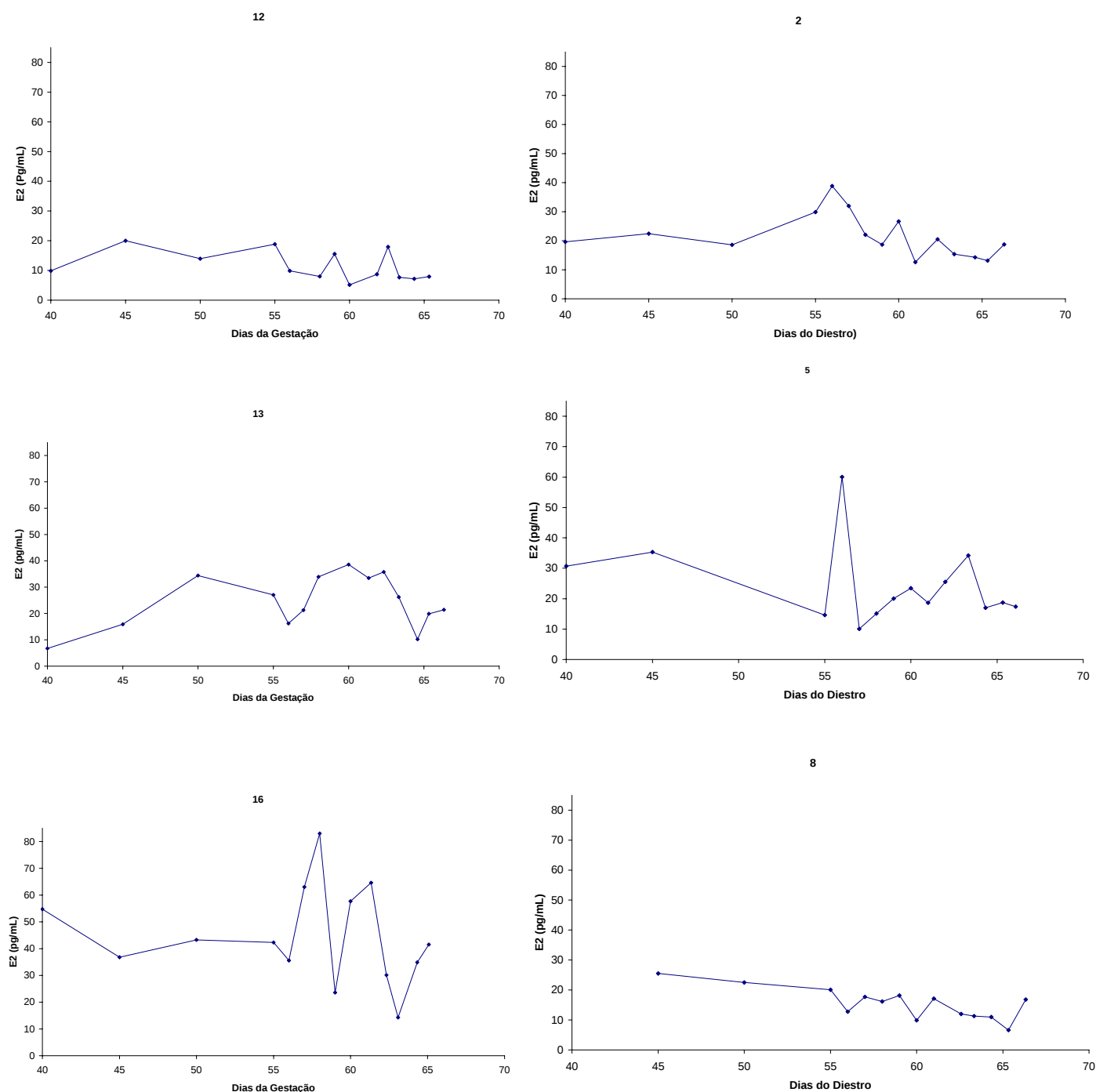


Figura 9 – Perfis individuais de secreção de estradiol por cadelas gestantes (animais n. 12, n. 13 e n. 16) ou em diestro (animais n. 2, n. 5 e n. 8).

Concannon (2003)¹ citou que, na cadela, o estradiol não deve possuir papel fundamental no mecanismo de desencadeamento do parto, como ocorre em outras fêmeas domésticas, devido à não ocorrência de aumento abrupto das concentrações plasmáticas de estradiol no período pré-parto. Tal fato está de acordo com o encontrado neste estudo, que não verificou aumento da produção de estradiol no período pré-parto.

Entretanto, Nishiyama et al. (1999) evidenciaram a capacidade de produção de estrógenos por células luteais no final da gestação de cadelas e hipotetizaram existir dois tipos de células luteais durante a gestação: células secretoras de P4 e células secretoras de estrógeno, ambas potencialmente diferentes.

Já Papa (2001) demonstrou, no corpo lúteo de cadelas, receptores para P4 e para estradiol, sugerindo um papel autócrino/parácrino dos dois hormônios na regulação da função luteal.

Por outro lado, Onclin et al. (2001) demonstraram a secreção de FSH no início do diestro e da gestação, com aumento da produção entre os dias 40 e 65 nas cadelas gestantes. Logo, seria possível que ao ser estimulado pelo FSH, o ovário apresente crescimento folicular, responsável por pelo menos parte da produção de estradiol evidenciada nesta pesquisa.

Trabalhos de dinâmica ovariana ao longo da gestação, com utilização de ultrassonografia, assim como a investigação da presença de receptores ovarianos para FSH, possibilitarão o esclarecimento destas suspeitas. Além da origem folicular, o estradiol em cadelas pode ser oriundo da célula luteal.

¹ (Comunicação Pessoal)

Um dos papéis do estradiol é o aumento da sensibilidade uterina à ocitocina e $\text{PGF2}\alpha$, além de promover contrações uterinas (Challis e Lye, 1999; Challis et al., 1999). Em ratas, o estradiol juntamente à prolactina exercem importante papel na manutenção da função luteal durante os estágios LH-dependentes da gestação (Cibori e Keyes, 1980).

Durante o processo de esteroidogênese, a enzima P-450 SCC é responsável pela conversão de colesterol em pregnenolona, que é convertida a P4 pela enzima 3β -HSD, e a enzima aromatase é responsável pela conversão final a estradiol (Nishiyama et al., 1999).

Estudos têm demonstrado o papel do estradiol na esteroidogênese, como estímulo da síntese de colesterol (Purycar et al., 1990), aumento da captura de colesterol e transformação na membrana externa da mitocôndria (Kahn et al., 1985). Em coelhas, a enzima Star participa da mediação do efeito luteotrófico do estrógeno para promover a síntese de P4 (Townson et al., 1996). É possível ainda que o estradiol exerça efeito direto sobre a enzima P450-SCC (Toaf et al., 1983).

Desta forma, embora ainda obscuro, é possível que o estradiol em cadelas, como em várias espécies, possua algum papel na regulação da função luteal, assim como no mecanismo de luteólise e síntese de prostaglandina para o desencadeamento do parto.

As concentrações de estradiol encontradas neste estudo variaram dos valores encontrados por outros pesquisadores (Concannon et al., 1975; Benetti, 2001; Onclin e Verstegen, 2002). Neste estudo, foi utilizado metodologia de mensuração de 17β -estradiol de 3ª geração (Diagnostic Systems Procedure – DSL – Texas, USA). Já os

dados de outros autores referem-se ao estradiol mensurado por outras metodologias, ou por radioimunoensaios que utilizam técnicas com extração hormonal. De acordo com Onclin et al. (2002), esta variação nas técnicas de mensuração de estradiol pode ser responsável por diferenças entre as concentrações hormonais encontradas entre os estudos.

ESTUDO 2

PRODUÇÃO IN VITRO DE PGF₂ α POR EXPLANTES DE ENDOMÉTRIO E CORPO LÚTEO DE CADELAS EM DIESTRO E GESTANTES, E PLACENTA DE CADELAS GESTANTES

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Animais

Foram utilizadas 17 cadelas adultas, sem-raça-definida (SRD), clinicamente saudáveis, com peso entre 5 e 40 kg. Os animais foram mantidos em canis individuais, com alimentação comercial e água *ad libitum*.

5.1.2 Grupos Experimentais

As cadelas foram divididas em dois grupos experimentais:

Grupo 1 (Cadelas gestantes, n=8);

Grupo 2 (Cadelas em diestro, n=9)

5.1.3 Colheita dos Tecidos para Cultivo

Para a colheita dos tecidos, as cadelas gestantes foram submetidas à OSH por método convencional (Fossum, 2001) aos 63 dias de gestação (n=2), 64 dias de gestação (n=3) ou imediatamente após o parto (n=3), sendo o pico estimado de LH considerado como dia zero.

As cadelas em diestro foram submetidas à OSH aos 65 dias (n=3), 75 dias (n=3) ou 85 dias (n=3), sendo o pico estimado de LH considerado como dia zero.

Após a OSH, os ovários e cornos uterinos (diestro e gestação) e placentas (gestação), foram transportados ao laboratório em sacos plásticos, dentro de isopor contendo gelo reciclável, em um período máximo de 15 minutos após a colheita.

Os filhotes nascidos das fêmeas gestantes submetidas à OSH, assim como as fêmeas após o período de pós-operatório, foram destinados à adoção.

5.1.4 Processamento dos Ovários, Útero e Placenta

Os tecidos foram processados em capela de fluxo laminar. Os ovários foram dissecados e realizou-se a remoção mecânica dos corpos lúteos, que foram seccionados em pequenos fragmentos e acondicionados em placa de Petri com meio de cultivo Ham-F10 (Sigma – N6635).

Os cornos uterinos foram separados para a dissecação do endométrio. Seccionou-se a face mesometrial de maneira a expor o endométrio, que foi separado do

miométrio com uso de material cirúrgico oftálmico. O endométrio dissecado foi seccionado em pequenos fragmentos e acondicionado em placa de Petri contendo meio de cultivo Ham-F10. As placentas foram seccionadas em pequenos fragmentos e armazenadas em meio de cultivo Ham-F10.

5.1.5 Cultivos de Explantes de Endométrio, Corpo Lúteo e Placenta

Para os cultivos, os explantes de tecidos foram acondicionados em placas de Petri contendo 100 mg de cada tecido/placa. O cultivo foi realizado em estufa de secagem, à 37°C, por um período de 6 horas. Para cada tecido, foram montadas placas em duplicata, sendo que as amostras foram divididas em grupos controle e tratado. As amostras do grupo controle foram cultivadas em 3 mL de meio Ham-F10, acrescido de solução de penicilina-estreptomicina-anfotericina B (Sigma – A7292). O grupo tratado recebeu adição de 3 mL de meio Ham-F10 acrescido de solução de penicilina-estreptomicina-anfotericina com PDBu (Sigma – A23187) a 100 ng/mL (PDBu – análogo do diacylglicerol – DAG, estimulador da síntese de PGF₂ α) (Johnson et al., 1995). Realizou-se colheita das amostras (500 μ L) nos tempos 0 e 6 horas e armazenou-se a -20°C para posterior mensuração de PGF₂ α por radioimunoensaio (RIE).

5.1.6 Radioimunoensaios de PGF2 α

Os ensaios hormonais para validação e mensuração de PGF2 α foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM) da FMVZ-VRA-USP, baseados em Danet-Desnoyers et al. (1994).

5.1.6.1 Preparo das Referências de PGF2 α

Realizou-se o preparo de referências a partir da diluição de PGF2 α (Sigma – P0424) em Tris-HCl 0,05M pH 7,4. Foram preparadas soluções contendo 125 e 1000 pg/mL (baixa e alta) de PGF2 α , por diluição da solução estoque padrão de PGF2 α (1 μ g/mL). As alíquotas de referências (500 μ L) foram armazenadas a - 20°C.

5.1.6.2 Técnica de Diluição e Determinação da Capacidade de Ligação do Anticorpo anti-PGF2 α (Teste de “Binding”)

O anticorpo utilizado nos radioimunoensaios de PGF2 α foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. William W. Thatcher, da Universidade da Flórida - EUA. A diluição do anticorpo foi feita a partir de amostras liofilizadas ressuspensas em água destilada e deionizada. A diluição final foi feita a fim de se obter uma solução de anticorpo em Tris-

HCl na concentração necessária para se obter 30% de ligação específica antígeno-anticorpo (*specific binding*). Os anticorpos foram utilizados na diluição de 1:4000 da solução inicial de anticorpo.

Validação: a validação do ensaio objetivou verificar, pelos testes de paralelismo, a influência do meio de cultivo Ham-F10 ou da solução tampão de Tris HCl 0,05 M pH 7,4 para diluição das amostras; testar diferentes concentrações das amostras de cultivo de corpo lúteo, placenta e endométrio (1:1 a 1:512) e diferentes diluições do anticorpo anti-PGF2 α (1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000 e 1:6000).

5.1.6.3 Determinação da Concentração de PGF2 α por Radioimunoensaio

Os ensaios de PGF2 α foram realizados em duas etapas, conforme Anexo 10.2. Foram mensuradas as concentrações de PGF2 α nos tempos 0 e 6 horas, e calculou-se a DIF 6, subtraindo-se a concentração de PGF2 α na hora 0 da concentração de PGF2 α da hora 6. As contagens foram realizadas em contador de partículas Beta (Wallac). O resultado da leitura, expresso em DPM's, foi transferido para uma planilha do programa "Quatro Pro" (Corel), para transformar os dados de DPM's (desintegrações por minuto) para pg/mL de PGF2 α . Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram 17,92% e 28,33%, respectivamente.

5.1.7 Análise Estatística

As concentrações de PGF2 α em meio de cultivo (DIF 6) foram analisadas e não se mostraram adequadas quanto à normalidade de resíduos (Teste de Shapiro-Wilk, $P \leq 0,01$) e homogeneidade de variâncias (Teste F, $P \leq 0,01$). Os dados foram então transformados por raiz quadrada e reanalisados. Tal transformação adequou os dados à análise de variância (Shapiro-Wilk e F; $P \geq 0,01$). Os efeitos de estado reprodutivo, tecido, tratamento, dia e interações foram analisados por ANOVA utilizando-se o proc GLM e o proc MIXED do programa SAS (SAS Institute, 1988). Os dados foram apresentados como LSMeans $\pm$ EPM para a produção de PGF2 α em 6 horas (DIF 6). A variável dependente foi a diferença entre as concentrações de PGF2 α medidas na hora 6 e na hora 0. Em todos os testes estatísticos, o nível de significância mínimo considerado foi de 5% ($P \leq 0,05$).

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Validação: Os valores de capacidade de ligação encontrados para as diluições de anticorpo 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000 e 1:6000 foram 46%, 41%, 34%, 26% e 18%, respectivamente, e a diluição determinada como mais adequada foi 1:4000. Os testes de validação demonstraram haver paralelismo entre as curvas contendo várias proporções de meio de cultivo Ham-F10 e Tris-HCl. Dessa forma, o Tris-HCl foi determinado para ser usado na diluição das amostras dos ensaios de $\text{PGF2}\alpha$. Para as diferentes concentrações das amostras de cultivo (1:1 a 1:512), a diluição determinada como mais adequada para corpo lúteo e placenta foi 1:25. Para endométrio, após ensaio teste, foi determinada a diluição 1:100, em Tris-HCl (Figura 10).

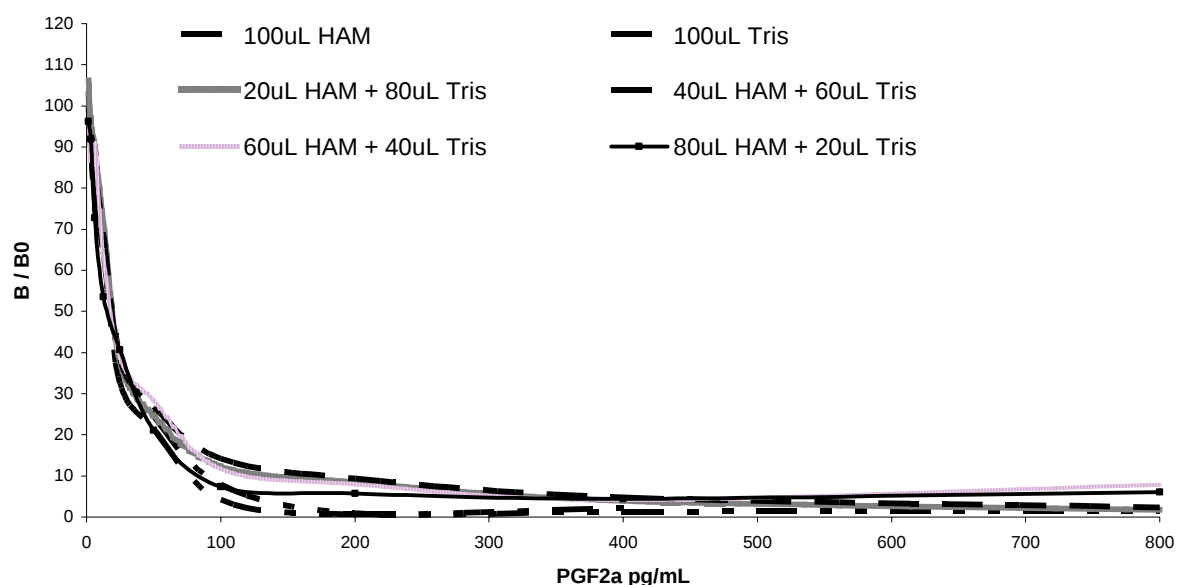


Figura 10 - Porcentagem de ligação (B/B0) de concentrações crescentes de PGF2 α diluída em soluções contendo diferentes proporções de Meio Ham-F10 (Sigma) e Tris-HCl.

5.2.2 Produção de PGF2 α por Explantes de Endométrio e Corpo Lúteo de Cadelas nos dias 65, 75 e 85 do Diestro

Para a produção de PGF2 α em 6 horas (DIF 6), foi observado que nos três grupos estudados do diestro (D65, D75 e D85), a produção de PGF2 α por explantes de endométrio foi máxima no D65, e diminuiu nos dias 75 e 85 (Figura 11). Já a produção de PGF2 α por explantes de corpo lúteo foi inferior à produção por explantes de endométrio, de forma geral, mas manteve-se constante ou aumentou ao longo do diestro (interação tecido x dia; $P \leq 0,02$) (Tabela 7; Figura 11).

A utilização de PDBu não foi capaz de aumentar de forma significativa a produção de PGF2 α pelos explantes de tecidos na fase de diestro (efeito de tratamento, $P > 0,1$) (Tabela 7; Figura 11).

Já para os explantes de corpo lúteo, a produção de PGF2 α praticamente dobrou do dia 65 para o dia 85 (interação tecido x dia; $P \leq 0,02$), embora tenha sido inferior à produção pelos explantes de endométrio (Figura 11).

Tabela 7 - Análise de variância das concentrações plasmáticas de PGF2 α produzidas pelo endométrio e corpo lúteo, ao longo do diestro, em 6 horas (DIF 6).

Fontes de variação	GL	Pr > F
Dia	2	0,13
Tecido	1	0,64
Tecido*Dia	2	0,02
Tratamento	1	0,49
Tratamento*Dia	2	0,87
Tecido*tratamento	1	0,48
Tecido*tratamento*dia	2	0,90

* $r^2 = 0,39$

** dados transformados por raiz quadrada

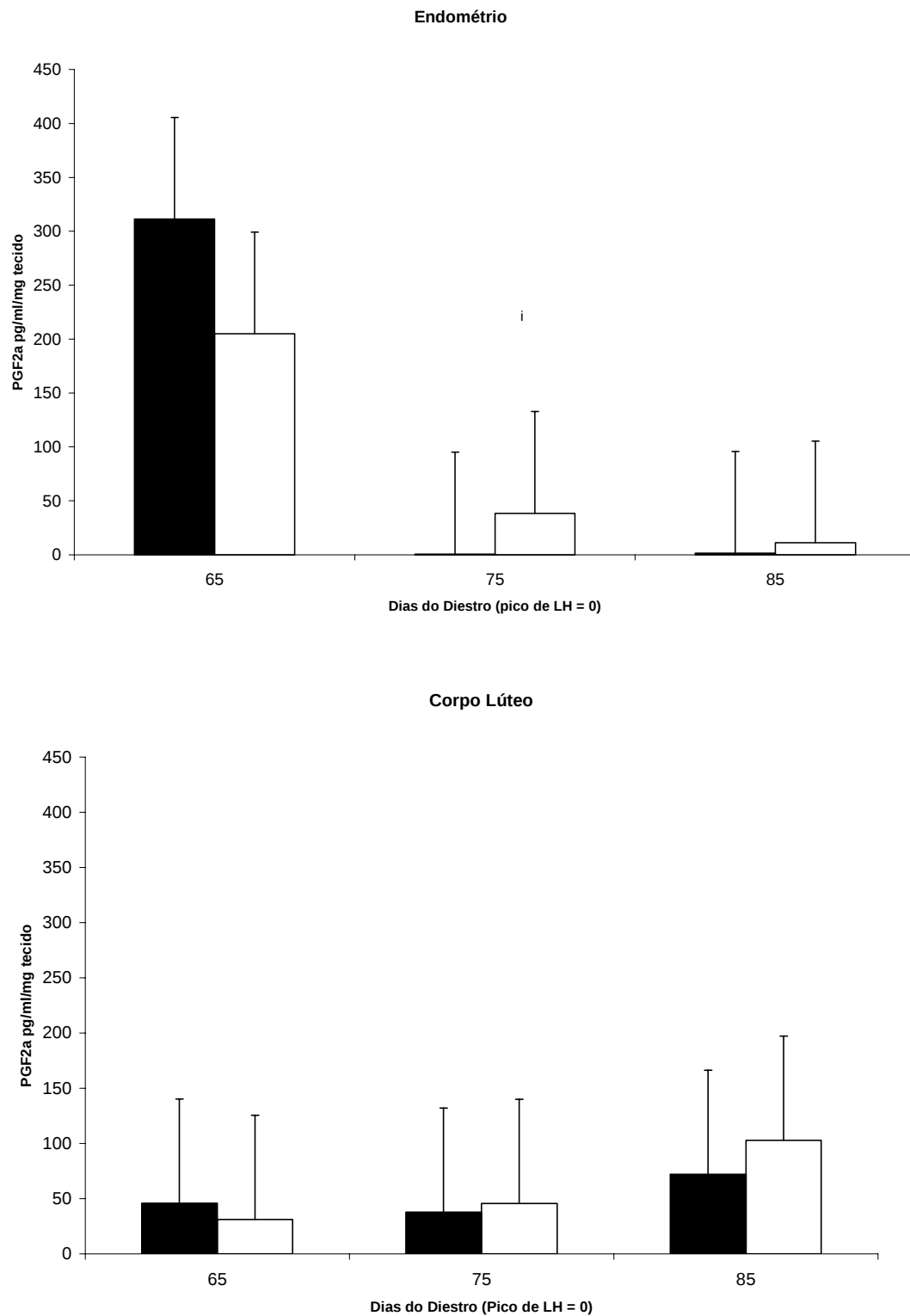


Figura 11 - Médias das concentrações de PGF2 α produzidas por explantes de endométrio e corpo lúteo de cadelas em diestro, nos dias 65, 75 e 85. O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; Preto = controle; branco = PDBu. (Lsmeans $\pm$ EPM).

A literatura pesquisada demonstrou serem escassos os trabalhos com mensuração de PGF2 α *in vitro* em tecidos de cadelas, embora sua importância na luteólise pré-parto tenha sido demonstrada (Concannon et al., 1989).

Olson et al. (1984b), após extração de PGF2 α de endométrio de cadelas, encontraram concentrações de $2,8 \pm 0,6$ ng/g, $4,3 \pm 2,2$ ng/g e $1,3 \pm 0,5$ ng/g de tecido, nos dias 5, 15 e 25 do diestro. Entretanto, estes resultados não podem ser comparados aos resultados do presente estudo pois o referido autor não realizou incubação do tecido, mas apenas extração das quantidades pré-existentes de PGF2 α .

Várias substâncias interagem para a produção de PGF2 α , como o estradiol e a ocitocina (Castro e Paula, 2003), embora, em cadelas, o real papel destes hormônios, com relação à luteólise, ainda não seja conhecido. Assim, a maior produção de PGF2 α no dia 65 do diestro pode ter ocorrido devido a uma concentração maior de receptores para estradiol ou ocitocina na membrana das células epiteliais endometriais, ou por uma maior expressão gênica para proteínas que regulem esta secreção de PGF2 α .

Heap e Poyser (1975) demonstraram que o endométrio canino é capaz de produzir PGF2 α *in vivo*, em processos inflamatórios/infecciosos. Os autores encontraram altas concentrações de PGF2 α em fluido inflamatório de piometra canina, mas foi especulada a possibilidade de bactérias presentes no útero terem produzido a PGF2 α . Neste trabalho, não houve relação entre a presença de PGF2 α no útero com sua possível propriedade luteolítica.

Não foram encontrados dados na literatura sobre o uso de PDBu em cultivos de tecidos de cadelas. Em bovinos, o PDBu tem sido utilizado em pesquisas que utilizam explantes de endométrio ou células BEND (*bovine endometrial cells*), e normalmente ele

possui capacidade de estimular a produção *in vitro* de PGF2 α (Arnold et al., 2000; Binelli et al., 2000), motivo pelo qual também foi utilizado no presente estudo.

Castro e Paula (2003) demonstrou a ocorrência de produção *in vitro* de PGF2 α por explantes de endométrio bovino, no dia 17 do ciclo estral, e relatou que esta produção é estimulada pela ocitocina, assim como demonstrado na mesma espécie por outros autores. Foi verificado que o diâmetro folicular das vacas estava relacionado à capacidade do endométrio em produzir PGF2 α , sugerindo que maior concentração de estradiol, associado à ocitocina, aumenta a secreção de PGF2 α .

O fato do endométrio no presente estudo ter apresentado maior resposta à produção de PGF2 α no dia 65 pode estar relacionado à concentração endógena de estradiol no dia da colheita, comparativamente aos dias 75 e 85, quando a cadela já estava no anestro (ver Estudo 1), com baixas concentrações plasmáticas de estradiol. Tal fato permite especular a possibilidade do estradiol exercer papel importante na síntese de PGF2 α endometrial na cadela, já que injeções de estradiol no final da fase luteínica de bovinos podem desencadear a produção de PGF2 α pelo endométrio, e pelo fato da ablação de folículos ovarianos em bovinos retardar a luteólise (Villa-Godoy et al., 1985; Castro e Paula, 2003).

Embora Papa (2001) tenha demonstrado a presença de receptores para estradiol no corpo lúteo canino, o autor não utilizou amostras de corpo lúteo após o dia 60 do diestro ou gestação.

A baixa capacidade de resposta do tecido luteal à produção de PGF2 α refletiu menor capacidade de síntese de PGF2 α desse tecido, comparada aos explantes de endométrio. Não foram encontradas na literatura inferências sobre a produção luteal de PGF2 α em cadelas, diferentemente do que ocorre em células luteais bovinas (Rodgers

et al., 1988; Miyamoto et al., 1993), de babuínos (Dawood et al., 1997) e de ovários de primatas (Leymarie e Martal, 1993).

5.2.3 Produção de PGF2 α por Explantes de Endométrio, Corpo Lúteo e Placenta de Cadelas Gestantes, nos dias 63, 64 e parto

A produção de PGF2 α em 6 horas (DIF 6) por explantes de endométrio aumentou do dia 63 para o dia 64, quando chegou à máxima concentração, e diminuiu do dia 64 para o dia do parto. Houve maior produção de PGF2 α pelos explantes de endométrio quando estimulados por PDBu, enquanto nos explantes de corpo lúteo e de placenta, a produção manteve-se praticamente inalterada (interação significativa de tecido X dia, $P < 0,01$) (Tabela 8; Figura 12).

Houve aumento na produção de PGF2 α por explantes de endométrio e de corpo lúteo anteriormente ao parto, em ambos os tratamentos (controle e PDBu), com declínio da produção após o parto (Figura 12).

Na produção de PGF2 α pelos explantes de endométrio, foi observado que inicialmente a produção aumentou, e posteriormente diminuiu, fato não observado nos explantes dos outros tecidos (interação tecido X dia, $P < 0,01$).

Tabela 8 - Análise de variância das concentrações de PGF2 α , produzidas pelo endométrio, corpo lúteo ou placenta de cadelas gestantes, nos dias 63, 64 e parto, em 6 horas (DIF 6).

Fontes de variação	GL	Pr > F
Dia	2	0,01
Tecido	2	0,01
Tecido*Dia	3	0,01
Tratamento	1	0,02
Tratamento*Dia	2	0,13
Tecido*tratamento	2	0,05
Tecido*tratamento*dia	3	0,52

* $r^2 = 0,88$

** dados transformados por raiz quadrada

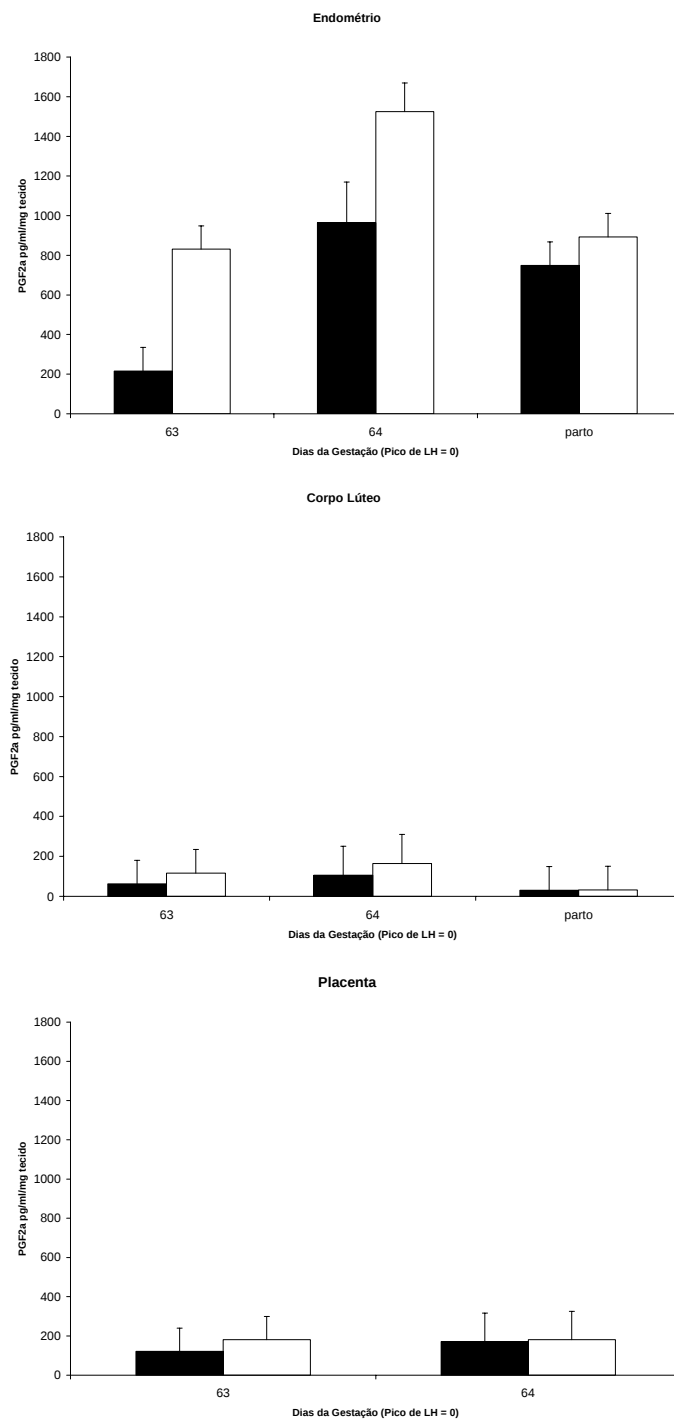


Figura 12 - Médias das concentrações de PGF2 α produzidas por explantes de endométrio, corpo lúteo e placenta de cadelas gestantes, nos dias 63, 64 e parto. O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; Preto = controle; branco = PDBu; (Lsmeans $\pm$ EPM).

É possível que o endométrio de cadelas ao final da gestação esteja sensibilizado e capaz de responder à produção de PGF2 α . Esta capacidade de resposta pode estar relacionada a uma prévia sensibilização por estradiol e/ou ocitocina, além de fatores autócrinos e parácrinos, agindo no endométrio.

Como demonstrado por Hoffmann et al. (1996), a produção de PGF2 α no período pré-parto é essencial para a ocorrência do parto eutócico. No presente estudo, foi evidenciado parto eutócico em todas as cadelas.

A maior produção de PGF2 α pelos explantes de endométrio, corpo lúteo e placenta tratados por PDBu possivelmente foi devido ao estímulo da proteína kinase C (PKC), pela ativação da cascata de produção de prostaglandinas (Johnson et al., 1995). Este aumento foi mais expressivo no endométrio comparado ao CL e placenta, além da produção por estes tecidos ter sido inferior à produção pelo endométrio.

Em várias espécies de animais domésticos, o endométrio é a principal fonte de produção de PGF2 α (Davis e Rueda, 2002). Entretanto, resultados conflitantes existem na literatura acerca da origem da PGF2 α , assim como da sua importância no mecanismo luteolítico em cadelas (Hoffmann et al., 1992). Foi evidenciado neste estudo que o endométrio canino possui grande capacidade de produção de PGF2 α , muito superior à capacidade do CL e da placenta, especialmente no período pré-parto, e estimulado por PDBu.

5.2.4 Produção de PGF2 α por Explantes de Endométrio e Corpo Lúteo de Cadelas, no dia 65 do Diestro ou Gestação (parto)

Para a produção de PGF2 α em 6 horas (DIF 6) por cadelas gestantes e em diestro, foi observado que a produção pelo endométrio variou entre os estados reprodutivos, enquanto no corpo lúteo esta variação não foi verificada (efeito de interação tecido X estado reprodutivo, $P < 0,01$) (Tabela 9).

A análise da produção de PGF2 α no dia 65 demonstrou que a produção por explantes de endométrio de cadelas gestantes foi superior aos explantes de endométrio de cadelas em diestro (efeito de estado reprodutivo para produção de PGF2 α pelo endométrio, $P < 0,02$) (Tabela 9; Figura 13).

A produção de PGF2 α pelos explantes de endométrio aumentou inicialmente, com posterior decréscimo. Já nos outros tecidos esta variação não foi observada (efeito de interação tecido X dia, $P < 0,01$).

Tabela 9 - Análise de variância das concentrações de PGF2 α produzida pelo endométrio e corpo lúteo de cadelas no dia 65 do diestro ou gestação (parto), em 6 horas (DIF 6)

Fontes de variação	GL	Pr > F
Estado reprodutivo	1	0,02
Tecido	1	0,01
Tecido*estado reprodutivo	1	0,01
Tratamento	1	0,76
Tratamento*estado reprodutivo	1	0,82
Tratamento*tecido	1	0,57
Tratamento*tecido*estado reprodutivo	1	0,90

* $r^2 = 0,72$

** dados transformados por raiz quadrada

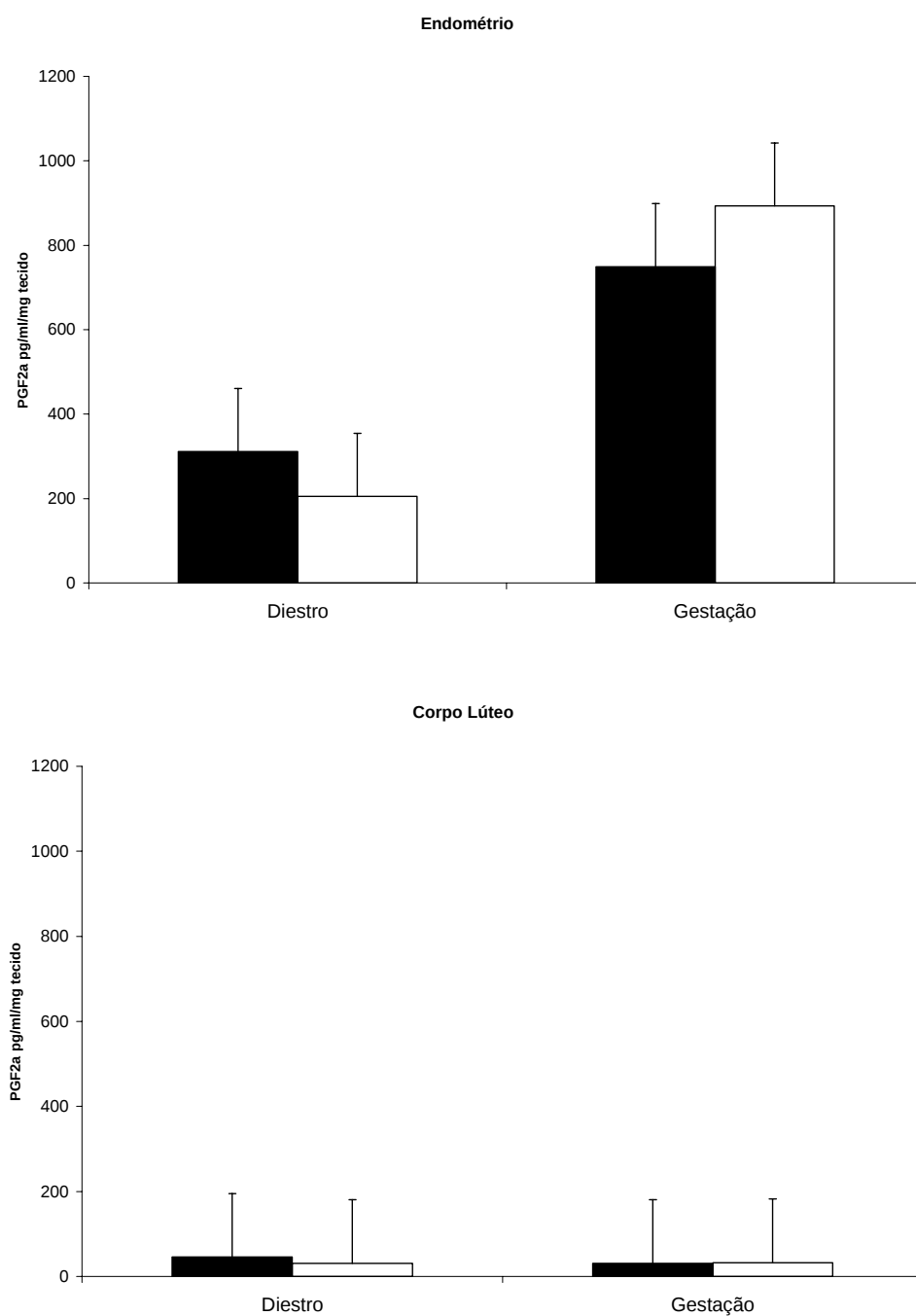


Figura 13 - Médias das concentrações de PGF2 α produzidas por explantes de endométrio e corpo lúteo de cadelas gestantes e no diestro, no dia 65. O Dia 0 correspondeu ao dia estimado do pico de LH; Preto = controle; branco = PDBu. (Lsmeans $\pm$ EPM).

De maneira geral o endométrio respondeu à produção de PGF2 α com ou sem estímulo por PDBu e a maior secreção de PGF2 α pelo endométrio das cadelas gestantes refletiu a necessidade de secreção de PGF2 α no final da gestação, por ser a PGF2 α responsável pela luteólise pré-parto nas cadelas (Concannon et al., 1988).

Como já discutido para outras espécies animais, o estradiol e a ocitocina possuem papel importante na produção de PGF2 α . Assim, estes hormônios podem estar envolvidos neste mecanismo também em cadelas.

O papel do cortisol na produção de PGF2 α em cadelas é desconhecido (Concannon et al., 2001), e poderia ser alvo de estudos com vistas a elucidar o mecanismo da endocrinologia do parto na cadela, já que altas concentrações de cortisol estão presentes no período pré-parto (Hoffmann et al., 1994).

Hoffmann et al. (1994) demonstraram que no pré-parto imediato de cadelas são observadas baixas concentrações de estradiol e de P4, mas altas concentrações de cortisol e GH. Em primatas, Challis et al. (1999) demonstraram haver aumento da síntese de prostaglandina induzida por corticóides, pelo aumento da expressão de enzimas sintetizadoras de prostaglandina.

De acordo com Concannon et al. (2001), o cortisol pode possuir um papel central e significativo no mecanismo de parto da cadela, que merece maior investigação. Estudos dos efeitos diretos dos corticóides na produção e no metabolismo nos tecidos uterinos e placentários poderiam contribuir para o entendimento do mecanismo do parto em cadelas.

Trabalho recente demonstrou que o LH é capaz de estimular a secreção endometrial de PGF2 α em ovelhas cíclicas, bem como a secreção de PGE₂ em ovelhas gestantes (Weems et al., 2003). Desta forma, acredita-se que o LH participe, em

conjunto com o estradiol, do mecanismo de luteólise nesta espécie. Acredita-se que o estradiol seja capaz de estimular a síntese de receptores para LH, ou ativá-los. Desta forma, o LH, através da ativação de 2^{os} mensageiros, é capaz de ativar as enzimas PKC e PLA₂, levando à síntese de PGF2 α .

Assim, é possível hipotetizar que, semelhantemente ao descrito, o LH participe na cadela, juntamente a outros fatores, do mecanismo de síntese de prostaglandina endometrial. Estudos demonstraram que a concentração de receptores para LH é constante ao longo do diestro no corpo lúteo canino. Entretanto, a presença de receptores em células epiteliais endometriais não foi pesquisada.

Olson et al. (1989) relataram que Sawyer H.R. (dados não publicados) tentou realizar estudos de cultivos *in vitro* para investigação da função luteal em cadelas, mas com dificuldades de manutenção ou estímulo da secreção de P4 por fragmentos de CL. Entretanto, vários pesquisadores têm realizado trabalhos em outras espécies para estudo de função luteal e uterina, através de cultivo, microdiálises ou perfusão de tecidos ou células (Jarry et al., 1990; Miyamoto et al., 1993; Castro e Paula, 2003).

Portanto, estudos com cultivos *in vitro* ou *in vivo*, ou perfusão de corpo lúteo ou células luteais isoladas, assim como placenta ou endométrio, como realizado neste estudo para mensuração de PGF2 α , poderiam esclarecer os mecanismos envolvidos na regulação luteal de cadelas.

O suplemento dos meios de cultivo com substâncias como corticóides, prolactina ou inibidores de prolactina, estradiol ou substâncias anti-estrogênicas, P4 ou anti-progestágenos, assim como ocitocina ou seus antagonistas, poderia ser realizado

para se estudar a função luteal em cadelas, com estímulo ou inibição da síntese de P4 e estradiol.

Da mesma forma, experimentos *in vivo* poderiam esclarecer tais dúvidas. A colheita de plasma ou soro para dosagem hormonal em cadelas tratadas com substâncias que podem inibir ou estimular a síntese de P4 ou estradiol podem esclarecer quais as substâncias e os mecanismos envolvidos na regulação luteal.

ESTUDO 3

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ATIVIDADE DE CASPASE-3 NA LUTEÓLISE DE CADELAS GESTANTES E EM DIESTRO

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

6.1.1 Animais

Foram utilizadas 17 cadelas adultas, sem-raça-definida (SRD), clinicamente saudáveis, com peso entre 5 e 40 Kg. Os animais foram mantidos em canis individuais, com alimentação comercial e água *ad libitum*. Uma cadela que apresentou padrão diferente das demais foi designada de animal “P”.

6.1.2 Grupos Experimentais

As cadelas foram divididas em dois grupos experimentais:

Grupo 1 (Cadelas gestantes, n=8);

Grupo 2 (Cadelas em diestro, n=9)

Para colheita dos corpos lúteos, as cadelas do Grupo 1 foram submetidas à OSH por técnica convencional (Fossum, 2001) aos 63 dias de gestação (G63, n=2), 64 dias de gestação (G64, n=3), e imediatamente após o parto (parto, n=3). As cadelas do Grupo 2 foram submetidas à OSH aos 65 dias (D65, n=3), 75 dias (D75, n=3) e 85 dias (D85, n=3) do diestro. Os ovários foram transportados ao laboratório dentro de isopor contendo gelo reciclável, em um período máximo de 15 minutos.

6.1.3 Processamento dos Ovários

Em capela de fluxo laminar, os ovários foram dissecados e foi realizada a remoção mecânica dos corpos lúteos. Os corpos lúteos destinados à análise morfológica citoquímica nuclear foram seccionados em fragmentos inferiores a 0,5 cm e fixados em solução de formalina. Os fragmentos dos corpos lúteos destinados à mensuração da atividade de caspase-3 foram imediatamente congelados em microtubos a -20°C.

6.1.4 Análise Morfológica por Concentração Mínima de Eletrólitos (CEC)

As análises morfológicas foram realizadas no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências (IB) da UNESP, Campus de Botucatu. Os fragmentos de corpo lúteo foram submetidos à análise de citoquímica nuclear, pela técnica de CEC - concentração mínima de eletrólitos (Taboga e Mello, 1996; Vidal et al., 1996). Os corpos lúteos, após fixação em formalina, foram processados histologicamente para inclusão

em paraplasto e, a seguir, foram realizados cortes histológicos de 5 µm. Os cortes histológicos foram hidratados em soluções decrescentes de álcool (100%, 95%, 70% e 50%) e corados com Azul de Toluidina (diluído em Tampão Mc Ilvaine), pH 4,0, por 15 minutos. Após a coloração, sem lavar, foram imediatamente colocados em Cloreto de Magnésio 0,5 M, por 7 minutos sendo em seguida, lavados em água destilada e secados durante a noite. O material foi clarificado em xilol e montado em Entellan.

A análise histológica foi realizada sob microscopia fotônica, onde se buscou avaliar a morfologia das células luteais, presença de células apoptóticas (corpos apoptóticos), e a reorganização do corpo lúteo em processo de luteólise. Um corpo lúteo de um animal extra foi utilizado para a padronização dos tempos de permanência dos cortes histológicos no Cloreto de Magnésio após a coloração com Azul de Toluidina.

6.1.5 Análise Morfológica por Hematoxilina e Eosina (HE)

Cortes histológicos dos corpos lúteos após hidratação em soluções decrescentes de álcool (100%, 95%, 70% e 50%) foram corados com solução de Hematoxilina por 10 minutos e contracorados com solução de Eosina por 3 minutos (HE). Em seguida, as lâminas contendo os cortes histológicos foram desidratadas em álcool, em concentrações crescentes, diafanizadas em xilol e montadas em Entellan.

A análise histológica foi realizada sob microscopia fotônica, para avaliação das mesmas características morfológicas buscadas com o método descrito anteriormente.

6.1.6 Mensuração de Atividade de Caspase-3

As análises de mensuração de atividade de Caspase-3 foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA – USP - Campus de Pirassununga. Realizou-se a quantificação de proteínas das amostras pelo Método de Bradford (Bradford, 1976) e, em seguida, a mensuração de atividade de caspase-3. Foram realizados testes preliminares para determinação da diluição ideal das amostras (1X a 100X), e a diluição escolhida como padrão, pela coloração da solução demonstrando a presença de proteínas, foi 2X.

- **Quantificação de proteínas** (Bradford, 1976): as amostras de corpo lúteo foram descongeladas à temperatura ambiente, foram adicionados 400 µL de tampão de lise e realizada dissociação do tecido com tesoura cirúrgica. Procedeu-se centrifugação (centrífuga modelo Eppendorf) a 200G por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido imediatamente a outro microtubo. Efetuou-se diluição de 5 µL de amostra em 15 µL de água destilada e 1000 µL de Reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate – Bio Rad Laboratories) diluído (Reagente de Bradford 1:5 água destilada). Procedeu-se homogeneização, e após 5 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro, em absorbância de 595 nm. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Para efeito de mensuração de atividade de caspase-3, foram obtidas médias das leituras.

- **Mensuração da Atividade de Caspase-3** (Vanags et al., 1996): realizou-se diluição de 50 µL de amostra lisada em Tampão de Reação para Caspase 1:1, em duplicata. Realizou-se homogeneização, pré-incubação a 37°C por 15 minutos em estufa, para ativação das caspases. Ato contínuo, adicionou-se 10 µL de substrato para Caspase 'Abz-DEVDGVQ-EDD np' (Abz = ácido aminobenzóico; EDDnp=N,2-4-dinitrophenylethylenediamine), a 110 µM. O material foi coberto com papel alumínio, homogeneizado e incubado a 37°C por duas horas. Após a incubação, procedeu-se a leitura em fluorímetro (TD-700, Turner Designs Instrument, Sunnyvale, CA, USA) e a atividade de Caspase-3 foi expressa em UAF/µg/Ptn (unidades arbitrárias de fluorescência/µg/Ptn).

6.1.7 Análise Estatística

Foi utilizado o Teste de Tukey para análise das concentrações de Caspase-3 entre os grupos de cadelas gestantes e em diestro. O nível de significância mínimo considerado foi de 5% ($P \leq 0,05$).

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 Análise Morfológica

Nos cortes histológicos de corpos lúteos dos grupos estudados submetidos à técnica de CEC, as células apoptóticas foram evidenciadas raramente, o que não aconteceu com os cortes histológicos submetidos à técnica de HE. Na amostra de corpo lúteo utilizada para padronização da técnica de CEC, a marcação que ocorre em células apoptóticas através desta técnica foi intensa, como pode ser visualizado na Figura 14.

Para efeito de comparação e descrição morfológica, as cadelas foram estudadas em grupos.

- **Grupos: G63, G64 e Parto**

Os corpos lúteos dos animais destes três grupos apresentaram padrão morfológico semelhante.

A análise histológica por CEC e HE evidenciou que os corpos lúteos apresentavam células luteais grandes granulosas com citoplasma vesicular, representando espaços ocupados por lipídios no tecido vivo e núcleos esféricos e centrais com nucléolos evidentes. As células luteais tecais eram bem menores e coradas com HE apresentaram-se mais escuras. Observou-se ainda presença de

células do tecido conjuntivo. O tecido analisado apresentou-se íntegro. Raras células luteais apoptóticas foram visualizadas, e mais facilmente na coloração de HE que no CEC. Foram observados ainda, raros melanomacrófagos (Figura 15).

- **Grupo D65**

A análise histológica dos corpos lúteos dos animais deste grupo foi semelhante à do grupo anterior (cadela gestantes; G63, G64 e parto). As células luteais deste grupo de animais apresentaram-se diminuídas de tamanho, mas comparativamente ao grupo anterior, encontravam-se íntegras.

Foram encontrados alguns vasos sanguíneos no tecido luteal, assim como a presença de fibroblastos. As células luteais apresentavam citoplasma vesicular, representando espaços ocupados por lipídios no tecido vivo. Nucléolos evidentes foram verificados e raras células apoptóticas visualizadas (Figura 16).

- **Grupos: D75 e D85**

A análise histológica por CEC e HE do tecido ovariano colhido como corpo lúteo dos animais destes grupos revelou que as células luteais não estavam mais presentes e o material apresentou-se totalmente preenchido com adipócitos, muitos vasos sanguíneos e células de tecido conjuntivo, tais como fibroblastos.

Os adipócitos pareciam vazios devido ao processamento realizado no tecido, o qual dissolveu o material lipídico. O citoplasma destas células apareceu como uma borda esférica e o núcleo posicionado perifericamente (Figura 17). O material analisado, neste grupo de animais em diestro, pareceu estar relacionado a *corpus albicans*, e não a corpos lúteos.

Uma exceção aconteceu com o animal 'P', do grupo D85, cujo tecido evidenciou padrão de células luteais intactas, semelhante às cadelas gestantes ou no dia 65 do diestro (Figura 18).

Poucos trabalhos foram realizados para o estudo morfológico do processo de regressão luteal em cadelas, bem como com a correlação dos aspectos morfológicos aos funcionais, mas alguns trabalhos clássicos foram conduzidos.

Andersen e Simpson (1973) realizaram descrição microscópica (microscopia óptica) dos eventos que ocorrem no ovário da cadela ao longo da gestação, como desenvolvimento folicular e luteal. Abel et al. (1975) realizaram uma análise por microscopia óptica da compartimentalização da célula luteal, enfocando as organelas intra-celulares.

Já Dore (1989) estudou aspectos morfológicos e histoquímicos da regressão luteal em cadelas, nos dias 30, 60, 120, 180 e 240 dias após a ovulação.

No entanto, vários trabalhos têm demonstrado que próximo ao término da gestação, as concentrações plasmáticas de P4 já estão próximas a valores basais e, para o desencadeamento do parto, as concentrações chegam a valores inferiores a 1-2 ng/mL (Concannon et al., 1975; Onclin e Verstegen, 1997b). Ou seja, é necessário que a célula luteal cesse a produção ou produza P4 em baixas concentrações para que o parto ocorra.

Entretanto, neste estudo morfológico, ficou evidenciado que na análise dos corpos lúteos das cadelas gestantes (G63, G64 e parto) por HE e CEC, as células luteais apresentavam-se íntegras e com nucléolos evidentes, também evidenciado por Dore (1989) em CLs no diestro.

A presença de nucléolos evidentes demonstra a capacidade secretora da célula, embora as concentrações de P4, neste período, já estivessem basais (Estudo 1). Tal fato demonstrou haver necessidade de preservação da célula luteal pelo menos até

este momento, para que a mesma continue a secretar P4, mesmo que em baixas concentrações.

Verstegen et al. (1996) demonstraram ser o corpo lúteo capaz de produzir uma concentração residual de P4 mesmo após o término do diestro e início do anestro. Haveria um tecido luteal residual e ativo, cuja produção de P4 pode ser mensurada em pg/mL, e a mesma possuiria ação local sobre o ovário.

Desta forma, é possível levantar a hipótese de que na cadela, pelo menos uma porção do tecido luteal se manteria íntegra, responsável por esta produção residual de P4 durante o anestro. Tal fato não foi evidenciado nas células luteais deste estudo, que após o dia 75 do diestro não mais apresentavam-se íntegras. Sabendo-se que a porção reticular da glândula adrenal possui capacidade esteroidogênica (Hsu e Crump, 1989), talvez este tecido produza as baixas concentrações de P4 encontradas por Verstegen et al. (1996), e não o corpo lúteo.

Todavia, a manutenção da capacidade secretora destas células está de acordo com o fato evidenciado por Chakraborty (1987), que encontrou concentrações entre 1,5-2,5 ng/mL de P4 no pós-parto de cadelas.

É possível que pelo fato da luteólise funcional ser um processo gradativo e lento na cadela, em ambos os estados reprodutivos, ocorrendo a partir do dia 10-30 da gestação ou do diestro, até o dia 65 ou eventualmente mais tarde, no diestro (Concannon et al., 1975; Onclin e Verstegen, 1997b; Estudo 1 deste trabalho) a estrutura morfológica do CL se mantenha íntegra até o parto. Talvez ainda por não ter decorrido tempo suficiente para a reorganização do tecido, transformando-se em *corpus albicans*. No presente estudo, *corpus albicans* foram evidentes a partir do dia 75 do diestro.

Nos corpos lúteos deste grupo de cadelas (G63, G64 e parto), foram detectadas células luteais com acúmulo de lipídios, fato semelhante ao descrito por Dore (1989), em cadelas no diestro, e por Guraya (1969), além de outras espécies, como bovinos e ovinos (Priedkalns e Weber, 1968; Gemmell et al., 1976). De acordo com Dore (1989), este acúmulo de lipídios ocorre pelo recrutamento de precursores de esteróides ao interior da célula, mesmo após ter cessado a esteroidogênese, embora seja um sinal da reduzida capacidade de conversão do colesterol em esteróides (Gemmell et al., 1976).

Raros melanomacrófagos foram evidenciados no tecido luteal ao final da gestação e imediatamente após o parto, e esta presença demonstra início de reorganização tecidual, uma vez que os mesmos são responsáveis pela fagocitose das células apoptóticas.

Não apenas mudanças estruturais são observadas na regressão luteal, mas ocorre dramático aumento da secreção de proteínas luteais, como as metaloproteinases 1 e 2 – collagenase, gelatinase e estromelisina (TIMP). Estas, são enzimas que degradam componentes proteináceos da matriz extra-celular, e estão envolvidas na remodelação do tecido luteal (Juengel et al., 1993; 1994).

Embora na técnica da CEC raras células apoptóticas tenham sido evidenciadas, na coloração de HE elas foram perceptíveis. Não foi possível determinar a razão pela qual tal fato ocorreu, já que a técnica da CEC foi padronizada em tecido luteal canino (Figura 13). Entretanto, mesmo na coloração de HE, a presença de células apoptóticas ao final da gestação foi escassa.

O padrão morfológico dos corpos lúteos das cadelas do grupo D65 foi similar ao das cadelas no final da gestação, ou imediatamente após o parto. Desta forma, não houve diferença quanto aos mecanismos envolvidos na regressão estrutural do corpo

lúteo das cadelas em ambos os estados reprodutivos, ou se houve, esta não foi evidenciada sob o ponto de vista morfológico.

Embora ocorra aumento da secreção de proteínas luteais durante a luteólise e mesmo 48 horas após a P4 ter atingido concentrações basais em bovinos (Juengel et al., 1994), algumas destas proteínas luteais envolvidas na remodelação do CL não são evidenciadas ao final da gestação, e apenas no corpo lúteo cíclico (Ndikun-Moffor et al., 1995). Estas proteínas estão envolvidas no processo de regressão luteal, através de mecanismos endócrinos, parácrinos ou autócrinos (Juengel et al., 1994). É possível que, em cadelas, a $\text{PGF2}\alpha$ ou mesmo outras substâncias mediem a expressão destas proteínas, levando à lenta e gradativa luteólise funcional e estrutural observada.

No material colhido das cadelas dos grupos D75 e D85, não foram mais evidenciadas células luteais íntegras, e sim material sugestivo de *corpus albicans*. A presença de grande quantidade de adipócitos, como discutido anteriormente, indicou a baixa ou ausente capacidade esteroidogênica destas células (Gemmell et al., 1976). Muitos vasos sanguíneos, assim como fibroblastos, foram visualizados, como semelhante ao descrito por Fraser et al. (1999) em primatas, o que demonstrou que o tecido já encontrava-se em processo de reorganização e remodelação. Este fato é evidenciado após a luteólise espontânea ou induzida por $\text{PGF2}\alpha$ em outras espécies (Juengel et al., 1993;1994).

Após o corpo lúteo ter se tornado afuncional, é necessário que ocorra esta remodelação tecidual. As alterações regressivas caracterizam-se por espessamento das paredes arteriais do corpo lúteo, diminuição da granulação citoplasmática, arredondamento dos contornos celulares e vacuolização periférica das grandes células

luteais e, ao longo da regressão, vai-se formando uma estrutura fibrosa, denominada *corpus albicans* (Hafez, 1995).

O fato das células luteais das cadelas aos 65 dias do diestro apresentarem-se íntegras, e aos 75 dias já apresentarem-se ausentes, indicou um rápido processo de degeneração luteal, que ocorreu após cessar a produção de P4, entre os dias 65 e 75 após o pico estimado de LH (Estudo 1).

Já o animal “P” foi uma exceção neste grupo. A análise morfológica evidenciou a presença de células luteais íntegras, a despeito deste animal já estar no dia 85 pós-pico de LH (D85). Embora tenha sido evidenciada uma queda na produção de P4 a concentrações basais neste animal por volta do dia 55, houve retomada da produção 20 dias após (Estudo 1). Interessantemente, não ocorreu regressão prematura do corpo lúteo com formação de *corpus albicans*, mas sim manutenção da atividade esteroidogênica.

Fato semelhante ocorreu com animais do experimento de Hori et al. (2002), mas com luteólise experimental. Na concentração de 5 µg/Kg de fenprostalene, os autores observaram retomada da produção de P4 quatro dias após a diminuição inicial, com decréscimo posterior semelhante aos animais controle.

É possível que, embora ainda não totalmente conhecida, a interação entre fatores luteotróficos e luteolíticos não tenha sido capaz de causar a total regressão luteal na cadela em questão. A integridade celular demonstrou a capacidade esteroidogênica mantida. A diminuição da produção de P4, mas com manutenção da integridade morfológica, indicou que alguma alteração específica na esteroidogênese ocorreu, mas sem desencadear a regressão estrutural do CL.

É possível que substâncias precursoras da P4, como o colesterol, ou ainda uma deficiência no transporte do colesterol, tenha ocorrido, embora as células luteais sejam capazes de sintetizar colesterol a partir de acetato (Niswender et al., 2000). Diferentemente, uma privação de enzimas esteroidogênicas, da capacidade funcional destas enzimas, ou de fatores autócrinos/parácrinos ligados à síntese de P4 podem ter sido o problema.

O procedimento da Concentração Mínima de Eletrólitos (CEC), ao evidenciar células apoptóticas, facilita a simples detecção da frequência de apoptose e a distribuição espacial desse processo em um tecido orgânico. As células coradas com Solução de Azul de Toluidina em pH 4,0, na presença de íons Mg^{2+} , por 7 minutos, mostraram abolição da metacromasia do DNA.

Entretanto, os corpos lúteos, quando submetidos ao método da CEC, coraram-se em verde, mas as células apoptóticas ou corpos apoptóticos não foram evidenciados.

Provavelmente a luteólise estrutural já havia acontecido nas cadelas dos grupos D75/D85, e então os corpos apoptóticos já haviam sido fagocitados pelos macrófagos, o que explicaria também a ausência deste tipo celular no material analisado, e ainda não havia ocorrido nas cadelas gestantes e em D65. Ou, ainda, o fenômeno de apoptose pode não ser importante forma de morte celular na regressão luteal em cadelas, semelhante ao descrito para sagüis (Fraser et al., 1999).

6.2.2 Mensuração da Atividade de Caspase-3

As concentrações médias de atividade de caspase-3 em UAF/ μ g/ptn (unidades arbitrárias de fluorescência/ μ g/ptn) estão representadas na Tabela 10. Foi evidenciada grande variação individual entre cadelas. Não foi observado efeito de estados reprodutivos ($P > 0,1$) para a atividade de caspase-3. Entretanto, o número de amostras do grupo de cadelas em diestro foi pequeno.

As concentrações de atividade de caspase-3 (UAF/ μ g/ptn) (Tabela 10) dos animais dos grupos diestro 75 e 85 (exceto a fêmea que apresentou o fenômeno de “luteólise parcial”), foram excluídos da análise estatística, já que a análise morfológica destes grupos demonstrou a presença de material sugestivo de *corpus albicans*, e não corpos lúteos. Os resultados da atividade de caspase-3 no material sugestivo de *corpus albicans* estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 10 – Média das concentrações de UAF/ μ g/ptn de Caspase-3 em cadelas gestantes e em diestro.

Status	UAF/ μ g/ptn Caspase-3
Diestro	60,33 ^a
Gestação	81,13 ^b

^{a,b} Valores não diferem estatisticamente quanto ao estado reprodutivo ($P > 0,1$).

Tabela 11 – Concentrações individuais de UAF/ μ g/ptn de Caspase-3 de tecido ovariano de cadelas, sugestivo de *corpus albicans*.

Animal	Status	UAF/ μ g/ptn Caspase-3
1	Diestro	128,4
2	Diestro	61,13
6	Diestro	42,26
12	Diestro	129,00
13	Diestro	274,45

Vários estudos têm demonstrado o fenômeno de apoptose no processo de luteólise nas diversas espécies (Juengel et al., 1993; Shikone et al., 1996; McCormack et al., 1998; Rueda et al., 1999; 2000), sendo um processo que necessita da ativação de expressão gênica (Rahimi et al., 2001).

Entretanto, Fraser et al. (1999) demonstraram pela análise ultra-estrutural que no corpo lúteo de *Callithrix jacchus* (sagüi), a grande maioria das células luteais não regride por apoptose. Na luteólise espontânea, ocorre atrofia celular e fagocitose dos debris citoplasmáticos, e na luteólise induzida (antagonista de GnRH ou prostaglandina), autofagocitose e desintegração celular não-lisossomal. Nesta espécie, assim como na cadela, parecem não haver evidências do envolvimento de luteolisina endógena, e se há, não parece agir rapidamente.

A caspase-3 é uma das enzimas responsáveis pela apoptose, sendo por alguns autores denominada de executora primária da apoptose (Carambula et al., 2002). Mas o papel da caspase na regressão luteal ainda foi pouco explorado (Johnson e Bridgham, 2002).

Neste estudo, as concentrações médias de atividade de Caspase-3 (UAF/ μ g/ptn) nas cadelas gestantes e em diestro não diferiram (efeito de estado reprodutivo, $P > 0,1$). Entretanto, foi verificada variação individual entre animais. Desta forma, esta variação individual, assim como a pequena amostragem de cadelas em diestro, pode ter contribuído para a não diferença entre estado reprodutivo.

Trabalho de Takiguchi et al. (2003) demonstrou que parece existir, em ratas, um mecanismo independente de caspase-3 para a apoptose na regressão luteal no pós-parto. Os autores não observaram mudanças na atividade de caspase-3 consistentes com o número de células apoptóticas detectadas.

Resultados conflitantes existem na literatura acerca da correlação entre atividade de caspase-3 no ovário e presença de células apoptóticas. Carambula et al. (2002) sugeriram que a caspase-3 participa da apoptose na luteólise, mas não é um mediador direto da diminuição da esteroidogênese associada à luteólise em camundongas.

Da mesma forma, Rueda et al. (1999) afirmaram que na ausência de caspase-3 em animais “Knocked-out”, outras enzimas assumem o papel da apoptose.

Sabe-se que na regressão luteal das diversas espécies, espontânea ou induzida por PGF2 α , ocorre a participação das caspases, embora outros mecanismos de morte celular também tenham sido evidenciados (Fraser et al., 1999).

Em cadelas, no diestro, não há envolvimento direto da PGF2 α , ou existe uma concentração mínima de PGF2 α responsável por desencadear o início da luteólise. Entretanto, no período pré-parto ocorre uma maior liberação de PGF2 α . Desta forma, a caspase-3 pode estar envolvida em ambos os mecanismos de regressão luteal de cadelas, como demonstrado pela atividade de caspase mensurada nos corpos lúteos deste estudo.

Embora alta atividade de caspase-3 tenha sido evidenciada, não houve correlação com a porcentagem de células luteais apoptóticas. É possível que a atividade de caspase-3 evidenciada se deva a um processo inicial de morte celular, e as alterações morfológicas ainda não haviam sido evidenciadas. Entretanto, nas cadelas dos gupos D75 e D85, a atividade de caspase-3 também foi detectada, e as células luteais já não estavam mais presentes.

Assim, é possível que a caspase-3 também participe do processo de remodelação do CL transformando-o em *corpus albicans*.

De acordo com Johnson e Bridgham (2002), o progresso no estudo da participação das caspases no fenômeno da apoptose será complicado em função da presença de múltiplas e potencialmente redundantes cascatas de caspases que mediam a apoptose, e os vários mecanismos e expressão de proteínas regulatórias de fatores pró e anti-apoptóticos no ovário.

Assim, mais estudos poderão elucidar a real importância da apoptose na luteólise em cadelas, bem como a participação das caspases neste evento.

7 DISCUSSÃO GERAL

Conforme abordado na revisão de literatura, muitos estudos têm sido realizados com vistas a compreender os mecanismos luteotróficos e luteolíticos que regulam a função luteal em cadelas, tanto no diestro, como na gestação.

Trabalhos recentes têm demonstrado que interações complexas ocorrem no desencadeamento da luteólise estrutural e funcional em outras espécies, com interações hormonais, celulares, e a participação de citocinas, mediadores de inflamação, fatores de crescimento semelhantes a fibroblastos (Neuvians et al., 2003), além do óxido nítrico (Jaroszewski et al., 2003).

Em cadelas, diferentes mecanismos parecem controlar o corpo lúteo gestacional ou cíclico (Hoffmann et al., 1996; Onclin et al., 2002). Alguns pesquisadores evidenciaram que a função luteal em cadelas parece não ser controlada pela função uterina (Olson et al., 1994a; Hoffmann et al., 1996), como nas outras espécies domésticas.

Os resultados do presente estudo evidenciaram na gestação um pico de PGFM no período imediatamente anterior ao parto, assim como outros autores (Concannon et al., 1989; Nöhr et al., 1993; Fieni et al., 2001a;b).

De acordo com Concannon et al. (1988), nas cadelas, ocorre um declínio abrupto nas concentrações plasmáticas de progesterona 24 horas antes do parto, e esta luteólise pré-parto decorre de um aumento de $\text{PGF}_2\alpha$. Da mesma forma, naquela

pesquisa, verificou-se a ocorrência de um progressivo aumento das concentrações plasmáticas de PGFM no pré-parto, que atingiu valor máximo de $4109,11 \pm 364,39$ pg/mL, no dia 63 da gestação. Após o parto, foi observada uma queda das concentrações para $1399,79 \pm 458,24$ pg/mL no dia 65 e para $192,56 \pm 720,18$ pg/mL no dia 66.

É possível que o aumento pré-parto de PGFM nas cadelas gestantes seja responsável pelo declínio final das concentrações de P4 a valores inferiores a 1,0 ng/mL, ou possa apenas ser responsável pelas contrações miométriais para a expulsão fetal, já que nas cadelas em diestro, o declínio das concentrações de P4 ocorre da mesma forma, mas sem a ocorrência do pico de PGFM.

No presente estudo, demonstrou-se que, em fêmeas gestantes, a queda das concentrações de P4 se inicia antes mesmo da ocorrência do aumento de PGFM pré-parto, como também evidenciado por Concannon et al. (1989) e Nöhr et al. (1993).

Fieni et al. (2001a) detectaram um aumento das concentrações plasmáticas de PGFM após o tratamento de cadelas com aglepristone (antagonista da progesterona) ou ocitocina para indução do parto no dia 58 da gestação. A ocitocina isoladamente foi capaz de promover a síntese de prostaglandina. Como o aglepristone parece não interagir com a síntese de corticóides, a possibilidade de ação do cortisol na síntese direta de prostaglandina não foi hipotetizada. Embora no momento da expulsão fetal, as concentrações plasmáticas de PGFM já estejam elevadas, é possível que a ocitocina liberada durante o reflexo de Ferguson possa contribuir para a manutenção da elevada produção de prostaglandina F2 α no momento do parto.

O mecanismo de ação da ocitocina na luteólise foi hipotetizado por McCracken et al. (1984; 1991). A ocitocina foi considerada como sendo o gerador central de pulsos ("Central Pulse Generator"), ou seja, um pulso de ocitocina liberado pela hipófise no final da fase luteal de bovinos geraria um estímulo para a liberação de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio, a qual agiria no corpo lúteo liberando mais ocitocina, que novamente agiria causando maior liberação de $\text{PGF2}\alpha$, num mecanismo de "feedback" positivo entre ocitocina e $\text{PGF2}\alpha$. Já o estradiol seria responsável em causar um aumento das concentrações de receptores de ocitocina, permitindo que a ocitocina desencadeie a produção de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio (Castro e Paula, 2003).

Os resultados das pesquisas tentando elucidar o papel da ocitocina na luteólise de ovinos e bovinos têm sido contraditórios, e parece que a ação da ocitocina está relacionada à fase do ciclo estral, assim como a relativas concentrações de estradiol e P4 (estradiol/P4) (Castro e Paula, 2003).

É possível que, em cadelas, a ocitocina também tenha um papel importante no papel da luteólise pré-parto. Estudos envolvendo a presença de receptores para ocitocina no corpo lúteo e endométrio de cadelas poderão facilitar a compreensão deste fenômeno.

O uso de aglepristone no dia $12,8 \pm 3,8$ pós-cobertura (Fieni et al., 2001b) não foi capaz de alterar a produção de P4, bem como não modificou as concentrações plasmáticas de PGFM. Estes resultados indicam a necessidade de uma sensibilidade hipotalâmica ou uterina à produção de prostaglandina, que parece só ocorrer no final da gestação, o que favoreceria o pico pré-parto de PGFM, como foi observado nas cadelas gestantes do presente estudo.

Hoffmann et al. (1996) utilizaram várias concentrações de indometacina em cadelas gestantes, com o intuito de bloquear a prostaglandina sintetase, e conseqüentemente, impedir a produção de $\text{PGF2}\alpha$. Nos dois animais que receberam as concentrações mais elevadas, foi observada a manutenção das altas concentrações de P4 , e concentração basal de PGFM por 2-3 dias a mais que nas cadelas controle.

Já Williams et al. (1999) e Luz et al. (2002) não conseguiram inibir o parto de cadelas com o bloqueio da ciclo-oxigenase através do uso de flunixin meglumine no pré-parto. Estes três trabalhos indicaram a necessidade da ocorrência do aumento de $\text{PGF2}\alpha$ para o desencadeamento do parto, fato também observado neste estudo, com o aumento de PGFM .

De acordo com Concannon et al. (2001), não se sabe se os corticóides poderiam aumentar a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ na placenta ou útero de cadelas, assim como ocorre nos primatas. Desta forma, o aumento da produção de $\text{PGF2}\alpha$ no pré-parto de cadelas não poderia ser explicado por mecanismos semelhantes aos ocorridos em bovinos e ovinos. Nestas espécies, pela ação do cortisol na placenta, ocorre aumento da produção de estrógenos e diminuição da P4 e secreção de $\text{PGF2}\alpha$, contração miometrial e parto.

Foi evidenciado neste estudo um padrão semelhante de produção de P4 nas cadelas de ambos os estados reprodutivos, havendo um pico máximo no terço inicial da fase luteal, com posterior e gradativo declínio.

Onclin e Verstegen (1997b) observaram resultados semelhantes, mas com declínio plasmático da P4 apenas após o dia 30, e com a duração do diestro em média 2-3 dias superior à da gestação. Semelhantemente, nesse estudo, o dia médio em que

a concentração de P4 atingiu valores basais no diestro (D66) ocorreu próximo ao dia em que a concentração da P4 atingiu valores basais na gestação (D64), e após o dia 20 já foi observado declínio da P4 plasmática. Foram observadas nesse trabalho variações de 30 a 66 dias, em média, de duração do diestro entre as cadelas.

A luteólise nas cadelas é um fenômeno gradativo e lento e isso pode ser devido a uma perda progressiva da capacidade esteroidogênica das células luteais, ou a um aumento da sensibilidade destas células à ação da $\text{PGF2}\alpha$ ao longo da fase luteal. Foi demonstrado por Nishiyama et al. (1999), que a presença das enzimas esteroidogênicas P450-SCC e 3β -HSD no corpo lúteo diminui do dia 40 ao dia 60 da gestação.

A cadela 'P' apresentou uma retomada das concentrações de P4 após o dia 76 do diestro. Neste animal, foi observado um aumento das concentrações de PGFM, com início no dia 20 do diestro, e atingiu valor máximo de 3524,65 pg/mL no dia 25, momento em que as concentrações de P4 começaram a declinar. Este pico abrupto de PGFM, pode ter sido responsável pelo declínio precoce das concentrações de P4 a valores basais, neste animal.

Vários estudos têm evidenciado que um suporte hipofisário é necessário para a manutenção da produção de P4 pelo corpo lúteo. Esse suporte é mais importante na segunda metade da gestação ou diestro, do que no início (Concannon et al., 1987; Okkens et al., 1990; Onclin e Verstegen, 1997a). Mas os resultados desse estudo, assim como os de outros pesquisadores (Concannon et al., 1975; Onclin e Verstegen, 1997b), evidenciaram que na segunda metade da gestação ou do diestro, as concentrações plasmáticas de P4 declinam lentamente, até atingirem valores basais inferiores a 1 ng/mL.

Parece contraditório pensar, mas ao mesmo tempo em que as concentrações de P4 já estão fisiologicamente declinando, o corpo lúteo é majoritariamente dependente de fatores luteotróficos. Desta forma, é possível que estas substâncias apenas impeçam que a queda da P4 ocorra mais rapidamente do que normalmente ocorre.

Todavia, no diestro, as concentrações de prolactina são mais baixas que na gestação (Onclin e Verstegen, 1997b), mas o declínio da P4 ocorre de maneira similar. É possível que a prolactina e/ou a relaxina em cadelas gestantes tenha alguma ação inibitória para impedir ou retardar a produção endometrial de prostaglandina, impedindo a ocorrência precoce do pico pré-parto de PGFM. Este efeito estaria baseado na ação luteotrófica da prolactina (Okkens et al., 1990; Onclin et al., 1997a), associada à capacidade da relaxina em estimular a prolactina, como observado em outras espécies, como ratas (Sortino et al., 1989) e porcas (Li et al., 1993). Embora existam na literatura vários trabalhos com uso de inibidores de prolactina em cadelas gestantes (Concannon et al., 1987; Onclin e Verstegen, 1997a), não se sabe se após a queda das concentrações de prolactina e P4 ocorre aumento das concentrações de PGFM.

Os resultados desse estudo demonstraram altas concentrações de estradiol, entre 5,19 pg/mL e 83,01 pg/mL, ao longo da gestação e do diestro, mas sem elevação no período pré-parto. Conforme revisado, o papel do estradiol tem sido evidenciado na luteólise em outras espécies domésticas (Castro e Paula, 2003).

Steinetz et al. (1990) enfatizaram que a fonte do estradiol elevado em cadelas pode ser o ovário ou corpo lúteo, assim como nas coelhas e ratas. Esta hipótese foi reforçada por Nishiyama et al. (1999), que demonstraram a presença de enzimas esteroidogênicas no corpo lúteo de cadelas, capazes de sintetizar estrógeno, e também pelo trabalho de Papa (2001), que verificou a presença de receptores para estradiol e

P4 no ovário de cadelas. Desta forma, é possível que o estradiol participe, de maneira autócrina ou parácrina, na regulação luteal de cadelas, participando ou estimulando a síntese de P4 luteal, ou interagindo para a síntese de PGF2 α endometrial.

Em bovinos, estudos têm sido realizados com vistas a elucidar as funções do estradiol na luteólise (Castro e Paula, 2003). Já em ratas, Gibori e Keyes (1978) sugeriram que o estrógeno formado por aromatização no corpo lúteo possui papel importante na regulação luteal durante a gestação, e estudos em suínos demonstraram que a adição de estradiol ao meio de perfusão é capaz de estimular a liberação de P4 pelo corpo lúteo *in vivo* (Jarry et al., 1990). É possível que tais eventos ocorram também no corpo lúteo canino, com o estradiol estimulando a secreção de P4 luteal.

Os estudos com cultivos *in vitro* de explantes de tecidos demonstraram que o endométrio possui grande capacidade de produção de PGF2 α , estimulado ou não por PDBu. A produção de PGF2 α pelo corpo lúteo e placenta foi bastante inferior ao endométrio. Além disso, foi verificado que a capacidade produtora do endométrio da cadela gestante foi superior à da cadela no diestro.

Estes resultados permitem inferir que, fisiologicamente, o endométrio de cadelas produz mais prostaglandina F2 α que os demais tecidos, e que também é capaz de responder melhor aos estímulos por PDBu. Entretanto, a concentração final de prostaglandina produzida depende da massa de tecido estimulada. Se além de maior capacidade de produção, o endométrio apresentar maior massa total quando comparado ao corpo lúteo ou a placenta, fica demonstrada a sua soberania na produção final de PGF2 α entre os tecidos estudados.

Relacionando os resultados de produção de PGF2 α *in vitro*, com a secreção de PGFM *in vivo*, pôde-se observar que a produção *in vivo* de PGFM apresentou um

aumento de aproximadamente 500%. Já a produção *in vitro* de PGF2 α apresentou um aumento de 100-200%. Estes resultados refletem o potencial do endométrio em produzir PGF2 α no período pré-parto, quando sob estímulos adequados, tanto *in vivo*, como *in vitro*. Desta forma, este modelo pode ser utilizado para pesquisas futuras sobre a função uterina em cadelas.

A regressão estrutural observada no corpo lúteo com posterior formação do *corpus albicans*, determinando o final do diestro, ocorreu sem a mediação da PGF2 α , pois não foi uma regressão abrupta, ou ainda, é possível que uma concentração crítica de PGF2 α tenha sido responsável pelo início da luteólise funcional observada neste estudo, com queda gradativa das concentrações de P4.

Praticamente não foram observadas células apoptóticas nos corpos lúteos das cadelas em todos os grupos estudados, mas todas as cadelas apresentaram atividade de caspase-3 durante o período estudado.

Embora a caspase-3 esteja envolvida com o fenômeno de apoptose, ela parece não possuir relação direta com a diminuição da esteroidogênese (Carambula et al., 2002). Isto confirma o que foi evidenciado neste estudo, já que no momento em que as cadelas apresentaram atividade de caspase-3, as concentrações plasmáticas de P4 já estavam basais. Além disso, o tecido oriundo do ovário das cadelas aos 75 e 85 dias do diestro, sugestivo de *corpus albicans*, também apresentou atividade (UAF/ μ g/ptn) de caspase-3.

A análise coletiva dos resultados do presente trabalho indicou que parecem existir mecanismos diferentes que controlam a função luteal e a luteólise, entre cadelas gestantes e em diestro. Diferentes fatores luteotróficos e luteolíticos interagem, diferentemente, nos dois estados reprodutivos, permitindo a ciclicidade ovariana.

Diferentemente de outras fêmeas domésticas, em cadelas não há um mecanismo de reconhecimento materno da gestação. Embora diferentes fatores possam controlar a função luteal na gestação ou no diestro, mesmo na ausência de gestação, o corpo lúteo produz P4 e permanece ativo durante o diestro, que na cadela possui duração semelhante à gestação.

Experimentos *in vivo* ou *in vitro*, com cultivos ou perfusão de tecidos do aparelho genital, permitirão maior compreensão da regulação luteal em cadelas, através de descobertas dos mecanismos celulares e moleculares que controlam esta função.

8 CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que:

1. A validação da técnica de radioimunoensaio para PGFM mostrou-se eficaz para cadelas;
2. A luteólise é um fenômeno gradativo em cadelas, e similar entre os estados reprodutivos estudados (diestro e gestação);
3. A duração da gestação e do diestro, em dias, foi semelhante;
4. Secreção de PGFM foi detectada durante toda a gestação e diestro com a ocorrência de um pico pré-parto;
5. Altas concentrações de estradiol foram detectadas do dia 40 ao 65 da gestação e do diestro;
6. A validação da técnica de radioimunoensaio para PGF2 α mostrou-se eficaz em explantes de endométrio, corpo lúteo e placenta de cadelas;
7. Entre os tecidos estudados, o endométrio é a fonte de PGF2 α em cadelas;
8. O fenômeno de apoptose não foi detectado nos corpos lúteos de cadelas pela técnica de CEC, e raramente pela técnica de HE;
9. Identificou-se atividade de caspase-3 tanto nos corpos lúteos das cadelas gestantes como em diestro e também no material sugestivo de *corpus albicans*.

7 REFERÊNCIAS¹

ABEL JR., J.H.; MCCLELLAN, M.C.; VERHAGE, H.G.; NISWENDER, G.N. Subcellular compartmentalization of the luteal cell in the ovary of the dog. **Cell Tissue Research**, v.158, p. 461-480, 1975.

ANDERSEN, A.C.; SIMPSON, M.E. Metestrus and anestrus: ovary, mammary gland and endometrium. In: _____. **The ovary and reproductive cycle in the dog (Beagle)**. Los Altos: Geron -x, 1973. p.164-190.

ANDRADE, F.S. **Manual de terapêutica veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2002. 720p.

ARNOLD, D.R.; BINELLI, M.; VONK, J.; ALEXENKO, A.P.; DROST, M.; WILCOX, C.J.; THATCHER, W.W. Intracellular regulation of endometrial PGF2 α production in dairy cows during early pregnancy and following treatment with recombinant interferon-tau. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 18, p. 199-216, 2000.

ASSELIN, E.; GOFF, A.K.; BERGERON, H.; FORTIER, M. Influence of sex steroids on the production of Prostaglandin F2 α and E₂ and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 371-379, 1996.

AUSTAD, R.; LUNDE, A.; SJAASTAD, O.V. Peripheral plasma concentrations of estradiol-17 β and progesterone in the bitch during the estrous cycle, in normal pregnancy and after dexamethasone treatment. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 46, p. 129-136, 1976.

¹ UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. Grupo de Trabalho Normalização Documentária da Unesp. **Normalização documentária para a produção científica da Unesp: normas para apresentação de referências segundo a NBR 6023:2002 da ABNT**. São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://www.biblioteca.unesp.br/pages/normalização.pdf>> Acesso em: 25 jul. 2003.

BENETTI, A.H. **Ultra-sonografia em modo-B e avaliação das concentrações séricas de progesterona, 17 β -estradiol e cortisol durante o final do proestro, estro e diestro gestacional em fêmeas da espécie canina (*Canis familiaris* – LINNAEUS, 1758).** 2001. 51 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Jaboticabal.

BINELLI, M.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; ARNOLD, D.R.; SIROIS, J.; HANSEN, T.R.; THATCHER, W.W. Interferon-tau modulates phorbol ester-induced production and expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase-A(2) from bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 417-424, 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUFF, S.; FONTBONNE, A.; LOPEZ, P.; RAUER, M.; CREVAT, D. Circulating relaxin concentrations in pregnant and nonpregnant bitches: evaluation of a new enzymeimmunoassay for determination of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 187-191, 2001.

BUHI, W.C.; THATCHER, M.J.; SHILLE, V.M.; ALVAREZ, I.M.; LANNON, A.P.; JOHNSON, J. Synthesis of uterine endometrial proteins during early diestrus in the cyclic and pregnant dog, and after estrogen and progesterone treatment. **Biology of Reproduction**, v. 47, p.326-336, 1992.

BURNS, P.D.; HAYES, S.H.; SILVIA, W.J. Cellular mechanisms by wich oxytocin mediates uterine prostaglandin F2 α in bovine endometrium: role of calcium. **Domestic Animal Endocrinology**, v.15, p. 477-487, 1998.

CARAMBULA, S.F.; MATIKAINEN, T.; LYNCH, M.P.; FLAVELL, R.A.; GONÇALVES, P.B.; TILLY, J.L.; RUEDA, B.R. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of ovarian corpus luteum. **Endocrinology**, v. 143, p. 1495-1501, 2002.

CASTRO e PAULA, L.A. **As funções do estradiol no processo da luteólise em bovinos: o papel da ocitocina na produção de PGF2 α .** 2003. 202 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

CHAKRABORTY, P.K. Reproductive hormone concentrations during estrus, pregnancy, and pseudopregnancy in the Labrador bitch. **Theriogenology**, v. 27, p. 827-840, 1987.

CHALLIS, J.R.G.; PATEL, F.A.; POMINI, F. Prostaglandin dehydrogenase and the initiation of labor. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 27, p.26-34, 1999.

CHALLIS, R.G.; LYE, S.J. Parturition. In _____. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p. 971-976.

CIBORI, G.; KEYES, P.L. The role of estradiol in early pregnancy in the rat. **Endocrinology**, v. 106, p. 1584-1589, 1980.

CONCANNON, P.W. Canine pregnancy: predicting parturition and timing events of gestation 2000. Recent advances in small animal reproduction. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em 25.03.2003

CONCANNON, P.W. Effects of hypophysectomy and of LH administration on the luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 58, p. 407-410, 1980.

CONCANNON, P.W.; BUTLER, W.R.; HANSEL, W.; KNIGHT, P.J.; HAMILTON, J.M. Parturition and lactation in the bitch: serum progesterone, cortisol and prolactin. **Biology of Reproduction**, v. 19, p. 1113-1118, 1978.

CONCANNON, P.W.; DiGREGORIO, G.B. Canine vaginal cytology. In: BURKE, T.J. **Small animal reproduction and fertility**. Philadelphia: Lea&Febiger, 1986. p. 96-111.

CONCANNON, P.W.; GIMPEL, T.; NEWTON, L.; CASTRACANE, V.D. Postimplantation increase in plasma fibrinogen concentration with increase in relaxin concentration in pregnant dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 1382-1385, 1996.

CONCANNON, P.W.; HANSEL, W.; VISEK, J. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH, and progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 13, p. 112-121, 1975.

CONCANNON, P.W.; ISAMAN, L.; FRANK, D.A.; MICHEL, F.J.; CURRIE, W.B. Elevated concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F-2 α in maternal plasma during prepartum luteolysis and parturition in dogs (*Canis familiaris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, p. 71-77, 1988.

CONCANNON, P.W.; MCCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 39, p. 3-25, 1989.

CONCANNON, P.W.; POWERS, M.E.; HOLDER, W.; HANSEL, W. Pregnancy and parturition in the bitch. **Biology of Reproduction**, v. 16, p. 517-526, 1977.

CONCANNON, P.W.; TSUTSUI, T.; SHILLE, V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 169-179, 2001.

CONCANNON, P.W.; WEINSTEIN, R.; WHALEY, S.; FRANK, D. Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 175-180, 1987.

CONCANNON, P.W.; HANSEL, W. Prostaglandin F₂ α induced luteolysis, hypothermia, and abortions in beagle bitches. **Prostaglandins**, v. 13, p. 533-542, 1977.

DANET-DESNOYERS, G.; WETZELS, C.; THATCHER, W.W. Natural and recombinant bovine interferon- τ regulate basal and oxytocin-induced secretion of prostaglandin F₂ α and E₂ by epithelial cells and stromal cells in the endometrium. **Reproduction and Fertility Development**, v. 6, p. 193-202, 1994.

DAVIS, J.S.; RUEDA, B.R. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 1949-1978, 2002.

DAWOOD, M.Y.; CHELLARAM, R.; KHAN-DAWOOD, F.S. Interleukin-1 β inhibits in vitro pulsatile progesterone secretion and stimulates prostaglandin F₂ α secretion by micro-retrodialyzed baboon corpus luteum. **Hormone and Metabolic Research**, v. 29, p. 483-490, 1997.

DE COSTER, R.; BECKERS, J.F.; WOULTERS-BALLMAN, P.; ECTORS, F. Variations de la LH, de la FSH, du 17 β estradiol et de la progesterone au cours du cycle oestral de la chienne. **Annales Medicine Vétérinaire**, v. 123, p. 177-184, 1979.

DEL CAMPO, C.H.; GINTHER, O.J. Arteries and veins of uterus and ovaries in dogs and cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 35, p. 409-415, 1974.

DEL CAMPO, C.H.; GINTHER, O.J. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: horses, sheep and swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, p. 305-316, 1973.

DORE, M.A.P. Structural aspects of luteal function and regression in the ovary of the domestic dog. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 41, p. 41-53, 1989.

EDQVIST, L.E.; JOHANSSON, E.D.B.; KASSTROM, H.; OLSSON, S.E.; RICHKIND, M. Blood plasma concentration of progesterone and estradiol in the dog during the estrous cycle and pregnancy. **Acta Endocrinologica Copenhagen**, v. 78, p. 554-564, 1975.

FERNANDES, P.A.; BOWEN, R.A.; KOSTAS, A.C.; SAWYER, H.R.; NETT, T.M.; OLSON, P.N. Luteal function in the bitch: changes during diestrus in pituitary concentration of and number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin. **Biology of Reproduction**, v. 37, p. 804-811, 1987.

FERNANDES, P.A.; BOWEN, R.A.; SAWYER, H.R.; NETT, T.M.; GORELL, T.A. Concentrations of receptors for estradiol and progesterone in canine endometrium during estrus and diestrus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 64-67, 1989.

FIENI, F.; MARNET, P.G.; MARTAL, J.; SILIART, B.; TOUZEAU, N.; BRUYAS, J.F.; TAINTURIER, D. Comparison of two protocols with a progesterone antagonist aglepristone (RU534) to induce parturition in bitches. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 237-242, 2001a.

FIENI, F.; MARTAL, J.; MARNET, P.G.; SILIART, B.; BERNARD, F.; RIOU, M.; BRUYAS, J.F.; TAINTURIER, D. Hormonal variation in bitches after early or mid-pregnancy termination with aglepristone (RU534). **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 2243-2248, 2001b.

FOSSUM, T.W. **Small Animal Surgery**, 2. ed. New York: Mosby, 2001. 1520p.

FRASER, H.M.; LUNN, S.F.; HARRISON, D.J.; KERR, J.B. Luteal regression in the primate: different forms of cell death during natural and gonadotrophin-releasing hormone antagonist or prostaglandin analogue-induced luteolysis. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1468-1479, 1999.

FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, p. 1871-1875, 2001.

GEMMELL, R.T.; STACY, B.D.; THORNBURN, G.D. Morphology of the regression corpus luteum of the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 14, p. 270-279, 1976.

GERSTENBERG, C.; NÖTHLING, J.O. The effects of metergoline combined with PGF₂ α treatment on luteal function and gestation in pregnant bitches. **Theriogenology**, v. 44, p. 649-659, 1995.

GIBORI, G.; KEYES, P.L. Role of intraluteal estrogen in the regulation of the rat corpus luteum during pregnancy. **Endocrinology**, v.102, p. 1176-1182, 1978.

GIBORI, G.; KHAN, I.; WARSHAW, M.L.; MCLEAN, M.P.; PURYEAR, T.K.; NELSON, S.; DURKEE, T.J.; AZHAR, S.; STEINSCHNEIDER, A; RAO, M.C. Placental-derived regulators and the complex control of luteal cell function. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 44, p. 377-429, 1988.

GINTHER, O.J.; DEL CAMPO, C.H.; RAWLINGS, C.A. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: a local venoarterial pathway between uterus and ovaries in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, p. 723-728, 1973.

GRÄF, K.J. Serum oestrogen, progesterone and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 52, p. 9-14, 1978.

GRAVES, P.E.; PIERCE, K.L.; BAILEY, T.J.; RUEDA, B.R.; GIL, D.W.; WOODWARD, D.F.; YOOL, A.J.; HOYER, P.B.; REGAN, J.W. Cloning of a receptor for prostaglandin F₂ α from the ovine corpus luteum. **Endocrinology**, v. 136, p. 3430-3436, 1995.

GURAYA, S.S. Some observations on the histochemical features of developing follicles and corpus luteum in the cat and dog ovary. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungariae**, v. 19, p. 351-362, 1969.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6.ed. São Paulo: Manole, 1995. 582p.

HEAP, R.B.; POYSER, N.L. Prostaglandins in pyometrial fluid from the cow, bitch and ferret. **British Journal of Pharmacology**, v. 55, p. 515-518, 1975.

HOFFMANN, B.; HÖVELER, R.; HASAN, S.H.; FAILING, K. Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, p. 837-845, 1992.

HOFFMANN, B.; REISENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 275-288, 1996.

HOFFMANN, B.; SCHNEIDER, S. Secretion and release of luteinizing hormone during the luteal phase of the oestrous cycle in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 47, p. 85-91, 1993.

HOFFMANN, B.; HOVELER, R.; NOHR, B.; HASAN, S.H. Investigations on hormonal changes around parturition in the dog and the occurrence of pregnancy-specific non-conjugated oestrogens. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 102, p. 185-189, 1994.

HOLST, P.A.; PHEMISTER, R.D. Onset of diestrus in the beagle bitch: definition and significance. **American Journal of Veterinary Research**, v. 35, p. 401-406, 1974.

HORI, T.; AKIKAWA, T.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Effects of administration of prostaglandin F2 α -analogue fenprostalene on canine corpus luteum and subsequent recurrence of estrus and fecundity. **Theriogenology**, v. 64, p. 807-811, 2002.

HSU, W. H.; CRUMP, M.H. The adrenal gland. In:____. **Veterinary endocrinology and reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p. 202-230.

IRONS, P.C.; NÖTHLING, J.O.; VOLKMANN, D.H. Failure of luteolysis leads to prolonged gestation in a bitch: a case report. **Theriogenology**, v. 48, p. 353-359, 1997.

JAROSZEWSKI, J.J.; SKARZYNSKI, D.J.; HANSEL, W. Nitric oxide as a local mediator of prostaglandin F2 α -induced regression in the bovine corpus luteum: an in vivo study. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, p. 1057-1062, 2003.

JARRY, H.; EINSPANIER, A.; KANNGIEBER, L.; DIETRICH, M.; PITZEL, L.; HOLTZ, W.; WUTTKE, W. Release and effects of oxytocin on estradiol and progesterone secretion in porcine corpora lutea as measured by an in vivo microdialysis system. **Endocrinology**, v. 126, p. 2350-2358, 1990.

JEFFCOATE, I.A. Concentrations of luteinizing hormone and oestradiol in plasma and response to injection of gonatrophin releasing hormone at different stages of anoestrus in domestic bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 423-429, 1992.

JEFFCOATE, I.A. Endocrinology of anoestrous bitches. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 47, p. 69-76, 1993.

JEFFCOATE, I.A. Physiology and endocrinology of the bitch. In:____. **Manual of small animal reproduction and neonatology**. Cheltenham: BSAVA, 1998. p. 1-9.

JOHNSON, A.L.; BRIDGHAM, J.T. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. **Reproduction**, v. 124, p.19-27, 2002.

JOHNSON, M.S.; SIMPSON, J.; MACEWAN, D.J.; ISO, A.; CLEGG, R.; CONNOR, K.; MITCHELL, R. Phorbol ester and diacylglycerol activation of native protein kinase C species from various tissues. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 146, p. 127-137, 1995.

JOHNSTON, S. **Canine reproduction**: lessons in reproductive biology. The 2000 Bartlett address: a monograph. In: Society for Theriogenology. p.1-5. Disponível em: <<http://www.hilltopanimalhospital.com/therio%20history.htm>>. Acesso em: 21 nov. 2003.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and feline reproduction**. 1 ed. Philadelphia: Saunders Company, 2001. 592p.

JUENGEL, J.L.; GARVERICK, H.A.; JOHNSON, A.L.; YOUNGQUIST, R.S.; SMITH, M.F. Apoptosis during luteal regression in cattle. **Endocrinology**, v. 132, p. 249-254, 1993.

JUENGEL, J.L.; SMITH, G.W.; YOUNGQUIST, R.S.; GARVERICK, H.A. Pattern of protein production by corpora lutea during luteolysis and characterization of expression of two major secretory products of regressing corpora lutea. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 515-520, 1994.

KAHN, I.; BELANGER, A.; CHEN, Y-DI; CIBORI, G. Influence of high density lipo-protein on estradiol stimulation of luteal steroidogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 96-104, 1985.

KARSCH, F.J.; NOVEROSKE, J.W.; ROCHE, J.F.; NORTON, H.W.; NALBANDOV, A.V. Maintenance of ovine corpora lutea in the absence of ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 87, p. 1228-1236, 1970.

KHAN, S.M.; DAUFFENBACH, L.M.; YEH, J. Mitochondria and caspases in induced apoptosis in human luteinized granulosa cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 542-545, 2000.

KISO, Y.; YAMAUCHI, S. Histochemical study on hydroxysteroid dehydrogenases in the trophoblast of the dog placenta. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 46, p. 219-223, 1984.

KOOISTRA, H.S.; OKKENS, A.C. Role of changes in the pulsatile secretion pattern of FSH in initiation of ovarian folliculogenesis in bitches. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 11-14, 2001.

LEYMARIE, P.; MARTAL, J. The corpus luteum from cycle to gestation. In:____. **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses, 1993. p. 413-433.

LI, Y.; HUANG, C.; KLINDT, J.; ANDERSON, L.L. Stimulation of prolactin secretion in the pig : central effects of relaxin and the antiprogesterone RU 486. **Endocrinology**, v. 133, p. 1205-1212, 1993.

LUZ, M.R.; LOPES, M.D.; TAMAMARU, R.A.; BINELLI, M. Estudo da inibição da luteólise com flunixin meglumine em cadelas gestantes. In: XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA (CONBRAVET), 2002, Gramado. **Anais...** Gramado, 2002.

MAAS, S.; JARRY, H.; TEICHMANN, A.; RATH, W.; KUHN, W.; WUTTKE, W. Paracrine actions of oxytocin, prostaglandin F_{2α}, and estradiol within the human corpus luteum. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 74, p. 306-312, 1992.

MAGOFFIN, D.A.; WEITSMAN, S.R. Insulin-like growth factor-I stimulates the expression of 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid in ovarian theca interstitial cells. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 1166-1173, 1993.

MCBRIDE, M.W.; AUGHEY, E.; O'SHAUGHNESSY, P.J.; JEFFCOATE, I.A. Ovarian function and FSH receptor characteristics during canine anoestrus. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 3-10, 2001.

McCOMARCK, J.T.; FRIEDERICH, M.G.; LIMBACK, S.D.; GREENWALD, G.S. Apoptosis during spontaneous luteolysis in the cyclic golden hamster: biochemical and morphological evidence. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 255-260, 1998.

McCRAKEN, J.A.; SCHAMM, W.; OKULICZ, W.C.; Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF 2α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p. 31-55, 1984.

McCRAKEN, J.A.; SMITH, T.T.; LAMSA, J.C.; ROBINSO, A.G. The effect of estradiol-17 β and progesterone on the oxytocin pulse generator in the ovariectomized sheep. **Biology of Reproduction Supplement**, v. 44, p. 87, 1991.

MEYER, M.D.; HANSEN, P.J.; THATCHER, W.W.; DROST, M.; BADINGA, L.; ROBERTS, R.M.; LI, T.L.; BAZER, F.W. Extension of corpus luteum function and reduction of uterine secretion of prostaglandin F 2α of cows in response to recombinant interferon-tau. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1921-1931, 1995.

MIYAMOTO, A.; LÜTZOW, H.V.; SCHAMS, D. Acute actions of prostaglandin F 2α , E 2 , and I 2 in microdialyzed bovine corpus luteum in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 423-430, 1993.

MURPHY, B.D.; RAJKUMAR, K. Prolactin as a luteotrophin. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, p. 257-264, 1985.

NDIKUN-MOFFOR, F.; SIMMEN, R.C.M.; CHANG, S-M.T.; FIELDS, M.J. Secretory proteins of the bovine corpus luteum: the estrous cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction Supplement**, v. 52, p. 110 1995. (abstract)

NETT, T.M.; AKBAR, A.M.; PHEMISTER, R.D.; HOLST, P.A.; REICHERT, L.E.; NISWENDER, G.D. Levels of luteinizing hormone, estradiol and progesterone in serum during the estrus cycle and pregnancy in the Beagle bitch. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 148, p. 134-139, 1975.

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 F $2[\alpha]$ –induced luteolysis in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, 2003. in press.

NISHIYAMA, T.; TSUMAGARI, S.; ITO, M.; KIMURA, J.; WATANABE, G.; TAYA, K.; TAKEISHI, M. Immunohistochemical study of the steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 28, p.125-129, 1999.

NISWENDER, G.D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v. 123, p. 333-339, 2002.

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. 1-28, 2000.

NÖHR, B.; HOFFMANN, B.; STEINETZ, B.E. Investigation of the endocrine control of parturition in the dog by application of an antigestagen. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 47, p. 542-543, 1993.

OKKENS, A.C.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; WILLEMSE, A.H. Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog. **The Veterinary Quarterly**, v. 12, p. 193-200, 1990.

OKKENS, A.C.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; WILLEMSE, A.H. Shortening of the interestrous interval and the lifespan of the corpus luteum of the cyclic dog by bromocriptine treatment. **The Veterinary Quarterly**, v. 7, p. 173-176, 1985a.

OKKENS, A.C.; DIELEMAN, S.J.; BEVERS, M.M.; LUBBERINK, A.A.M.F.; WILLEMSE, A.H. Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 77, p. 187-192, 1986.

OKKENS, A.C.; DIELEMAN, S.J.; BEVERS, M.M.; WILLEMSE, A.H. Evidence for the noninvolvement of the uterus in the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. **The Veterinary Quarterly**, v. 7, p. 169-173, 1985b.

OLSON, D.M.; MIJOVIC, J.E.; SADWSKY, D.W. Control of human parturition. **Seminars in Perinatology**, v. 19, p. 52-63, 1995.

OLSON, P.N.; BOWEN, R.A.; BEHRENDT, M.D.; OLSON, J.D.; NETT, T.M. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 1196-1206, 1982.

OLSON, P.N.; BOWEN, R.A.; BEHRENDT, M.D.; OLSON, J.D.; NETT, T.M. Concentrations of progesterone and luteinizing hormone in the serum of diestrous bitches before and after hysterectomy. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 149-153, 1984a.

OLSON, P.N.; BOWEN, R.A.; BEHRENDT, M.D.; OLSON, J.D.; NETT, T.M. Validation of radioimunoassays to measure prostaglandins $F_{2\alpha}$ and E_2 in canine endometrium and plasma. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p.119-124, 1984b.

OLSON, P.N.; NETT, T.M.; BOWEN, R.A.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. Endocrine regulation of the corpus luteum of the bitch as potencial target for altering fertility. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 39, p. 27-40, 1989.

ONCLIN, K.; LAUWERS, F.; VERSTEGEN, J.P. FSH secretion patterns during pregnant and nonpregnant luteal periods and 24h secretion patterns in male and female dogs. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 15-21, 2001.

ONCLIN, K.; MURPHY, B.; VERSTEGEN, J.P. Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches. **Theriogenology**, v. 57, p. 1957-1972, 2002.

ONCLIN, K.; SILVA, L.D.M.; DONNAY, I.; VERSTEGEN, J.P. Luteotrophic action of prolactin in dogs and the effects of a dopamine agonist, cabergoline. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 403-409, 1993.

ONCLIN, K.; SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J. Termination of unwanted pregnancy in dogs with the dopamine agonist, cabergoline, in combination with a synthetic analog of PGF $_{2\alpha}$, either cloprostenol or alphaprostol. **Theriogenology**, v. 43, p.813-822, 1995.

ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J.P. In vivo investigations of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopamine agonist, and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and –diestrus. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, p. 25-38, 1997a.

ONCLIN, K; VERSTEGEN, J. P. Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrous beagle bitches. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 51, p. 203-208, 1997b.

ONCLIN, K; VERSTEGEN, J. Comparisons of different combinations of analogues of PGF2 alpha and dopamine agonists for the termination of pregnancy in dogs. **Veterinary Record**, v. 144, p. 416-419, 1999.

PAPA, P.C. **Darstellung von estradiol-17- β und progesteronrezeptoren im corpus luteum der hündin zu definierten zeitpunkten im östrus und diöstrus**. 2001. 117p. Tese (Inaugural-Disseration-Doktorgrades) – Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen.

PATE, J.L.; KEYES, P.L. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? **Reproduction**, v. 122, p.665-676, 2001.

PIPER, P.J.; VANE, J.R.; WYLLIE, J.H. Inactivation of prostaglandins by the lungs. **Nature**, v. 225, p. 600-604, 1970.

PRIEDKALNS, J.; WEBER, A.F. The succinic dehydrogenase and lipid content of follicular and luteal cells of the bovine ovary. **Acta Anatomica**, v. 71, p. 542-564, 1968.

PURYCAR, T.K.; MCLEAN, M.P.; KHAN, I.; CIBORI, G. Mechanism for control of HMG-CoA reductase and cytochrome P450 side chain cleavage message and enzyme in the corpus luteum. **Endocrinology**, v. 126, p. 2910-2919, 1990.

RAHIMI, G.; ISACHENKO, E.; SAUER, H.; WARTENBERG, M.; ISACHENKO, V.; HESCHELER, J.; MALLMANN, P.; NAWROTH, F. Measurement of apoptosis in long-term cultures of human ovarian tissue. **Reproduction**, v. 122, p. 657-663, 2001.

RODGERS, RJ; MITCHELL, MD; SIMPSON, ER. Secretion of progesterone and prostaglandins by cells of bovine corpora lutea from three stages of the luteal phase. **Journal of Endocrinology**, v. 118, p. 121-126, 1988.

ROTHCHILD, I. The regulation of mammalian corpus luteum. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 37, p. 183-298, 1981.

RUEDA, B.R.; HENDRY, I.R.; HENDRY III, W.J.; STORMSHAK, F.; SLAYDEN, O.D.; DAVIS, J.S. Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**, v. 62, p.269-276, 2000.

RUEDA, B.R.; HENDRY, I.R.; TILLY, J.L.; HAMERNIK, D.L. Accumulation of caspase-3 messenger ribonucleic acid and induction of caspase activity in the ovine corpus luteum following prostaglandin F₂ α treatment in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1087-1092, 1999.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.E. ; WILTBAMK, M.C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2832-2842, 2001.

SAS. **SAS/STAT™ user's guide (Release 6.03)**. Cary: 1988.

SAWYER, H.R.; NISWENDER, K.D.; BRADEN, T.D.; NISWENDER, G.D. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF₂ α . **Domestic Animal Endocrinology**, v.7, p. 229-237, 1990.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. Pullman: Current Conceptions, 1999. 247p.

SHIKONE, T.; YAMOTO, M.; KOKAWA, K. ;YAMASHITA, K.; NISHIMORI, K.; NAKANO, R. Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**,v. 81, p. 2376-2380, 1996.

SILVA, L.D.M. **Procréation médicalement assistée dans l'espèce canine**. Investigations morpho-fonctionnelles et optimisation des techniques permettant d'arriver à la maîtrise de la reproduction. 1995.173 f. Tese (Docteur en Sciences Vétérinaires) - Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Section de Petits Animaux, Liège.

SMITH, M.F.; MCINTUSH, E.W.; SMITH, G.W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **Journal of Animal Science**, v.72, p. 1857-1872, 1994.

SMITH, M.S.; MC DONALD, L.E. Serum levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrous cycle, pseudopregnancy and pregnancy in the dog. **Endocrinology**, v. 94, p. 404-413, 1974.

SORTINO, M.A.; CRONIN, M.J.; WISE, P.M. Relaxin stimulates prolactin secretion from anterior pituitary cells. **Endocrinology**, v. 124, p. 2013-2015, 1989.

SPIES, H.G.; MAHONEY, C.J.; NORMAN, R.L.; CLIFTON, D.K.; RESKO, J.A. Evidence for a diurnal rhythm in ovarian steroid secretion in the rhesus monkey **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 39, p. 347-351, 1974.

SRIKANDAKUMAR, A.; INGRAHAM, R.H.; ELLSWORTH, M.; ARCHBALD, L.F.; LIAO, A.; GODKE, R.A. Comparison of a solid phase, no-extraction radioimmunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch and cow. **Theriogenology**, v. 26, p. 779-793, 1986.

STEINETZ, B.G.; GOLDSMITH, L.T.; HARVEY, H.J.; LUST, G. Serum relaxin and progesterone concentrations in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches: detection of relaxin as a marker of pregnancy. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 68-71, 1989.

STEINETZ, B.G.; GOLDSMITH, L.T.; HASAN, S.H.; LUST, G. Diurnal variation of serum progesterone, but not relaxin, prolactin, or estradiol-17 β in the pregnant bitch. **Endocrinology**, v. 127, p. 1057-1063, 1990.

STORMSHAK, F. Biochemical and endocrine aspects of oxytocin by the mammalian corpus luteum. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, p. (1):92, 2003.

TABOGA, S.R.; MELLO, M.L.S. Discrimination of apoptotic cells events in human prostatic lesions. **Revista Brasileira de Genética**, v. 19, p. 97, 1996.

TAKIGUCHI, S.; SUGINO, N.; ESATO, K.; KARUBE-HARADA, A.; SAKATA, A.; NAKAMUR, Y.; ISHIKAWA, H.; KATO, H. Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. **Biology of Reproduction**, Disponível em <www.biolreprod.org> Acesso em 30.10.2003

TERRANOVA, P.F.; TAYLOR, C.C. Apoptosis (Cell Death) In:____. **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1999. v. 1, p. 261-273.

THATCHER, W.W.; BINELLI, M.; BURKE, J.; STAPLES, C.R.; AMBROSE, J.D.; COELHO, S. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology**, v. 47, p. 131-140, 1997.

TOAF, M.E.; STRAUSS, J.F.; HAMMOND, J.M.; Regulation of cytochrome P450SCC in immature porcine granulosa cells by FSH and estradiol. **Endocrinology**, v. 112, p. 1156-1158, 1983.

TOWSON, D.H.; WANG, X.J.; KEYES, P.L.; KOSTYO, J.L.; STOCCO, D.M. Expression of the steroidogenic acute regulatory protein in the corpus luteum of the rabbit: dependence upon the luteotropic hormone, estradiol-17 β . **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 868-874, 1996.

VANAGS, D.M.; PORN-ARES, M.I.; COPPOLA, S.; BURGESS, D.H.; ORRENIUS, S. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. **Journal of Clinical Biological Chemistry**, v. 271, p. 31075-31085, 1996.

VERSTEGEN, J.; ONCLIN, K. The ovarian cycle and oestrus induction in the bitch, prostate diseases in the male dog. In: SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY ANNUAL CONFERENCE, 2002, Colorado Springs. **Proceedings...** Colorado Springs, 2002.

VERSTEGEN, J.; ONCLIN, K.; WOUTERS-BALLMAN, P. Remnant progesterone production by the corpus luteum of the anestrus ovary and its role in anoestrus regulation in bitches. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTION OF DOGS, CATS AND EXOTIC CARNIVORES, 3., 1996, Veldhoven, The Netherlands. **Proceedings...** Veldhoven, 1996. abstract 50

VIDAL, B.C.; BARBISAN, L.F.; MARIA, S.S.; RUSSO, J.; MELLO, M.L.S. Apoptosis: identification by a critical electrolyte concentration. **Apoptosis**, v. 1, p. 218-221, 1996.

VILLA-GODOY, A.; IRELAND, J.J.; WORTMAN, J.A.; AMES, N.K.; HUGHES, T.L.; FOGWELL, R.L.; Effect of ovarian follicles on luteal regression in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 60, p. 519-527, 1985.

WEBB, R.; WOAD, K.J.; ARMSTRONG, D.G. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 277-285, 2002.

WEEMS, Y.S.; KIM, L.; HUMPHREYS, V.; TSUDA, V.; WEEMS, C.W. Effect of luteinizing hormone (LH), pregnancy specific protein B (PSPB), or arachidonic acid (AA) on ovine endometrium of the estrous cycle or placental secretion of prostaglandins E2 (PGE2) and F2alpha (PGF2alpha) and progesterone in vitro. **Prostaglandins and Other Lipid Mediator**, v. 71, p. 55-73, 2003.

WHITTLE, W.L.; PATEL, F.A.; ALFAIDY, N.; HOLLOWAY, A.C.; FRASER, M.; GYOMOREY, S.; LYE, S.J.; GIBB, W.; CHALLIS, J.R.G. Glucocorticoid regulation of human and ovine parturition: The relationship between fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and intrauterine prostaglandin production. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1019-1032, 2001.

WILLIAMS, B.J.; WATTS, J.R.; WRIGHT, P.J.; SHAW, G.; RENFREE, M.B. Effect of sodium cloprostenol and flunixin meglumine on luteolysis and the timing of birth in bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, p. 103-111, 1999.

WUTTKE, W.; PITZEL, L.; KNOKE, I.; THEILING, K.; JARRY, H. Immune-endocrine interactions affecting luteal function in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 52, p.19-29, 1997.

YUAN, W.; GIUDICE, L.C. Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, p.3148-3155, 1997.

10 ANEXOS

10.1 Protocolo para determinação por radioimunoensaio (RIE) da concentração de 12,13 dihidro-15ceto-prostaglandina F2 α (PGFM) em plasma canino (Meyer et al., 1995)

Os ensaios de PGFM são realizados em duas etapas. Na primeira etapa, é realizado o preparo das soluções da curva padrão em concentrações de 1,51; 3,12; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0 e 800,0 pg/mL. São adicionados aos tubos do ensaio: solução da curva padrão de 1,51 a 800,0 pg/mL; 300 μ L das referências de 100 pg/mL e 1000 pg/mL (controle – início e final do ensaio); 30 μ L de cada amostra; Os tubos NSB (non-specific binding), TC (total count), B0 (binding), referências e amostras recebem Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 nos volumes de 200 μ L, 500 μ L, 100 μ L, 100 μ L e 100 μ L, respectivamente. São adicionados 300 μ L de plasma canino livre de prostaglandinas (PCLP) nos tubos NSB, B0 e curva, e 270 μ L nas amostras. Adiciona-se o anticorpo anti-PGFM (100 μ L) em concentração final 1:7000 (exceto tubos NSB e TC). Incubação a 30 minutos à temperatura ambiente e adição da solução de PGFM - 3 H (Amersham Pharmacia - TRK 517), no volume de 100 μ L/tubo. Incubação por 1 hora à temperatura ambiente, e a 4°C, por 16-20 horas. Todas as amostras devem ser mensuradas em duplicata. O volume total final de cada tubo é de 600 μ L. Na segunda etapa, procede-se a separação do antígeno ligado do não-ligado aos anticorpos, através da adição de 750 μ L de solução de PEG 6000 a 40% (PEG Fischer Scientific), centrifugação a 3000G, por 30 minutos, a 4°C e ressuspensão em 750 μ L de Tris-HCl 0,05 M pH 7,4. O conteúdo dos tubos de vidro é invertido em tubos de cintilação e realiza-se a adição de 4500 μ L de líquido de cintilação (ScintiVerse Bio HP; Wallac). As contagens são realizadas em contador de partículas Beta.

10.2 Volumes (solução-padrão, amostras, referências, Tris-HCl^a, plasma livre de prostaglandina, anticorpo, PGFM radioativa, PEG e líquido de cintilação) adicionados aos tubos NSB^b, TC^c, B0^d, curva padrão, referências e amostras, nos radioimunoensaios de PGFM.

1ª Etapa	NSB	TC	B0	Curva padrão	Referências	Amostras
Curva padrão	-	-	-	100µL	-	-
Amostras	-	-	-	-	-	30µL
Referências	-	-	-	-	-	300µL
Tris-HCl	200µL	500µL	100µL	-	100µL	100µL
Plasma livre de prostaglandina (PCLP)	300µL	-	300µL	300µL	-	270µL
Anticorpo	-	-	100µL	100µL	100µL	100µL
PGFM radioativa	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL
2ª Etapa	NSB	TC	B0	Curva padrão	Referências	Amostras
PEG	750µL	-	750µL	750µL	750µL	750µL
Tris-HCl	750µL	750µL	750µL	750µL	750µL	750µL
PEG	750µL	750µL	750µL	750µL	750µL	750µL
Tris-HCl	750µL	750µL	750µL	750µL	750µL	750µL
Líquido de Cintilação	4,5 mL	4,5 mL	4,5 mL	4,5 mL	4,5 mL	4,5 mL

^a Solução tampão 0,05 M pH 7,4

^b Non-specific binding (Ligações não-específicas)

^c Total Count (Ligações totais)

^d B zero

10.3 Protocolo para determinação por radioimunoensaio (RIE) da concentração de PGF2 α em cultivos de explantes de tecidos caninos (Danet-Desnoyers et al., 1994)

O ensaio de PGF2 α é realizado em duas etapas. Na primeira etapa, realiza-se o preparo das soluções da curva padrão em concentrações de 1,512; 3,125; 6,250; 12,50; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0 e 800 pg/mL; adição das soluções da curva padrão (100 μ L), nas concentrações citadas; referências de 125 pg/mL e 1000 pg/mL (tubos controle – início e fim do ensaio); 100 μ L de cada amostra; solução tampão Tris-HCl 0,05 M com pH 7,5 (200 μ L – exceto tubos da curva e referências); os tubos B0 ('binding') recebem 100 μ L de Tris-HCl 0,05M pH 7,4; meio de cultivo Ham-F10 (100 μ L) em todos os tubos (exceto amostras); adição de anticorpo anti-PGF2 α em concentração final 1:4000 (100 μ L - exceto tubos NSB 'non-specific binding' e TC 'total count'); solução de PGF2 α radioativa - 3 H (100 μ L) (Amersham Pharmacia Biotech TRK 464) a todos os tubos e incubação de 30 minutos à temperatura ambiente e a 4°C por 16-20 horas. O volume total final de cada tubo é de 400 μ L. Todas as amostras devem ser mensuradas em duplicata. Na segunda etapa, adiciona-se 500 μ L de solução de carvão ativado (Sigma) e dextran (Sigma) (0,25 mg carvão + 0,025 mg dextran / 100 mL Tris HCl 0,05 M pH 7,4 – em todos os tubos, exceto tubos TC), à temperatura de 4°C, em pipetagem máxima de 4 minutos entre início e final. O material é centrifugado por 15 minutos, a 3000 rpm e 4°C, o sobrenadante invertido em tubos plásticos de cintilação, sem agitação e realiza-se adição de 4 mL de líquido de cintilação (Optiphase HiSafe 3 – Wallac). As contagens são realizadas em contador de partículas Beta (Wallac).

10.4 Volumes (solução-padrão, amostras, referências, Tris-HCl^a, meio Ham-F10, anticorpo, PGF2 α radioativa, solução carvão ativado e dextran, líquido de cintilação) adicionados aos tubos NSB^b, TC^c, B0^d, curva padrão, referências e amostras, nos radioimunoensaios de PGF2 α .

1ª Etapa	NSB	TC	B0	Curva padrão	Referências	Amostras
Curva padrão	-	-	-	100 μ L	-	-
Amostras	-	-	-	-	-	100 μ L
Referências	-	-	-	-	-	100 μ L
Tris-HCl	200 μ L	200 μ L	100 μ L	-	-	100 μ L
Meio Ham F-10	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	-
Anticorpo	-	-	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
PGF2α radioativa	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
2ª Etapa						
Solução carvão ativado + dextran	500 μ L	-	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L
Líquido de Cintilação	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL

^a Solução tampão 0,05 M pH 7,4

^b Non-specific binding (Ligações não-específicas)

^c Total Count (Ligações totais)

^d B zero

Resumo

Luz, M.R. *Função luteal e luteólise em cadelas: aspectos morfo-funcionais*, São Paulo. Botucatu, 2004. 150p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Os mecanismos luteotróficos e luteolíticos que controlam a função luteal em cadelas têm sido investigados. Este estudo avaliou as concentrações plasmáticas de PGFM e progesterona ao longo da gestação e do diestro, e do estradiol a partir do dia 40 da gestação ou diestro; a produção *in vitro* de PGF2 α através de cultivos de explantes de endométrio, corpo lúteo e placenta, com ou sem estímulo por PDBu; a ocorrência de apoptose nas células luteais; e o envolvimento da enzima caspase-3 na luteólise em cadelas. Foram utilizadas 17 cadelas sem-raça-definida, divididas em dois grupos: diestro e gestação. Foi verificado que a queda das concentrações plasmáticas de progesterona em cadelas é um fenômeno lento e gradativo, que ocorreu a partir do terço inicial da gestação ou do diestro. As concentrações basais de progesterona foram atingidas nos dias 64 e 66 da gestação e diestro, respectivamente. Altas concentrações de PGFM e estradiol foram detectadas na segunda metade do diestro e da gestação. Ocorreu aumento progressivo de PGFM na segunda metade da gestação, e não no diestro, que culminou com um pico pré-parto. Os cultivos *in vitro* evidenciaram que o endométrio possui grande capacidade de produção de PGF2 α , estimulado ou não por PDBu, superior aos explantes de corpo lúteo e de placenta, e mais pronunciado nos explantes de endométrio de cadelas gestantes comparados aos de cadelas em diestro. As análises histológicas por HE e CEC evidenciaram raras células apoptóticas no corpo lúteo das cadelas gestantes e em diestro, com células luteais íntegras detectadas nos corpos lúteos de cadelas no final da gestação, pós-parto imediato e aos 65 dias do diestro. Material sugestivo de *corpus albicans* foi evidenciado nos ovários oriundos das cadelas aos 75 e 85 dias do diestro. As concentrações de UAF/ μ g/ptn de caspase-3 não diferiram entre as cadelas gestantes e em diestro. Também foram detectadas concentrações de UAF/ μ g/ptn de caspase-3 no material sugestivo de *corpus albicans*.

Palavras-chave: cadela, corpo lúteo, luteólise, função luteal, caspase-3.

Abstract

Luz, M.R. *Luteal function and luteolysis in bitches: morpho-functional aspects*, São Paulo. Botucatu, 2004. 150p. Thesis (PhD in Animal Reproduction) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus of Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Luteotrophic and luteolytic mechanisms that control the luteal function in bitches are being investigated. This study evaluated the PGFM and progesterone plasma concentrations throughout pregnancy and diestrus, and plasma estradiol concentrations from day 40 of pregnancy or diestrus on; the *in vitro* production of PGF2 α from explants of endometrium, corpus luteum and placenta cultures, with or without PDBu stimulation; the occurrence of apoptosis in the luteal cells; and the involvement of the enzyme caspase-3 in the luteolysis in bitches. Seventeen cross-bred bitches, divided into 2 groups were used: diestrus and pregnancy. It was observed that the decrease of the plasma progesterone concentrations in bitches is a slow and gradual process, which happened since the initial third of pregnancy or diestrus. The basal values of progesterone occurred at days 64 and 66 of pregnancy and diestrus, respectively. High plasma concentrations of PGFM and estradiol were detected at the second half of pregnancy, and not of diestrus, and culminate with a pre-partum peak. The *in vitro* cultures showed that endometrium has a big capacity of PGF2 α production, stimulated or not by PDBu, and superior to corpus luteum or placenta explants, and also much more pronounced in the endometrium explants from pregnant compared to diestrus bitches. The histological analysis by HE and CEC showed rare apoptotic cells in the corpus luteum from pregnant and diestrus bitches, with intact luteal cells detected in corpora lutea from bitches in final pregnancy, immediate post-partum period and at 65 days of diestrus. Material suggestive of *corpus albicans* was evidenced in the ovaries of bitches on days 75 and 85 of diestrus. The concentrations of UAF/ μ g/ptn of caspase-3 did not differ between pregnant or diestrus bitches, and was also detected in the material suggestive of *corpus albicans*.

Key-words: bitch, corpus luteum, luteolysis, luteal function, caspase-3.