

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA LUTEOLÍTICA DE
DIFERENTES DOSES DE CLOPROSTENOL SÓDICO E
DINOPROST TROMETAMINA ADMINISTRADAS NOS DIAS 4
E 11 DO CICLO ESTRAL DE FÊMEAS BOVINAS DE
CORTE”**

**Gabriel Artur Marciano do Nascimento
Médico Veterinário**

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA LUTEOLÍTICA DE
DIFERENTES DOSES DE CLOPROSTENOL SÓDICO E
DINOPROST TROMETAMINA ADMINISTRADAS NOS DIAS 4
E 11 DO CICLO ESTRAL DE FÊMEAS BOVINAS DE
CORTE”**

Discente: Gabriel Artur Marciano do Nascimento

Orientadora: Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes

Co-orientador: Dr. Rafael Rodrigues Corrêa

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP,
Campus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária.**

N244a

Nascimento, Gabriel Artur Marciano do

Avaliação da eficiência luteolítica de diferentes doses de cloprostenol sódico e dinoprost trometamina administradas nos dias 4 e 11 do ciclo estral de fêmeas bovinas de corte / Gabriel Artur Marciano do Nascimento. -- Jaboticabal, 2019

66 f. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Lindsay Unno Gimenes

Coorientador: Rafael Rodrigues Corrêa

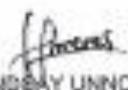
1. Reprodução. 2. Corpo lúteo. 3. Luteólise. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

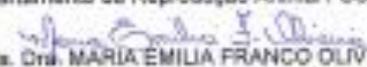
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA LUTEOLÍTICA DE DIFERENTES DOSES DE CLOPROSTENOL SÓDICO E DINOPROST TROMETAMINA ADMINISTRADAS NOS DIAS 4 E 11 DO CICLO ESTRAL DE FÊMEAS BOVINAS DE CORTE

AUTOR: GABRIEL ARTUR MARCIANO DO NASCIMENTO
ORIENTADORA: LINDSAY UNNO GIMENES
COORIENTADOR: RAFAEL RODRIGUES CORRÊA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


pi Prof. Dr. PIETRO SAMPAIO BARUSELLI (Videoconferência)
Departamento de Reprodução Animal / USP/SP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia


Profa. Dra. MARIA EMÍLIA FRANCO OLIVEIRA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 01 de agosto de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GABRIEL ARTUR MARCIANO DO NASCIMENTO – Nascido em Barbacena-MG na data de 13/03/1989. Formou-se em medicina veterinária pela Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde (FACISA) em 12 de janeiro de 2012. Nessa mesma unidade iniciou-se nas atividades acadêmicas com projeto de iniciação científica: Agência Financiadora Instituto Euvaldo Lodi Nacional (IEL Nacional). Trabalha na área de pesquisa clínica veterinária desde 2008. No ano de 2017 ingressou no programa de mestrado em medicina veterinária, área de reprodução animal, pela UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal, finalizando em 01/08/201, com a dissertação intitulada: Avaliação da eficiência luteolítica de diferentes doses de cloprostenol sódico e dinoprost trometamina administradas nos dias 4 e 11 do ciclo estral de fêmeas bovinas de corte.

EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

DEDICO

Dedico este trabalho a Deus, por sempre ter me guiado.

A minha esposa Cíntia pelo companheirismo, paciência e por ajudar nos bons e maus momentos.

A minha mãe Stella e meu irmão Jefferson, que mesmo distantes sempre me apoiaram.

A memória do meu pai Sebastião, que continua me inspirando a buscar sempre mais.

A memória dos meus amigos Rafael Siqueira Lima de Souza e Carolina Zucchermaglio.

E a toda a minha família e a da minha esposa por terem sempre me apoiado.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes, por toda ajuda, ensinamento e paciência.

Ao meu coorientador Dr. Rafael Rodrigues Corrêa, por todas as contribuições e pelo companheirismo.

A Profa. Dra. Cláudia Cristina Paro de Paz do Instituto de Zootecnia de Sertãozinho por realizar a análise dos dados obtidos.

Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira do laboratório de Endocrinologia, por realizar as análises de progesterona.

A Ana Clara e a todos os integrantes do Departamento de Patologia da Unesp-Jaboticabal que participaram das análises histológicas realizadas no trabalho.

Aos professores integrantes das bancas de qualificação e defesa, por terem contribuído com o trabalho.

A Ourofino por ceder os animais e os fármacos para realização do trabalho.

Aos Amigos do Centro de Pesquisa Veterinária por estarem sempre dispostos a ajudar.

SUMÁRIO

	Página
Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.....	iii
RESUMO.....	iv
Palavras-chave.....	iv
ABSTRACT	v
Keywords.....	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Dinâmica Folicular, Ovulação e Formação do Corpo Lúteo	2
2.2. Luteólise	4
2.3. Apoptose	5
2.4. Ultrassonografia Doppler	7
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA LUTEOLÍTICA DE DIFERENTES DOSES DE CLOPROSTENOL SÓDICO E DINOPROST TROMETAMINA ADMINISTRADAS NOS DIAS 4 E 11 DO CICLO ESTRAL DE FÊMEAS BOVINAS DE CORTE.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. EXPERIMENTO 1	15
2.1.1. Animais	15
2.1.2. Delineamento Experimental	15
2.1.3. Avaliações Ultrassonográficas	16
2.1.4. Colheita das amostras de sangue e determinação das concentrações de progesterona	18
2.1.5. Análises computadorizadas do CL.....	18
2.2. EXPERIMENTO 2	18
2.2.1. Animais	18
2.2.2. Tratamentos	19
2.2.3. Avaliações Ultrassonográficas	19

2.2.4. Colheita das amostras de sangue e determinação das concentrações de progesterona	21
2.2.5. Colheita dos ovários, preparação dos corpos lúteos e confecção das lâminas de imunohistoquímica	21
2.2.6. Avaliação da atividade da caspase por imunohistoquímica (imunomarcação) 22	22
2.2.7. Avaliação morfológica das células luteais.....	22
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
3. RESULTADOS	23
3.1. EXPERIMENTO 1	23
3.1.1. Diâmetro e área do CL	25
3.1.2. Vascularização do CL	27
3.1.2.1. Avaliação subjetiva dos escores de vascularização periférica e central ...	27
3.1.2.2. Análise computadorizada da área vascularizada do CL	30
3.1.3. Concentrações séricas de progesterona.....	32
3.2. EXPERIMENTO 2	35
3.2.1. Atividade da caspase-3 por imunohistoquímica (imunomarcação)	37
3.2.2. Análise morfológica das células luteais	38
3.2.3. Concentrações séricas de progesterona.....	41
4. DISCUSSÃO.....	41
5. CONCLUSÕES.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
7. APÊNDICE	50

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da eficiência luteolítica de diferentes doses de cloprostenol sódico e dinoprost trometamina administradas nos dias 4 e 11 do ciclo estral de vacas de corte**", protocolo nº 006001/18, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Lindsay Unno Gimenes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 10 de maio de 2018.

Vigência do Projeto	25/05/2018 a 20/12/2018
Espécie / Linhagem	Bovina / Nelore ou Mestiça
Nº de animais	124
Peso / Idade	Peso médio 400 Kg / Acima de 18 meses
Sexo	Fêmea
Origem	Guataparã – SP

Jaboticabal, 10 de maio de 2018.



Prof^a Dr^a Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA LUTEOLÍTICA DE DIFERENTES DOSES DE CLOPROSTENOL SÓDICO E DINOPROST TROMETAMINA ADMINISTRADAS NOS DIAS 4 E 11 DO CICLO ESTRAL DE FÊMEAS BOVINAS DE CORTE

RESUMO – No presente estudo os objetivos foram avaliar a resposta luteolítica de meia dose (50%) ou dose inteira (100%) de cloprostenol sódico (CS) e dinoprost trometamina (DT) administrados em fêmeas bovinas de corte não lactantes cíclicas, nas fases de metaestro e diestro do ciclo estral (4 ou 11 dias após a ovulação (D0), respectivamente), quanto a: dinâmica luteínica, vascularização central e periférica, quantificação de pixels na área vascularizada do CL e dosagem de progesterona sérica (Exp.1) e morfometria das células luteínicas, imunomarcagem de caspase-3 e dosagem de progesterona (P4; Exp.2). No Exp. 1, 54 fêmeas tiveram a ovulação sincronizada e receberam os seguintes tratamentos: CS 0 µg (CS0%; n=3/ grupo), CS 250 µg (CS50%; n=5/D4 e n=7/D11), CS 500 µg (CS100%; n=5/ grupo), DT 0 mg (DT0%; n=2/ grupo), DT 12,5 mg (DT50%; n=5/D4 e n=6/D11) ou DT 25 mg (DT100%; n=5/D4 e n=6/D11). No Exp. 2, 25 fêmeas foram sincronizadas, alocadas nos tratamentos no D4 e D11: CS50%; CS100%; DT50%; DT100% (n=3/ grupo, exceto DT100% no D11, n=2) e abatidas dois dias após. Os dados foram analisados por ANOVA em arranjo fatorial (2x2x3, no Exp. 1 e 2x2x2, no Exp. 2) com medidas repetidas no tempo (exceto para morfometria e imunomarcagem) e teste de Tukey, com significância a 5%. No Exp. 1, animais avaliados no D4 apresentaram redução numérica da concentração de P4, das dimensões e vascularização luteais. Já animais avaliados a partir de D11 apresentaram redução para todos os parâmetros avaliados ao longo dos momentos experimentais. A utilização de 50% ou 100% da dose dos luteolíticos causaram redução semelhante nas variáveis avaliadas comparados ao controle negativo. No Exp. 2, o número de células luteais pequenas imunomarcadas para caspase-3 foi semelhante entre os tratamentos, sendo em maior número quando administradas no D11. Animais tratados com 50% da dose apresentaram maior número de células luteais grandes comparados aos tratados com 100% da dose. Para a área das células luteais grandes, os tratamentos administrados no D11 influenciaram de maneira semelhante esta variável, enquanto que no D4 a menor área foi detectada para animais tratados com CS100%. Animais tratados com CS e com 100% da dose dos ativos no D4 apresentaram maior área de células luteais pequenas. Animais tratados com DT50% apresentaram menor área de células luteais pequenas. A administração dos tratamentos em D4 e D11 causou redução na concentração de P4. A principal diferença observada após a administração de CS e DT ocorreu no efeito exercido pelos ativos sobre as células luteais grandes e pequenas. As dimensões luteais, a vascularização do CL e as concentrações séricas de P4 foram semelhantes após a administração dos ativos avaliados. A administração dos luteolíticos em D4 foi sugestiva de luteólise parcial. Já a administração no D11 foi eficiente em induzir luteólise completa. No presente trabalho demonstrou-se também a capacidade luteolítica do uso de 50% da dose de CS e DT, quando administradas no D11.

Palavras-chave: caspase, corpo lúteo, luteólise, PGF2 α , progesterona, vascularização

EVALUATION OF THE LUTEOLITIC EFFICIENCY OF DIFFERENT DOSES OF SODIUM CLOPROSTENOL AND DINOPROST TROMETHAMINE ADMINISTERED ON DAYS 4 AND 11 OF THE ESTROS CYCLE OF BEEF COWS

ABSTRACT – In the present study the objectives were to evaluate the luteolytic response of half-dose (50%) or full dose (100%) of sodium cloprostenol (SC) and dinoprost tromethamine (DT) administered in beef cattle cyclic non-lactating, at the metaestrous and diestrous stages of the estrous cycle (4 or 11 days after ovulation (D0), respectively), regarding: luteal dynamics, central and peripheral vascularization, quantification of pixels in vascularized area of CL and serum progesterone levels (Exp.1) and luteal cell morphometry, caspase-3 immunolocalization and progesterone levels (P4; Exp.2). In Exp. 1, 54 females were synchronized ovulation and received the following treatments: SC0 μ g (SC0%; n=3/group), SC250 μ g (SC50%; n=5/D4 and n=7/D11), SC500 μ g (SC100%; n=5/group), DT0mg (DT0%; n=2/group), DT12.5mg (DT50%; n=5/D4 and n=6/D11) or DT25mg (DT100%; n=5/D4 and n=6/D11). In Exp. 2, 25 females were synchronized, assigned to treatments on D4 and D11: SC50%; SC100%; DT50%; DT100% (n=3/group, except DT100% on D11, n=2) and slaughtered two days later. Data were analyzed by ANOVA in factorial arrangement (2x2x3, in Exp. 1 and 2x2x2, in Exp. 2) with repeated measures in time (except for morphometry and immunolocalization) and Tukey test, at 5% level of significance. In Exp. 1, animals evaluated in D4 showed numerical reduction of P4 levels, luteal dimensions and vascularization. Animals evaluated at D11 showed reduction for all parameters evaluated over the experimental moments. The use of 50% or 100% of the luteolytic dose caused a similar reduction in the evaluated variables compared to the negative control. In Exp. 2, the number of caspase-3 immunostained small luteal cells was similar between treatments, and large when administered on D11. Animals treated with 50% of the dose presented larger number of large luteal cells compared to those treated with 100% of the dose. For the area of large luteal cells, treatments administered on D11 influenced this variable similarly, while at D4 the smallest area was detected for animals treated with SC100%. Animals treated with SC and with 100% of the dose on D4 showed larger area of small luteal cells. Animals treated with DT50% had smaller area of small luteal cells. Administration of treatments on D4 and D11 caused a reduction in P4 levels. The main difference observed after administration of SC and DT occurred in the effect exerted by the actives on the large and small luteal cells. Luteal dimensions, CL vascularization and serum P4 levels were similar after administration of the luteolytics agents. Administration of luteolytics on D4 was suggestive of partial luteolysis. The administration on D11 was efficient in inducing complete luteolysis. The study also demonstrated the luteolytic ability to use 50% of the dose of SC and DT when administered in D11.

Keywords: caspase, corpus luteum, luteolysis, PGF2 α , progesterone, vascularization

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Valores de P para cada variável analisada, conforme fatores principais e interações.....24
- Tabela 2. Valores para escore de vascularização periférica do CL, conforme interação entre o dia do ciclo estral (D4 e D11), a dose de PGF2 α utilizada e o tempo após administração dos tratamentos. Valores na mesma linha seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes. Valores na mesma coluna seguidos por diferentes letras maiúsculas são significantes.28
- Tabela 3. Percentual de área vascularizada do CL, conforme interação entre o dia do ciclo estral (D4 e D11), a dose de PGF2 α utilizada e o tempo após administração dos tratamentos. Valores na mesma linha seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes. Valores na mesma coluna seguidos por diferentes letras maiúsculas são significantes.....30
- Tabela 4. Percentual de área vascularizada do CL, conforme interação entre o tipo de PGF2 α (CS: cloprostenol sódico, DT: Dinoprost Trometamina), a dose utilizada e o tempo após administração dos tratamentos. Valores na mesma linha seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes. Valores na mesma coluna seguidos por diferentes letras maiúsculas são significantes.....31
- Tabela 5. Concentração de progesterona sérica (ng/ml) em animais avaliados a partir do momento D11, conforme tipo (CS: Cloprostenol Sódico, DT: Dinoprost Trometamina) e dose de PGF2 α utilizada (0%, 50% ou 100%).33
- Tabela 6. Valores de P para cada variável analisada, conforme efeitos principais e interações.....36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Delineamento experimental para avaliação do efeito luteolítico de diferentes doses de cloprostenol sódico e dinoprost trometamina administradas nos dias 4 (metaestro) e 11 (diestro) do ciclo estral sincronizado de fêmeas bovinas de corte. 17
- Figura 2. Diagrama esquemático do experimento para avaliação do efeito luteolítico de diferentes doses de cloprostenol sódico e dinoprost trometamina administradas nos dias 4 (metaestro) e 11 (diestro) do ciclo estral sincronizado de fêmeas bovinas de corte.20
- Figura 3. Dinâmica do diâmetro (A) e da área (B) do CL, conforme interação entre a dose de PGF2 α e o tempo após administração dos tratamentos. Valores para a mesma dose (0%, 50% e 100%) seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes. Valores para o mesmo momento (0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h) seguidos por diferentes letras maiúsculas são significantes.25
- Figura 4. Dinâmica do diâmetro (A) e da área (B) do CL, conforme interação entre o dia do ciclo estral e o tempo após administração dos tratamentos. Valores para o mesmo dia (Dia 4 e Dia 11) seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.....26
- Figura 5. Dinâmica da área do CL, conforme interação entre o tipo de PGF2 α e a dose utilizada. Valores seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.27
- Figura 6. Dinâmica do escore de vascularização periférica do CL, conforme interação entre o dia do ciclo estral (D4 e D11), a dose de PGF2 α utilizada e o tempo após administração dos tratamentos.28
- Figura 7. Dinâmica do escore de vascularização central do CL, conforme interação entre a dose de PGF2 α utilizada e o tempo após administração dos tratamentos. Valores para a mesma dose (0%, 50% e 100%) seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes. Valores para o mesmo momento (0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h) seguidos por diferentes letras maiúsculas são significantes.29

Figura 8. Dinâmica do escore de vascularização central do CL, conforme interação entre o dia do ciclo estral e o tempo após administração dos tratamentos. Valores para o mesmo dia (Dia 4 e Dia 11) seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.....29

Figura 9. Dinâmica da área vascularizada do CL, conforme interação entre o dia do ciclo estral (D4 e D11), a dose de PGF2 α utilizada e o tempo após administração dos tratamentos.30

Figura 10. Dinâmica da área vascularizada do CL, conforme interação entre o tipo de PGF2 α (CS: Cloprostenol Sódico, DT: Dinoprost Trometamina), a dose utilizada e o tempo após administração dos tratamentos.....31

Figura 11. Dinâmica da concentração de progesterona sérica, conforme interação entre a dose de PGF2 α utilizada e o tempo após administração dos tratamentos. Valores para a mesma dose (0%, 50% e 100%) seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes. Valores para o mesmo momento (0 h, 8 h, 24 h, e 48 h) seguidos por diferentes letras maiúsculas são significantes.32

Figura 12. Dinâmica da concentração de progesterona sérica observada em animais avaliados a partir do momento D11, conforme dose de PGF2 α utilizada (0%, 50% ou 100%)......33

Figura 13. Dinâmica da concentração de progesterona sérica em animais avaliados a partir do momento D11, conforme tipo (CS: Cloprostenol Sódico, DT: Dinoprost Trometamina) e dose de PGF2 α utilizada (0%, 50% ou 100%).33

Figura 14. Dinâmica da concentração de progesterona sérica, conforme interação entre dia do ciclo estral e o tempo após administração dos tratamentos. Valores para o mesmo dia (Dia 4 e Dia 11) seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.....34

Figura 15. Dinâmica da concentração de progesterona sérica observada em animais avaliados a partir do momento D4, conforme dose de PGF2 α utilizada (0%, 50% ou 100%)......35

Figura 16. Número de células luteais pequenas imunomarcadas por campo, conforme interação entre o dia do ciclo estral, o tipo (CS: Cloprostenol Sódico; DT: Dinoprost Trometamina) e a dose de PGF₂α utilizados. Valores seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.37

Figura 17. Número de células luteais grandes imunomarcadas por campo, conforme fator dose de PGF₂α. Valores seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.....38

Figura 18. Área das células luteais grandes, conforme interação entre o dia do ciclo estral, o tipo (CS: Cloprostenol Sódico; DT: Dinoprost Trometamina) e a dose de PGF₂α utilizados. Valores seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.39

Figura 19. Área das células luteais pequenas, conforme interação entre o dia do ciclo estral e o tipo PGF₂α utilizada (CS: Cloprostenol Sódico; DT: Dinoprost Trometamina). Valores seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.39

Figura 20. Área das células luteais pequenas, conforme interação entre o dia do ciclo estral e a dose de PGF₂α utilizada. Valores seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.40

Figura 21. Área das células luteais pequenas, conforme interação entre o tipo de PGF₂α (CS: Cloprostenol Sódico; DT: Dinoprost Trometamina) e a dose utilizada. Valores seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.41

Figura 22. Dinâmica da concentração de progesterona sérica, conforme interação entre dia do ciclo estral e o tempo após administração dos tratamentos. Valores para o mesmo dia (Dia 4 e Dia 11) seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.....41

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o rebanho bovino brasileiro é composto por cerca de 214,69 milhões de cabeças (ABIEC, 2019). Observa-se predominância de animais de origem zebuína (*Bos indicus*) nos rebanhos nacionais. Este grupo genético possui boa capacidade de adaptação às condições climáticas (altas temperaturas e umidade) e à sazonalidade da disponibilidade de alimentos encontrados no Brasil tropical. Contudo, apesar da maior adaptação dos zebuínos às condições tropicais, na grande maioria dos rebanhos brasileiros é possível observar comprometimento nos índices reprodutivos, ligado principalmente ao prolongamento do período de anestro pós-parto (Baruselli et al., 2004, Baruselli et al., 2008), falhas na detecção do estro e a puberdade tardia dos animais (Sá Filho et al., 2008).

Devido às limitações citadas acima, houve grande interesse econômico nos últimos anos no desenvolvimento de tratamentos que tivessem por objetivo a indução e/ou sincronização do estro e da ovulação para que fosse possível a realização da inseminação artificial em tempo fixo (IATF; Sá Filho et al., 2008). A utilização da IATF facilitou o manejo, pois permitiu que grande número de animais pudesse ser inseminado em curto espaço de tempo, reduziu a mão de obra e concentrou as atividades, principalmente na criação de gado de corte, em que a estação de monta é uma ferramenta muito utilizada no manejo do rebanho (Cunha et al., 2013).

O entendimento da fisiologia do ciclo estral de fêmeas bovinas é de suma importância para melhorar a eficiência de fármacos nos protocolos de sincronização de estro. O ciclo estral bovino tem duração média de 21 dias e compreende duas fases distintas, uma caracterizada pela alta concentração de estrógeno (fase estrogênica) e outra pela progesterona (fase luteal). A fase luteal é caracterizada pela presença do corpo lúteo (CL) produtor de progesterona, e compreende o período entre a ovulação e a luteólise, com duração aproximada de 17 dias. Na ausência de um embrião viável a prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) é secretada naturalmente pelo endométrio e causa a regressão funcional e estrutural do corpo lúteo (Rippe, 2009). A luteólise funcional é

caracterizada pelo rápido declínio das concentrações de progesterona, enquanto a luteólise estrutural é identificada pela diminuição de tamanho e peso do CL em consequência da apoptose das células luteínicas (Neuvians et al., 2003).

A PGF2 α e seus análogos são utilizadas na Medicina Veterinária por possuírem ação luteolítica e, por isso, possuem papel fundamental na indução ou em protocolos de sincronização do estro. Dentre os análogos da PGF2 α utilizados na produção animal, podemos citar o cloprostenol, o luprostiol, o tiaprost e o dinoprost. O efeito do tratamento depende da fase do ciclo em que ele é realizado. Quando utilizados em fases responsivas do ciclo, os análogos da PGF2 α induzem rápida luteólise, provocando redução das concentrações de progesterona, aumento do estradiol, um pico de hormônio luteinizante e consequente ovulação (Stotzel et al., 2012).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Dinâmica Folicular, Ovulação e Formação do Corpo Lúteo

Milhares de folículos estão presentes em cada ovário das fêmeas bovinas, mas na grande maioria das vezes ocorre a ovulação de apenas um a cada ciclo estral. As observações ultrassonográficas mostraram que o desenvolvimento folicular durante o ciclo estral das fêmeas bovinas ocorre em padrão de ondas e, a cada onda de crescimento folicular, um folículo dominante segue em desenvolvimento, enquanto suprime o desenvolvimento de outros folículos com tamanho superior a 4 mm (Jainudeen e Hafez, 2004).

O processo de desenvolvimento folicular nas fêmeas bovinas divide-se em três fases: recrutamento, divergência e dominância (Ginther et al., 1996). Em cada onda folicular ocorre o recrutamento de um grupo de pequenos folículos, porém apenas um deles será selecionado para dominância e continuará o crescimento enquanto os demais entram em processo de atresia folicular (Noakes et al., 2001). O folículo dominante que se desenvolver na presença de altos níveis de progesterona também entrará em atresia folicular. A ovulação do folículo dominante apenas ocorrerá quando existir um processo luteolítico efetivo, que garanta baixos níveis de progesterona na

fase final do crescimento (Rippe, 2009). A ovulação marca o final da fase folicular e início da fase luteínica. Após a ovulação forma-se o CL, a partir das células do folículo ovulatório (revisado por Martin e Ferreira, 2009).

Durante o processo de ovulação, fluido folicular e oócito são liberados do folículo, formando uma cavidade para o desenvolvimento do CL. Após a ovulação, várias mudanças estruturais são observadas: ruptura da membrana basal, invasão da cavidade folicular pelas células da teca interna e da granulosa, que sofrem hipertrofia e hiperplasia, proliferação de novos vasos sanguíneos, além de aumento do fluxo sanguíneo ao longo do desenvolvimento luteínico (Damber et al., 1987).

O CL participa de grande parte dos processos reprodutivos. Ele é um órgão endócrino transitório, cuja principal função é a produção de progesterona, esteroide que prepara o endométrio para implantação e manutenção da gestação inicial (Sakamoto et al., 1995).

O CL bovino se desenvolve rapidamente no período entre 2 a 3 dias após a ovulação (revisado por Miyamoto et al., 2009). O CL maduro é formado por uma gama de células heterogêneas. As principais células com função secretora são as luteínicas esteroidogênicas grandes e pequenas (O'shea et al., 1986; 1989). Células luteínicas pequenas são originadas a partir da transformação de células da teca, enquanto que células luteínicas grandes são formadas a partir da transformação de células da granulosa. Porém, durante o desenvolvimento do CL, células luteínicas pequenas podem se transformar em células luteínicas grandes (Hansel e Dowd, 1986).

Além das células esteroidogênicas, o CL é formado por células endoteliais, fibroblastos, células de músculo liso e células do sistema imune (O'shea et al., 1986; 1989). O CL possui uma vasta rede de vascularização composta por vasos sanguíneos e microcapilares. Células endoteliais vasculares chegam a atingir até 50% do número total células luteais. O CL bovino também produz muitos fatores angiogênicos incluindo o fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento fibroblástico e angiopoietina-1 e 2. Além dos fatores angiogênicos, o CL bovino produz substâncias vasoativas como a endotelina-1, angiotensina II, óxido nítrico e PGF2 α . Os fatores angiogênicos e os vasoativos estão intimamente ligados à regulação do fluxo sanguíneo do CL e à produção de progesterona (revisado por Miyamoto et al., 2009).

2.2. Luteólise

Em casos em que não ocorre a concepção, a regressão do CL é essencial para permitir o início de um novo ciclo reprodutivo (Knickerbocker et al., 1988; Niswender et al., 1994). Nesses casos o CL é funcional por período de 17 a 18 dias e, após este período, ele regride dentro de pouco tempo para permitir a próxima ovulação (revisado por Miyamoto et al., 2009). Dois processos estão envolvidos na regressão luteínica: a diminuição da secreção de progesterona seguida pela diminuição do tecido luteínico. As alterações morfológicas associadas a luteólise espontânea ou induzida são semelhantes. Acúmulos de grânulos lipídicos no citoplasma de células luteínicas, degeneração dos capilares e aumento do número de vesículas lisossomais são observadas no processo luteolítico. Com o avançar do processo de regressão luteínica, existe eventual diminuição do número de células luteínicas esteroidogênicas (Knickerbocker et al., 1988; Niswender et al., 1994).

Diversos estudos tem confirmado que a $PGF2\alpha$ produzida no tecido endometrial é o principal agente responsável por desencadear o processo luteolítico. Em 1923, Loeb foi o primeiro a demonstrar a função do útero sobre o controle da regressão do CL, evidenciando que a histerectomia em cobaias causava a persistência do corpo lúteo. Esse efeito também foi observado em bovinos, ovinos, caprinos, suínos e equinos. Em bovinos demonstrou-se que a histerectomia unilateral causava a persistência do corpo lúteo ipsilateral ao corno uterino removido, enquanto que a remoção do corno uterino contra lateral ao ovário que continha o CL não influenciou o processo de regressão luteínica (Knickerbocker et al., 1988). Posteriormente, estudos baseados na histerectomia parcial e anastomose vascular sugeriram que, em diversas espécies, a $PGF2\alpha$ exerce efeito local entre cada corno uterino e o seu ovário ipsilateral (revisado por Silva et al., 2010).

O estradiol produzido pelo folículo pré-ovulatório desencadeia a liberação de ocitocina pela hipófise, que por sua vez estimula a liberação de pequenas quantidades de $PGF2\alpha$ pelo útero. A $PGF2\alpha$, por meio de mecanismo de feedback positivo, estimula a liberação adicional de ocitocina pelo tecido luteínico e $PGF2\alpha$ tanto pelo tecido luteínico quanto pelo útero (Niswender et al., 2000). A $PGF2\alpha$ produzida pelo

endométrio, que é liberada em forma de pulsos (revisado por Bertan et al., 2006, McCracken et al., 1999), atinge a circulação venosa uterina e, por meio de mecanismo contracorrente, envolvendo transporte ativo, chega ao sistema arterial ovariano, produzindo vasoconstrição e, conseqüentemente, desencadeando a luteólise (Cunningham, 2004).

Após alcançar a circulação sanguínea do CL, a $PGF2\alpha$ se liga a receptores específicos presentes na membrana de células luteais grandes, desencadeando o aumento das concentrações de proteína quinase C e de Ca^{2+} intracelular (Niswender et al., 2000). O aumento de Ca^{2+} está relacionado com o desencadeamento da apoptose e da morte celular, necessários para a ocorrência de luteólise estrutural. Já o aumento da proteína quinase C tem papel fundamental na diminuição da secreção de progesterona (luteólise funcional; revisado por Trevisol et al., 2013).

A $PGF2\alpha$ causa degeneração das células endoteliais luteínicas, resultando em redução da densidade capilar, reduzindo assim o fluxo sanguíneo do parênquima luteal (Niswender et al., 2000). A vasoconstrição leva à diminuição do fluxo sanguíneo ovariano e a síntese de progesterona declina progressivamente até alcançar valores menores que 1 ng/mL (Niswender et al., 2000, revisado por Trevisol et al., 2013).

O processo de degeneração dos capilares sanguíneos, observado logo no início do processo luteolítico, é marcado pela protusão das células endoteliais em direção ao lúmen, contorno irregular da lâmina basal e sobreposição de células endoteliais, fragmentação das células endoteliais, condensação nuclear, aumento de inclusões apoptóticas, vacuolização do citoplasma e completa desintegração dos capilares (Knickerbocker et al., 1988).

2.3. Apoptose

Apoptose é o processo de morte celular que causa alterações morfológicas como diminuição do tamanho celular, condensação nuclear, fragmentação do DNA e alterações da membrana. Quando células sofrem apoptose, geralmente são fagocitadas por células vizinhas ou por fagócitos especializados, como macrófagos, células dendríticas ou neutrófilos (Carou et al., 2015).

Betts et al. (1984) avaliaram as alterações morfométricas do CL de fêmeas bovinas de corte induzidas pela administração de cloprostenol sódico (500 µg). Os autores observaram diminuição do número de células em mitose, aumento do número de células picnóticas e em cariorrexe após a administração do tratamento. Essas alterações estão intimamente relacionadas com o processo de apoptose das células luteínicas.

A apoptose de células luteínicas e vasculares é o principal evento que causa a regressão do CL. O processo de apoptose possui duas principais vias de sinalização: mediada por receptores ou via extrínseca e a mitocondrial ou via intrínseca. Na via extrínseca, o sinal ocorre após a ativação dos “receptores de morte” Fas e TNF, que promovem a ativação de caspase-8. A via apoptótica intrínseca é ativada por estímulo de estresse que altera a permeabilidade mitocondrial, levando a liberação de citocromo C, que se liga ao fator apoptótico-1 ativador de proteases e procaspase-9, formando um complexo conhecido como apoptossoma, levando à ativação de caspase-9. As vias extrínseca e intrínseca levam a ativação dos efetores finais da cascata de caspases, caspases-3, 6 e 7. Essas caspases clivam uma variedade de polipeptídeos intracelulares, incluindo importantes elementos estruturais do citoplasma, como actina, componentes do sistema de reparo do DNA (poli (ADP-ribose) polimerase), uma série de proteínas kinases e o inibidor da caspase-ativada DNase (ICAD; Stocco et al., 2007).

Em um estudo, que avaliou o papel da administração de PGF2α para induzir luteólise em ratas pseudogestantes e os mecanismos de ativação das vias intrínsecas e extrínsecas de apoptose, foi observado que houve aumento da atividade das caspases-9, 8 e 3. Quando um inibidor da caspase-8 foi usado antes da administração de PGF2α, a ativação de caspase-3 induzida pelo uso de PGF2α foi completamente bloqueada, entretanto, houve inibição parcial quando um inibidor da caspase-9 foi utilizado. Isso sugere a grande importância da via de apoptose extrínseca no processo de luteólise induzido pela PGF2α (Yadav et al., 2005).

Carambula et al. (2002) avaliaram a participação da enzima caspase-3 no processo de apoptose de células cultivadas *in vitro* do CL de camundongos. Os efeitos foram avaliados em CLs oriundos de camundongos convencionais e caspase-3 deficientes. Os pesquisadores demonstraram que células luteais oriundas de animais

convencionais foram positivas para atividade de caspase-3 e apresentaram todas as características ligadas ao processo de apoptose, enquanto que para as células luteínicas provenientes de animais caspase-3 deficientes a expressão dessas características foi observada em menor frequência ou não foram observadas.

A participação da cascata de caspases na luteólise em bovinos foi demonstrada tanto na regressão natural do CL (Park et al., 2013), quanto no processo induzido pela ação de agentes luteolíticos (Korzekwa et al., 2014). Park et al. (2013), avaliando o perfil de expressão proteica nas diferentes fases do CL, detectaram a presença de caspase-3 clivada somente na fase de regressão luteal. Korzekwa et al. (2014), avaliando o efeito da $PGF_{2\alpha}$ e seus análogos na função secretora de células luteais bovinas, demonstraram aumento da atividade de caspase-3 em cultura de células luteais bovinas expostas aos tratamentos luteolíticos propostos.

Nishimura et al. (2008) avaliando a resposta de células luteais bovinas incubadas em alta e baixa tensão de oxigênio (20% e 3% de oxigênio, respectivamente), demonstraram que sob a baixa tensão de oxigênio, células luteais expressaram maiores quantidades de RNAm e exibiram maior atividade da enzima caspase-3 quando comparadas às mantidas sob alta tensão de oxigênio. Esses resultados demonstram a participação da enzima caspase-3 no processo de apoptose do CL.

2.4. Ultrassonografia Doppler

O diagnóstico ultrassonográfico representou um grande avanço tecnológico na avaliação reprodutiva de grandes animais. As descobertas relacionadas à dinâmica ovariana, função uterina e viabilidade fetal estão fortemente atreladas ao uso da ultrassonografia, que vem sendo amplamente utilizada na pesquisa científica e na rotina das atividades pecuárias. Dentre as opções de uso disponíveis, destaca-se a ultrassonografia convencional no modo B (escala de cinza), que é a forma mais usada, e que proporciona imagem bidimensional das estruturas avaliadas (Pugliesi et al., 2017).

Nos últimos anos a ultrassonografia Doppler ganhou espaço em pesquisas para avaliação do sistema reprodutivo da fêmea bovina. Essa técnica possibilita a avaliação funcional de órgãos e tecidos por meio da detecção de áreas com perfusão sanguínea. Destaca-se, entre as possibilidades de uso da ultrassonografia no modo Doppler, a avaliação da funcionalidade do CL (Pugliesi et al., 2017).

Na ultrassonografia Doppler dos vasos sanguíneos, o objeto estático é o transdutor e as estruturas refletoras em movimento, que geram os ecos retornados ao transdutor, são hemácias. Convencionalmente, no modo Color-Flow Doppler os aparelhos são programados para codificar o movimento que se aproxima e se afasta do transdutor nas cores vermelha e azul, respectivamente. No entanto, as cores vermelha e azul não indicam fluxo arterial ou venoso. Em muitos aparelhos, as cores podem ser invertidas ou alteradas de acordo com a preferência do operador. O modo Power-Flow Doppler é uma inovação da exibição das imagens geradas pelo modo Color-Flow. O modo Power Doppler aumenta a sensibilidade de 3 a 5 vezes para exibição do fluxo sanguíneo no interior de tecidos macios quando comparado ao modo Color Doppler convencional. A maior sensibilidade permite a avaliação de vasos com menor diâmetro ou fluxo lento que não aparecem no modo Color Doppler por terem velocidade incompatível (Ginther e Utt, 2004).

Pugliesi et al. (2014), avaliando métodos de diagnóstico precoce da gestação em vacas de corte, observaram que independentemente do tamanho do corpo lúteo, o fluxo sanguíneo luteínico é positivamente associado com a secreção de progesterona e é facilmente estimado por meio da proporção de sinais coloridos observados em imagens do CL obtidas por meio da utilização da ultrassonografia Doppler. A técnica de diagnóstico precoce da gestação utilizando a ultrassonografia Doppler é baseada na detecção da luteólise funcional (diminuição do fluxo sanguíneo luteínico) e estrutural (diminuição da área luteínica). Baseado nesses resultados, os autores afirmam que a estimativa da vascularização e tamanho luteínico por ultrassonografia Doppler é um indicador de gestação altamente eficiente 20 dias após a IA.

Kaya et al. (2017) demonstraram, por meio da utilização de ultrassonografia Doppler e quantificação das concentrações de progesterona, a correlação positiva entre o fluxo sanguíneo luteínico e a secreção de progesterona em vacas leiteiras. No

mesmo estudo, os autores não observaram correlação significativa entre o fluxo sanguíneo luteínico e o tamanho do corpo lúteo ou entre o tamanho do corpo lúteo e a secreção de progesterona.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC (2019) Beef report 2019. São Paulo: ABIEC, 47p.

Baruselli PS, Jacomini JO, Sales JNS, Crepaldi GA (2008) Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE, e SOV em tempo fixo. In: 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina. **Anais do 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina:146-167.

Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA (2004) The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science** 82-83:479-486.

Bertan CM, Binelli M, Madureira EH, Traldi AS (2006) Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise – revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 43:524-540.

Betts JG, Forrest DW, Humphrey WD, Randel RD, Harrison LW, Lovering SL (1984) Cloprostenol induced luteal regression in the beef cow. **Theriogenology** 23: 523-534.

Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Dias Gonçalves PB, Tilly JL, Rueda BR (2002) Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. **Endocrinology** 143:1495-1501.

Carou MC, Cruzans PR, Maruri A, Stockert JC, Lombardo DM (2015) Apoptosis in ovarian granulosa cells of cattle: Morphological features and clearance by homologous phagocytosis. **Acta Histochemica** 117:92-103.

Cunha RR, Fernandes CAC, Garcia JAD, Gioso, MM (2013) Inseminação artificial em tempo fixo em primíparas nelore lactantes acíclicas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 65:1041-1048.

Cunningham JG (2004) Tratado de fisiologia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 596 p.

Damber JE, Cajander S, Gafvels M, Selstam G (1987) Blood flow changes and vascular appearance in preovulatory follicles and corpora lutea in immature pregnant mare's serum gonadotropin-treated rats. **Biology of Reproduction** 37:651-658.

Ginther OJ, Utt MD (2004) Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science** 24:516-526.

Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K (1996) Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproductions** 55:1187-1194.

Hansel W, Dowd JP (1986) New concepts of the control of corpus luteum function. **Journal of Reproduction and Fertility** 78:755-768.

Jainudeen MR, Hafez ESE (2004) Bovinos e Bubalinos. In.: Hafez ESE, Hafez B **Reprodução Animal** São Paulo: Manole, p.160.

Kaya S, Kaçar C, Polat B, Çolak A, Kaya D, Gurcan IS, Bollwein H, Aslan S (2017) Association of luteal blood flow with follicular size, serum estrogen and progesterone concentrations, and the inducibility of luteolysis by PGF_{2α} in dairy cows. **Theriogenology** 87:167–172.

Knickerbocker JJ, Wiltbank MC, Niswender GD (1988) Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. **Domestic Animal Endocrinology** 5:91-107.

Korzekwa AJ, Lukasik K, Pilawski W, Piotrowska-Tomala KK, Jaroszewski JJ, Yoshioka S, Okuda K, Skarzynski DJ (2014) Influence of prostaglandin F_{2α} analogues on the secretory function of bovine luteal cells and ovarian arterial contractility in vitro. **The Veterinary Journal** 199:131–137.

Martin I, Ferreira JCP (2009) Fisiologia da ovulação e da formação do corpo lúteo bovino. **Veterinária e Zootecnia** 19:270-279.

McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC (1999) Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews** 79:263-323.

Miyamoto A, Shirasuna K, Sasahara K (2009) Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. **Domestic Animal Endocrinology** 37:159-169.

Neuvians TP, Pfaffl MW, Berisha B, Schams D (2003) The mRNA expression of the members of the IGF-system in bovine corpus luteum during induced luteolysis. **Domestic Animal Endocrinology** 25:359-372.

Nishimura R, Komiyama J, Tasaki Y, Acosta TJ, Okuda K (2008) Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction** 78:529-536.

Niswender GD, Juengel LJ, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW (2000) Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews** 80:1-29.

Niswender GD, Juengel JL, McGuire WJ, Belfiore CJ, Wiltbank MC (1994) Luteal function: The estrous cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction** 50:239-247.

Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW (2001) Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. London: Elsevier, 864p.

O'shea JD, Rodgers RJ, D'occhio MJ (1989) Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility** 85:483-487.

O'shea JD, Rodgers RJ, Wright PJ (1986) Cellular composition of the sheep corpus luteum in the mid- and late luteal phases of the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility** 76:685-691.

Park HJ, Park SJ, Koo DB, Kong IK, Kim MK, Kim JM, Choi MS, Park YH, Kim SU, Chang KT, Park CK, Chae JI, Lee DS (2013) Unfolding protein response signaling is involved in development, maintenance, and regression of the corpus luteum during the bovine estrous cycle. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 441:344-350.

Pugliesi G, Miagawa BT, Paiva YN, França MR, Silva LA, Binelli M (2014) Conceptus-induced changes in the gene expression of blood immune cells and the ultrasound – accessed luteal function in beef cattle: how early can we detect pregnancy?. **Biology of Reproduction** 91:1-12.

Pugliesi G, Rezende RG, Silva JCB, Lopes E, Nishimura TK, Baruseli PS, Madureira EH, Binelli M (2017) Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 41:140-150.

Rippe CA (2009) El ciclo estral. **Dairy Cattle Reproduction Conference** Minneapolis:111-116.

Sá Filho MF, Gimenes LU, Sales JNS, Crepaldi GA, Medalha AG, Baruselli PS (2008) IATF em Novilha. In: 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina. **Anais do 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina:54-67.

Sakamoto K, Miwa K, Ezashi T, Okuda-Ashitaka E, Okuda K, Houtani T, Sugimoto T, Ito S, Hayaishi O (1995) Expression of mRNA encoding the prostaglandin F_{2α} receptor in bovine corpora lutea throughout the oestrous cycle and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility** 103:99-105.

Silva ASL, Teixeira PPM, Vicente WRR (2010) Mecanismos fisiológicos e bioquímicos da luteólise: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** 15:1-24.

Stocco C, Telleria C, Gibori G (2007) The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews** 28:117-149.

Stotzel C, Plontzke J, Heuwieser W, Roblitz S (2012) Advances in modeling of the bovine estrous cycle: Synchronization with PGF_{2α}. **Theriogenology** 78:1415-1428.

Trevisol E, Ferreira JCP, Ackermann CL, Destro FC, Amaral JB (2013) Luteólise em bovinos: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 37:29-36.

Yadav VK, Lakshmi G, Medhamurthy R (2005) Prostaglandin F_{2α}-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry** 280:10357-10367.

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA LUTEOLÍTICA DE DIFERENTES DOSES DE CLOPROSTENOL SÓDICO E DINOPROST TROMETAMINA ADMINISTRADAS NOS DIAS 4 E 11 DO CICLO ESTRAL DE FÊMEAS BOVINAS DE CORTE

Gabriel Artur Marciano do Nascimento^{ab,*}, Ana Clara Degan Mattos^a, Vanessa Garcia Rizzi Mussi^b, Rafael Rodrigues Corrêa^c, Cláudia Cristina Paro de Paz^d, Rosemeri de Oliveira Vasconcelos^e, Paulo Henrique Leal Bertolo^e, Guilherme de Paula Nogueira^f, Lindsay Unno Gimenes^a

^aDepartamento de Reprodução Animal, FCAV, UNESP, Jaboticabal, Brasil

^bOurofino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil

^cMédico Veterinário Autônomo, Jaboticabal, Brasil

^dInstituto de Zootecnia, Centro APTA de Bovinos de Corte, Sertãozinho, Brasil

^eDepartamento de Patologia Veterinária, FCAV, UNESP, Jaboticabal, Brasil

^fDepartamento de Produção e Saúde Animal, FMVA, UNESP, Araçatuba, Brasil

*Autor para Correspondência

e-mail: nascimento.gam@yahoo.com; gabriel.nascimento2@ourofino.com

RESUMO

No presente estudo os objetivos foram avaliar a resposta luteolítica de meia dose (50%) ou dose inteira (100%) de cloprostenol sódico (CS) e dinoprost trometamina (DT) administrados em fêmeas bovinas de corte não lactantes cíclicas, nas fases de metaestro e diestro do ciclo estral (4 ou 11 dias após a ovulação (D0), respectivamente), quanto a: dinâmica luteínica, vascularização central e periférica, quantificação de pixels na área vascularizada do CL e dosagem de progesterona sérica (Exp.1) e morfometria das células luteínicas, imunomarcagem de caspase-3 e dosagem de progesterona (P4; Exp.2). No Exp. 1, 54 fêmeas tiveram a ovulação sincronizada e receberam os seguintes tratamentos: CS 0 µg (CS0%; n=3/ grupo), CS 250 µg (CS50%; n=5/D4 e n=7/D11), CS 500 µg (CS100%; n=5/ grupo), DT 0 mg (DT0%; n=2/ grupo), DT 12,5 mg (DT50%; n=5/D4 e n=6/D11) ou DT 25 mg (DT100%; n=5/D4 e n=6/D11). No Exp. 2, 25 fêmeas foram sincronizadas, alocadas nos tratamentos no D4 e D11: CS50%; CS100%; DT50%; DT100% (n=3/ grupo, exceto DT100% no D11, n=2) e abatidas dois dias após. Os dados foram analisados por ANOVA em arranjo fatorial (2x2x3, no Exp. 1 e 2x2x2, no Exp. 2) com medidas repetidas no tempo (exceto para morfometria e imunomarcagem) e teste de Tukey, com significância a 5%. No Exp. 1, animais avaliados no D4 apresentaram redução numérica da concentração de P4, das dimensões e vascularização luteais. Já animais avaliados a partir de D11 apresentaram redução para todos os parâmetros avaliados ao longo dos momentos experimentais. A utilização de 50% ou 100% da dose dos luteolíticos causaram redução semelhante nas variáveis avaliadas comparados ao

controle negativo. No Exp. 2, o número de células luteais pequenas imunomarcadas para caspase-3 foi semelhante entre os tratamentos, sendo em maior número quando administradas no D11. Animais tratados com 50% da dose apresentaram maior número de células luteais grandes comparados aos tratados com 100% da dose. Para a área das células luteais grandes, os tratamentos administrados no D11 influenciaram de maneira semelhante esta variável, enquanto que no D4 a menor área foi detectada para animais tratados com CS100%. Animais tratados com CS e com 100% da dose dos ativos no D4 apresentaram maior área de células luteais pequenas. Animais tratados com DT50% apresentaram menor área de células luteais pequenas. A administração dos tratamentos em D4 e D11 causou redução na concentração de P4. A principal diferença observada após a administração de CS e DT ocorreu no efeito exercido pelos ativos sobre as células luteais grandes e pequenas. As dimensões luteais, a vascularização do CL e as concentrações séricas de P4 foram semelhantes após a administração dos ativos avaliados. A administração dos luteolíticos em D4 foi sugestiva de luteólise parcial. Já a administração no D11 foi eficiente em induzir luteólise completa. No presente trabalho demonstrou-se também a capacidade luteolítica do uso de 50% da dose de CS e DT, quando administradas no D11.

Palavras-chaves: caspase, corpo lúteo, luteólise, PGF2 α , progesterona, vascularização.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os fármacos empregados em protocolos de IATF, pode-se destacar o uso da Prostaglandina F2 α (PGF2 α) e seus análogos [1], cuja função é causar a regressão do corpo lúteo (CL) [2], e conseqüente redução das concentrações plasmáticas de progesterona (P4) [3].

Dentre os análogos da PGF2 α , pode-se destacar o cloprostenol sódico e o dinoprost trometamina. Diversos autores observaram efeitos semelhantes destes princípios ativos na indução de estro [4], taxa de concepção [5] e serviços por concepção [6]. No entanto, há trabalhos demonstrando diferença no efeito dos ativos, como maior eficiência do dinoprost em induzir regressão luteal [7] e maior taxa de prenhez após uso do cloprostenol na sincronização do estro [8].

O momento da administração da PGF2 α é fundamental para regressão do CL. A administração deste tratamento no diestro é capaz de induzir luteólise completa [9-11]. No entanto, se o tratamento for realizado no metaestro (até 5 dias após a ovulação), se observa luteólise parcial, caracterizada por reduções transitórias nas dimensões luteais [11, 12] e na concentração sérica de progesterona [11-14].

Outro importante fator relacionado com a eficiência do tratamento luteolítico é a dose de PGF2 α administrada. Demonstrou-se que doses reduzidas de PGF2 α (50% da dose recomendada para bovinos) em fases responsivas do CL podem ser eficientes em induzir luteólise completa [13]. No entanto, doses inferiores a 25% da

recomendada, não são eficazes em provocar o mesmo efeito, promovendo luteólise parcial [12-14].

Os objetivos no presente estudo foram avaliar a resposta de 50% ou 100% da dose de cloprostenol sódico e dinoprost trometamina administradas em fêmeas bovinas de corte na fase de metaestro ou diestro do ciclo estral (4 ou 11 dias após a ovulação, respectivamente) sobre a dinâmica luteal, as características de vascularização e quantificação de pixels no CL, as concentrações de progesterona, bem como a morfometria e imunomarcção de caspase-3 no CL.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – UNESP Jaboticabal (protocolo nº 006001/18).

2.1. EXPERIMENTO 1

2.1.1. Animais

Foram utilizadas 54 fêmeas bovinas, sendo 34 Nelore (nulíparas = 17; múltíparas = 17) e 20 mestiças (nulíparas = 13; múltíparas = 7), com idade média de $35,0 \pm 2,1$ meses e peso médio de $392,3 \pm 8,2$ Kg. Foram selecionadas apenas fêmeas cíclicas (confirmadas por duas avaliações ultrassonográficas com intervalo de 10 dias, previamente ao início do experimento), não lactantes, com escore de condição corporal (ECC) $\geq 2,75$ (em escala de 1 a 5) [15], provenientes da fazenda João Martins, Guatapar – SP (21°29'48"S-48°02'16"W).

Os animais foram mantidos em piquetes com pastagem de *Brachiara brizantha* com livre acesso à água e à suplementação mineral. O experimento foi conduzido entre os meses de junho e outubro de 2018.

2.1.2. Delineamento Experimental

No presente estudo o delineamento foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de tratamentos: 2 (momentos do ciclo estral: D4 e D11) x 2 (análogos de PGF2: dinoprost trometamina e cloprostenol sódico) x 3 (doses de PGF2: 0, 50% e 100% da dose recomendada em bula).

O estudo foi realizado em duas repetições, com intervalo de 77 dias. Previamente ao início dos tratamentos com os agentes luteolíticos, foi realizada a sincronização da ovulação com protocolo  base de estrógeno e progesterona (sem o uso de eCG), para obtenção de dois lotes simultâneos de animais, referentes ao 4 e 11 dia do ciclo estral (Figura 1).

Para obter homogeneidade no momento da ovulação, foi realizado acompanhamento ultrassonográfico a cada 12 h a partir de 60 h da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona e somente os animais ovulados entre 72 e 84 h foram alocados nos grupos experimentais. O dia da ovulação foi considerado como

D0. Quatro (D4) ou onze (D11) dias após a ovulação os animais foram randomizados de acordo com o ECC (média $3,11 \pm 0,04$), raça e diâmetro do CL (média $1,62 \pm 0,04$ cm), para receber os seguintes tratamentos (Figura 1): no D4 (CS 0%, n=3; CS 50% n=5; CS 100%, n=5; DT 0%, n=2; DT 50%, n=5; DT 100%, n=5) e no D11 (CS 0%, n=3; CS 50% n=7; CS 100%, n=5; DT 0%, n=2; DT 50%, n=6; DT 100%, n=6).

2.1.3. Avaliações Ultrassonográficas

As avaliações ultrassonográficas foram realizadas para detecção do momento da ovulação, conforme descrito no item 2.1.2, utilizando o modo B do aparelho, e para avaliação da dinâmica luteínica imediatamente antes do tratamento com $\text{PGF2}\alpha$ (0 h), 24, 48, 72 e 96 h após o mesmo (Figura 1), utilizando o modo B e a função Color Doppler.

Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo operador, utilizando aparelho de ultrassom portátil (Z5 VET com transdutor linear 5MHz, Mindray Medical International, China). O diâmetro do CL foi determinado usando a função distância do modo B, utilizando a fórmula: diâmetro = (comprimento máximo + altura máxima)/2. A área do CL foi calculada utilizando a função traço do modo B.

Para avaliações utilizando a função Doppler, o transdutor do aparelho foi configurado com frequência de 5,0 MHz, configurações constantes de ganho de cor (70), filtro de parede (309) e velocidade de detecção do fluxo sanguíneo (5 cm/seg). Para avaliação da vascularização do CL foram consideradas duas variáveis: vascularização periférica e vascularização central. Os escores de vascularização foram estimados no momento das avaliações, seguindo a seguinte classificação, adaptada dos critérios descritos por Pugliese et al. (2017) [16]: vascularização periférica - escore 0: ausência de sinais coloridos na borda do CL, escore 1: preenchimento de até 25% da borda do CL com sinais coloridos; escore 2: preenchimento de 26 a 50% da borda do CL com sinais coloridos; escore 3: preenchimento de 51 a 75% da borda do CL com sinais coloridos; escore 4: preenchimento de 76 a 100% da borda do CL com sinais coloridos; vascularização central - escore 0: ausência de sinais coloridos na região central do CL, escore 1: presença de sinais coloridos em baixa quantidade e de tamanho reduzido na região central do CL; escore 2: presença de poucos sinais coloridos, mas de tamanho moderado na região central do CL; escore 3: presença de quantidade moderada de sinais coloridos médios e grandes na região central do CL; escore 4: presença de grande quantidade de sinais coloridos médios e grandes em toda a região central do CL (Anexo I).

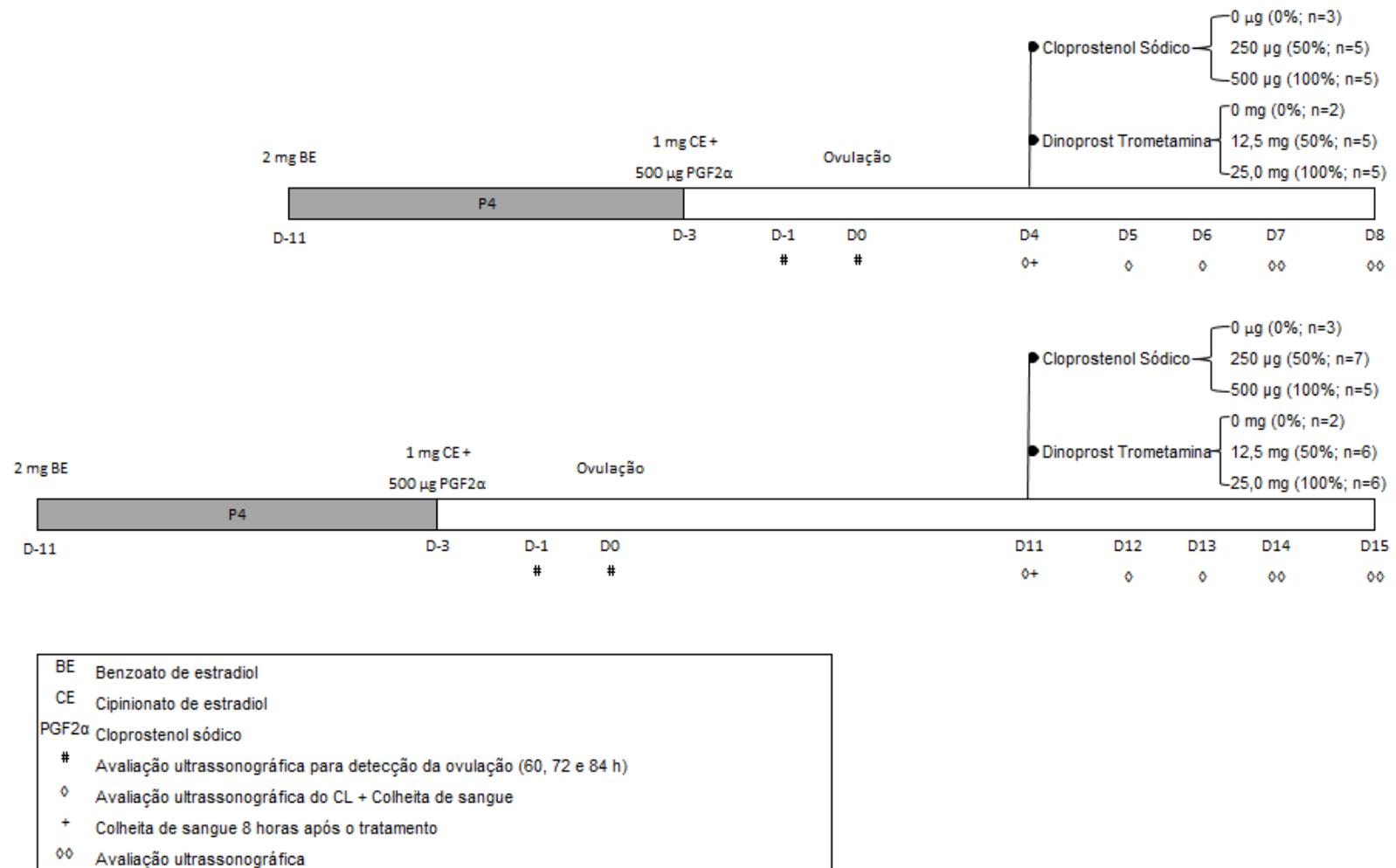


Figura 1. Delineamento experimental para avaliação do efeito luteolítico de diferentes doses de cloprostenol sódico e dinoprost trometamina administradas nos dias 4 (metaestro) e 11 (diestro) do ciclo estral sincronizado de fêmeas bovinas de corte.

2.1.4. Colheita das amostras de sangue e determinação das concentrações de progesterona

Amostras de sangue (10 mL) foram colhidas por punção da veia jugular utilizando tubos à vácuo sem anticoagulante (Vacutainer®, BD, Franklin Lakes, NJ, USA). As amostras foram colhidas antes do tratamento com PGF_{2α} (0 h), 8, 24 e 48 h após o mesmo, centrifugadas a 2086 x g durante 15 minutos, acondicionadas, em duplicata, em microtubos de 2,0 mL (Eppendorf®) e imediatamente armazenadas em freezer a -20°C, até o momento das análises, realizadas no Laboratório de Endocrinologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – Campus de Araçatuba. As concentrações séricas de progesterona foram determinadas usando kit comercial para técnica de radioimunoensaio (ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA, USA). O limite de quantificação e detecção foi de 0,290 e 0,068 ng/mL, respectivamente. O coeficiente de variação intra e inter-ensaio foi de 7,17% e 11,74%, respectivamente.

2.1.5. Análises computadorizadas do CL

Durante as avaliações ultrassonográficas, foram gravados vídeos individuais de cada CL, com 5 segundos de duração, utilizando a função cineloop. Os vídeos registrados capturaram tanto imagens modo B como da função Doppler, compreendendo cortes que exibiam o maior diâmetro e máxima vascularização do CL. Todas as imagens foram analisadas no programa de computador Image J 1.50e (National Institutes of Health), com o qual foi obtido o número total de pixels e número de pixels da área vascularizada do CL. Com a obtenção desses dois valores foi possível calcular o percentual de área vascularizada do CL, pela seguinte fórmula:
% de área vascularizada = (nº de pixels coloridos/nº total de pixels) x 100.

2.2. EXPERIMENTO 2

2.2.1. Animais

Foram utilizadas 23 fêmeas bovinas, sendo 15 Nelore (nulíparas = 5; multíparas = 10) e 8 mestiças (nulíparas = 6; multíparas = 2), com idade média de 54,0 ± 3,0 meses e peso médio de 492,2 ± 17,2 Kg. Foram selecionadas apenas fêmeas cíclicas (confirmadas por duas avaliações ultrassonográficas com intervalo de 10 dias, previamente ao início do experimento), não lactantes, com escore de condição corporal (ECC) ≥2,75 (em escala de 1 a 5) [15], provenientes da fazenda João Martins, Guataparã – SP (21°29'48"S-48°02'16"W).

Os animais foram mantidos em piquetes com pastagem de *Brachiara brizantha* com livre acesso à água e à suplementação mineral. O experimento foi conduzido entre os meses de março e maio de 2018.

2.2.2. Tratamentos

Os critérios de seleção e sincronização da ovulação para a distribuição dos tratamentos foi a mesma descrita no item 2.1.2. do Experimento 1 (Figura 2). O dia da ovulação foi considerado como D0. Quatro (D4) ou onze (D11) dias após a ovulação os animais foram randomizados de acordo com o ECC (média $3,66 \pm 0,02$), raça e diâmetro do CL (média $1,44 \pm 0,07$ cm), e distribuídos nos seguintes tratamentos: no D4 (CS 50%, n=3; CS 100%, n=3; DT 50%, n=3; DT 100%, n=3) e no D11 (CS 50%, n=3; CS 100%, n=3; DT 50%, n=3; DT 100%, n=2). As fêmeas foram abatidas dois dias após a realização dos tratamentos.

2.2.3. Avaliações Ultrassonográficas

As avaliações ultrassonográficas foram realizadas para detecção do momento da ovulação e para randomização dos grupos experimentais imediatamente antes do tratamento com PGF 2α (0 h; Figura 2), conforme descrito no item 2.1.3, utilizando o modo B do aparelho.

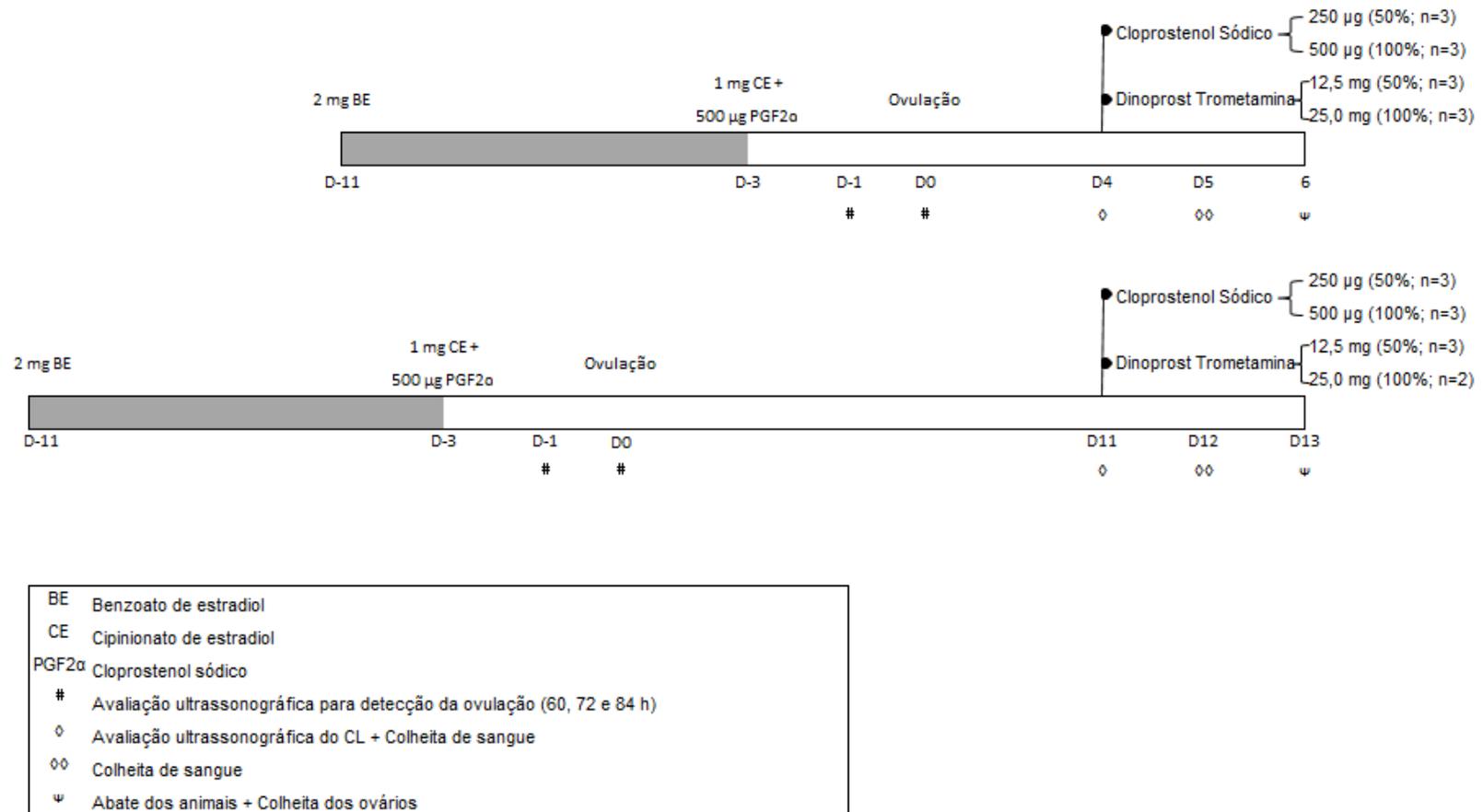


Figura 2. Diagrama esquemático do experimento para avaliação do efeito luteolítico de diferentes doses de cloprostenol sódico e dinoprost trometamina administradas nos dias 4 (metaestro) e 11 (diestro) do ciclo estral sincronizado de fêmeas bovinas de corte.

2.2.4. Colheita das amostras de sangue e determinação das concentrações de progesterona

Os procedimentos de colheita, processamento e estocagem das amostras, bem como a determinação das concentrações de progesterona foram realizadas conforme descrito no item 2.1.4. As amostras foram colhidas antes do tratamento com PGF₂ α (0 h) e 24 h após o mesmo. O limite de quantificação e detecção foi de 0,290 e 0,068 ng/mL, respectivamente. O coeficiente de variação intra e inter-ensaio foi de 7,17% e 11,74%, respectivamente.

2.2.5. Colheita dos ovários, preparação dos corpos lúteos e confecção das lâminas de imunohistoquímica

Após o abate dos animais, o ovário contendo o CL foi removido e acondicionado em frasco coletor universal contendo solução fixadora de formol tamponado a 10% (PAF), com pH 7,0.

O processamento do material foi realizado no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal. O corpo lúteo foi isolado e fracionado, e os fragmentos obtidos foram armazenados em PAF por até 72 h e após, foram lavados com solução de PBS pH 7,5. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em uma sequência de soluções alcoólicas em concentrações graduais e crescentes (70%, 90%, Absoluto e Xilol) e foram “emblocados” em parafina. Os blocos foram submetidos a cortes contínuos com espessura de 5 μ m com auxílio de micrótomo (SLEE, cut 6062) em lâminas silanizadas.

A metodologia para confecção das lâminas para imunohistoquímica foi adaptada de Bertolo et al. (2019) [17]. As lâminas foram reidratadas em soluções alcoólicas com concentrações decrescentes (Xilol, Absoluto, 90% e 70%) e, em seguida, os tecidos foram desparafinizados em estufa a 60°C por uma hora e, posteriormente, hidratados novamente em soluções alcoólicas com concentrações decrescentes, conforme citado acima, até a lavagem em água destilada.

Foi realizada análise imunohistoquímica para apoptose com anticorpo primário anti-caspase 3 (Abcam, Cód. ab4051). A recuperação antigênica foi pelo calor em panela de vapor (Philips Walita), com solução de citrato pH 6,0, durante 40 minutos. Em seguida, as lâminas foram mantidas durante 20 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente a esse período, foi feito bloqueio da peroxidase endógena com solução de metanol (Synth) e peróxido de hidrogênio (30 volumes, Synth) a 8%, por uma hora, em temperatura ambiente e em local protegido da luz. Para realização do bloqueio de proteínas inespecíficas foi utilizado produto comercial (Protein Block, DakoCytomation, Cód. X0909), durante uma hora, em câmara úmida a temperatura ambiente. Adicionalmente foi feito o bloqueio com leite em pó desnatado a 8% (Molico, Nestlé), durante uma hora, em câmara úmida escura a temperatura ambiente. A

incubação do anticorpo primário foi realizada na diluição de 1:200 por 18 h a 4° C. Após isso, os tecidos foram incubados com o complexo de polímeros ligados à peroxidase (kit Advance HRP, DakoCytomation, Cód. K4068). Entre cada um dos passos descritos foram realizados banhos em água destilada e em solução tampão Tris HCl, pH 7,4. Para a visualização da reação foi utilizado o cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina – DakoCytomation, Cód. K3468-1). Os tecidos foram contra-corados com Hematoxilina de Harris e o meio de montagem utilizado foi o Entellan (Merck). Como controle positivo da reação foi utilizado linfonodo de cão, material já existente no Departamento de Patologia Animal da Unesp – Campus de Jaboticabal. O controle negativo foi feito com diluente de anticorpo (DakoCytomation, Cód. S3022), em substituição ao anticorpo primário.

2.2.6. Avaliação da atividade da caspase por imunohistoquímica (imunomarcação)

Foi confeccionada uma lâmina de imunohistoquímica de cada ovário e cinco campos de cada lâmina foram analisados. A quantificação da imunorreação foi realizada por meio da contagem de células luteais grandes e pequenas imunomarcadas para caspase-3 por campo (Anexo II). As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio óptico (IX70, Olympus Corporation, Japão), utilizando aumento de 40x. O número de células imunomarcadas de cada tipo celular foi utilizado para a análise estatística.

2.2.7. Avaliação morfométrica das células luteais

A avaliação morfométrica das células luteais foi realizada a partir das lâminas de imunohistoquímica, utilizando o software Image Pro Plus (Media Cybernetics). Foi analisada a área (μm^2) de 100 células luteais grandes e 100 células luteais pequenas em cada lâmina [18]. A área de cada tipo celular foi utilizada nas análises estatísticas.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Experimento 1 seguiu delineamento inteiramente ao acaso com arranjo fatorial 2 (fases do ciclo estral) x 2 (tipos de $\text{PGF}2\alpha$) x 3 (doses), com medidas repetidas no tempo. Foram incluídos no modelo os efeitos fixos de fase do ciclo estral, tipo e dose de $\text{PGF}2\alpha$, tempo após a administração do tratamento, bem como interações.

O Experimento 2 seguiu delineamento inteiramente ao acaso com arranjo fatorial 2 (fases do ciclo estral) x 2 (tipos de $\text{PGF}2\alpha$) x 2 (doses), com medidas repetidas no tempo apenas para a variável progesterona. Foram considerados no modelo os efeitos principais de fase do ciclo estral, tipos de PGF e dose, bem como as interações entre estes fatores. No caso da concentração de progesterona, foi incluído como efeito principal também o tempo.

Como efeitos aleatórios foram incluídos a raça, a categoria, as repetições, o animal e o ECC para os dois experimentos.

Os dados de ambos experimentos estão representados pela média ajustada por LS Means \pm erro padrão da média. Foi utilizado ANOVA seguido de teste de Tukey (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) com significância a 5%.

3. RESULTADOS

3.1. EXPERIMENTO 1

Os valores de P relacionados às variáveis analisadas, conforme efeitos principais e interações estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de P para cada variável analisada, conforme fatores principais e interações.

Variável	Dia	PGF2 α	Dose	Tempo	Dia* PGF2 α	Dia* Dose	PGF2 α * Dose	Dia* Tempo	PGF2 α * Tempo	Dose* Tempo	Dia* Dose* PGF2 α	Dia* PGF2 α * Tempo	Dia* Dose* Tempo	PGF2 α * Dose* Tempo	Dia* PGF2 α * Dose* Tempo
Diâmetro (cm)	0,585	0,824	<0,001	<0,001	0,827	0,338	0,177	<0,001	0,898	<0,001	0,652	0,621	0,504	0,744	0,947
Área (cm²)	0,556	0,431	<0,001	<0,001	0,998	0,219	0,035	<0,001	0,971	<0,001	0,522	0,750	0,835	0,822	0,966
VP	0,002	0,526	<0,001	<0,001	0,341	0,322	0,903	<0,001	0,522	<0,001	0,770	0,999	0,002	0,999	0,391
VC	0,535	0,291	<0,001	<0,001	0,145	0,382	0,535	<0,001	0,805	<0,001	0,805	0,591	0,330	0,305	0,702
AV (%)	0,046	0,660	<0,001	<0,001	0,319	0,328	0,973	<0,001	0,380	<0,001	0,774	0,652	<0,001	0,021	0,072
Progesterona (ng/ml)	<0,001	0,050	<0,001	<0,001	0,676	0,124	0,137	<0,001	0,820	<0,001	0,685	0,498	0,068	0,646	0,434

Dia: dia do ciclo estral; PGF2 α : tipo de PGF2 α ; Dose: dose de PGF2 α ; Tempo: tempo após administração do tratamento; VP: vascularização periférica; VC: vascularização central; AV: área vascularizada. Valores de p<0,05 são significativos.

3.1.1. Diâmetro e área do CL

Interação dose x tempo

O uso de 50% ou 100% da dose dos agentes luteolíticos causou redução das dimensões do CL de animais tratados já a partir de 24 h ($p < 0,05$). Para animais não tratados (dose 0%), foi observado aumento ($p < 0,05$) das dimensões do CL ao longo dos momentos avaliados. A utilização de 100% ou 50% da dose convencional dos ativos apresentou o mesmo efeito sobre as dimensões do CL avaliadas (Figura 3).

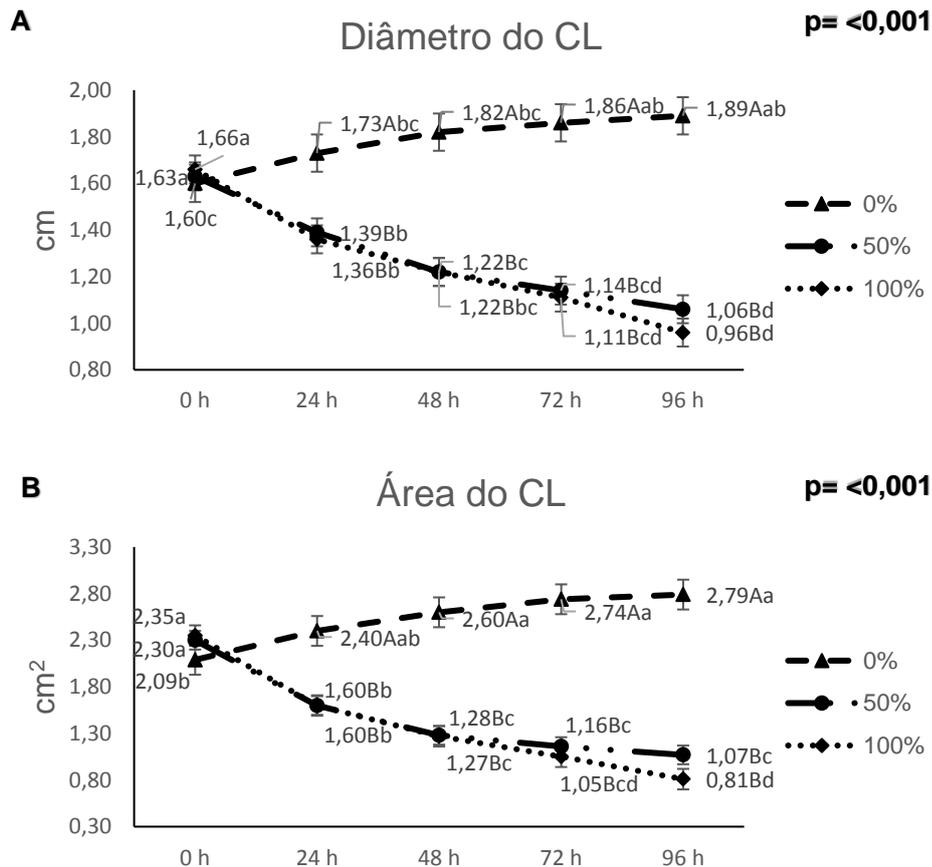


Figura 3. Dinâmica do diâmetro (A) e da área (B) do CL, conforme interação entre a dose de PGF2 α e o tempo após administração dos tratamentos. Valores para a mesma dose (0%, 50% e 100%) seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes. Valores para o mesmo momento (0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h) seguidos por diferentes letras maiúsculas são significantes.

Interação dia x tempo

Foi observada apenas redução numérica ($p \geq 0,05$) no diâmetro e na área do CL entre os momentos 0 h e 96 h para animais que se encontravam no D4 (Figura 4). Para animais que se encontravam no D11 foi observada redução ($p < 0,05$) das dimensões do CL entre os momentos 0 h e 96 h, sendo significativa já em 24 h (Figura 4).

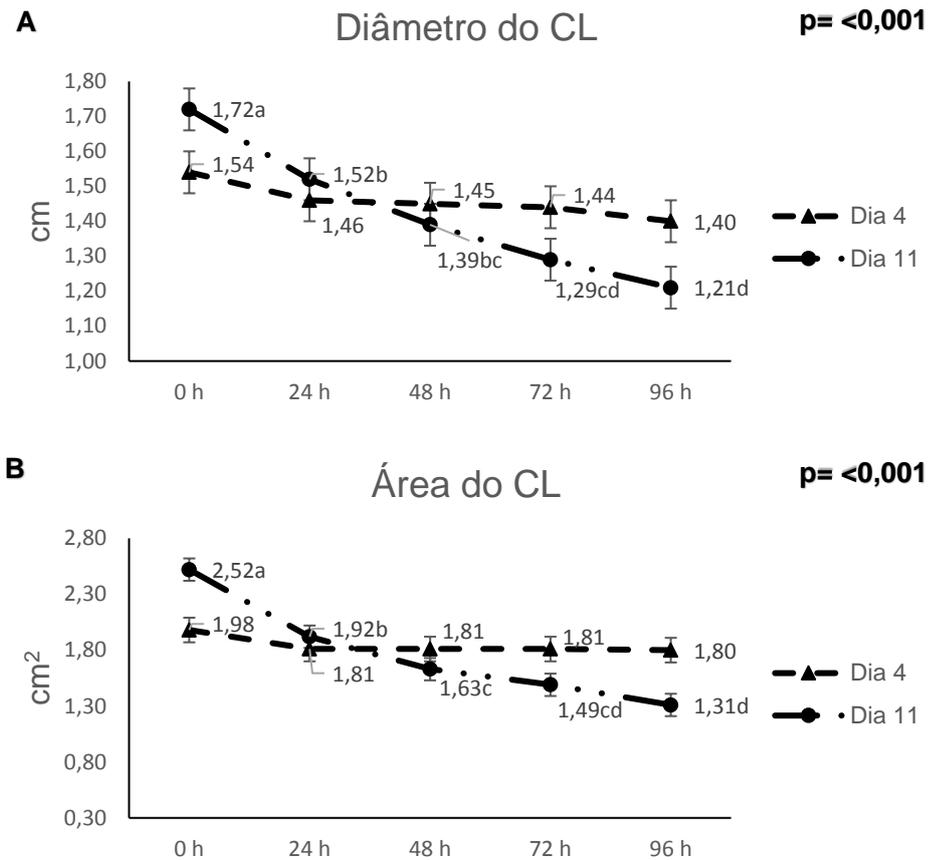


Figura 4. Dinâmica do diâmetro (A) e da área (B) do CL, conforme interação entre o dia do ciclo estral e o tempo após administração dos tratamentos. Valores para o mesmo dia (Dia 4 e Dia 11) seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.

Interação $\text{PGF2}\alpha$ x dose

A área do CL de animais não tratados (CS 0% e DT 0%) foi superior ($p < 0,05$) ao dos animais tratados com as diferentes doses (50% e 100%) de cloprostenol sódico e dinoprost trometamina (Figura 5). No entanto, não foi observada diferença entre o efeito dos diferentes ativos utilizados nas diferentes doses sobre o volume do CL ($p \geq 0,05$; Figura 5).

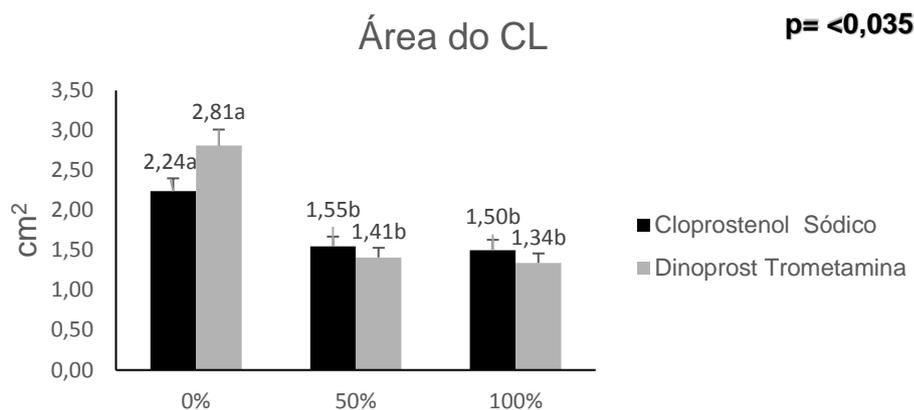


Figura 5. Dinâmica da área do CL, conforme interação entre o tipo de PGF $_{2\alpha}$ e a dose utilizada. Valores seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.

3.1.2. Vascularização do CL

3.1.2.1. Avaliação subjetiva dos escores de vascularização periférica e central

Interação dia x dose x tempo

Animais não tratados (0%) avaliados a partir do D4 mantiveram escores constantes de vascularização periférica ($p \geq 0,05$; Tabela 2 e Figura 6). Aqueles que receberam 50% da dose dos ativos avaliados no referido momento apresentaram apenas redução numérica no escore de vascularização periférica ($p \geq 0,05$; Tabela 2 e Figura 6). Apenas animais tratados com 100% da dose dos ativos avaliados no D4 apresentaram redução ($p < 0,05$) de escore em 72 h e 96 h com relação a 0 h (Tabela 2 e Figura 6). Não houve diferença entre os escores de vascularização periférica entre animais não tratados (0%) e animais tratados com 50% da dose dos agentes luteolíticos testados (Tabela 2 e Figura 6). Já animais tratados com 100% da dose apresentaram escore de vascularização central menor ($p < 0,05$) que animais não tratados (0%) nos momentos 72 h e 96 h e menor que animais tratados com 50% da dose no momento 96 h ($p < 0,05$; Tabela 2 e Figura 6).

Para animais que se encontravam no D11, o escore de vascularização periférica permaneceu constante para animais não tratados (dose 0%; $p \geq 0,05$; Tabela 2 e Figura 6). Animais que receberam os agentes luteolíticos apresentaram redução dos escores de vascularização periférica ($p < 0,05$), a partir de 48 h para animais tratados com 50% da dose e a partir de 24 h para animais tratados com 100% da dose (Tabela 2 e Figura 6). A utilização de 100% ou 50% da dose convencional dos ativos no D11 teve o mesmo efeito sobre os escores de vascularização periférica (Tabela 2 e Figura 6).

Tabela 2. Valores para escore de vascularização periférica do CL, conforme interação entre o dia do ciclo estral (D4 e D11), a dose de PGF2 α utilizada e o tempo após administração dos tratamentos. Valores na mesma linha seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes. Valores na mesma coluna seguidos por diferentes letras maiúsculas são significantes.

Dia*Dose	Tempo				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
D4*0%	2,17 \pm 0,30	2,17 \pm 0,30	2,17 \pm 0,30	2,42 \pm 0,30A	2,42 \pm 0,30A
D4*50%	2,00 \pm 0,21	1,60 \pm 0,21	1,50 \pm 0,21AB	1,50 \pm 0,21ABC	1,90 \pm 0,21A
D4*100%	1,90 \pm 0,21a	1,30 \pm 0,21ab	1,30 \pm 0,21ABab	0,90 \pm 0,21BCb	0,70 \pm 0,21BCb
D11*0%	1,83 \pm 0,30	1,83 \pm 0,30	2,17 \pm 0,30A	2,00 \pm 0,30AB	2,00 \pm 0,30AB
D11*50%	2,18 \pm 0,18a	1,54 \pm 0,18a	0,69 \pm 0,18Bb	0,31 \pm 0,18Cb	0,07 \pm 0,18Cb
D11*100%	1,92 \pm 0,20a	1,10 \pm 0,20b	0,82 \pm 0,20ABbc	0,45 \pm 0,20Cbc	0,08 \pm 0,20Cc

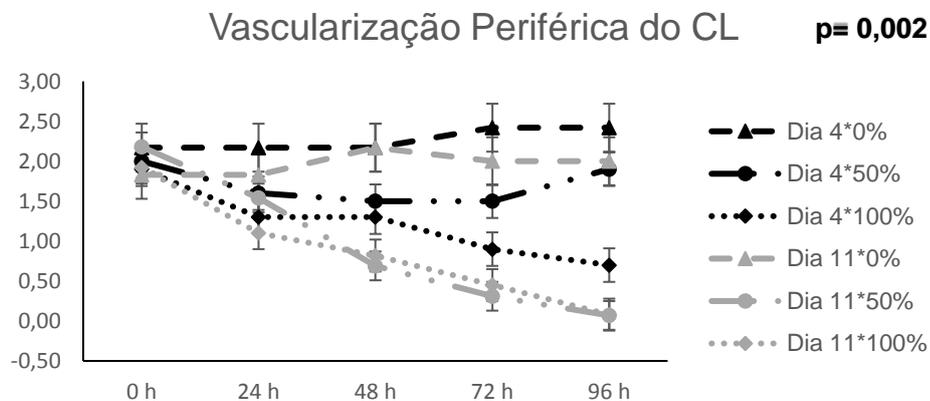


Figura 6. Dinâmica do escore de vascularização periférica do CL, conforme interação entre o dia do ciclo estral (D4 e D11), a dose de PGF2 α utilizada e o tempo após administração dos tratamentos.

Interação dose x tempo

A administração de 50% ou 100% da dose dos agentes luteolíticos induziu a redução dos escores de vascularização central do CL de animais tratados já a partir de 24 h ($p < 0,05$; Figura 7). Para animais não tratados (dose 0%), os escores de vascularização central permaneceram constantes entre 0 h e 96 h ($p \geq 0,05$; Figura 7). A utilização de 100% ou 50% da dose convencional dos ativos teve o mesmo efeito sobre a vascularização central do CL (Figura 7).

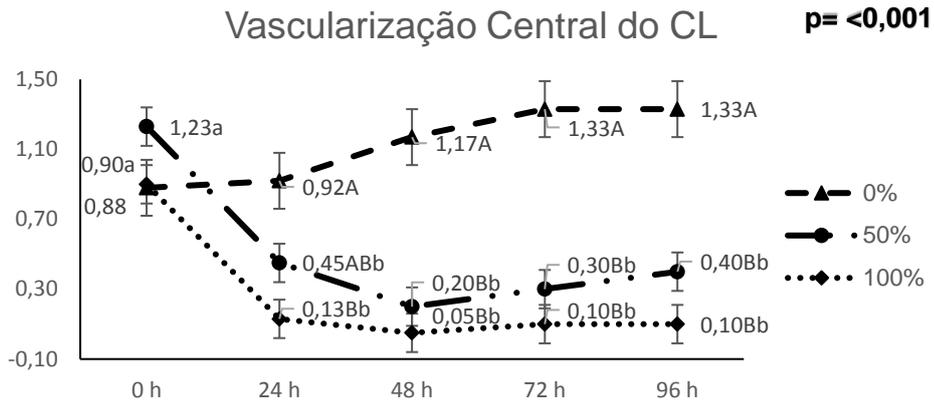


Figura 7. Dinâmica do escore de vascularização central do CL, conforme interação entre a dose de PGF2α utilizada e o tempo após administração dos tratamentos. Valores para a mesma dose (0%, 50% e 100%) seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes. Valores para o mesmo momento (0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h) seguidos por diferentes letras maiúsculas são significantes.

Interação dia x tempo

Foi observada apenas redução numérica ($p \geq 0,05$) nos escores de vascularização central do CL entre os momentos 0 h e 24 h, para animais que se encontravam no D4 (Figura 8). A partir de 24 h após o tratamento foi observado aumento numérico ($p \geq 0,05$) dos escores de vascularização central (Figura 8). Para animais que se encontravam no D11, foi observada redução ($p < 0,05$) nos escores de vascularização central do CL entre os momentos 0 h e 96 h, sendo significativa já em 24 h (Figura 8).

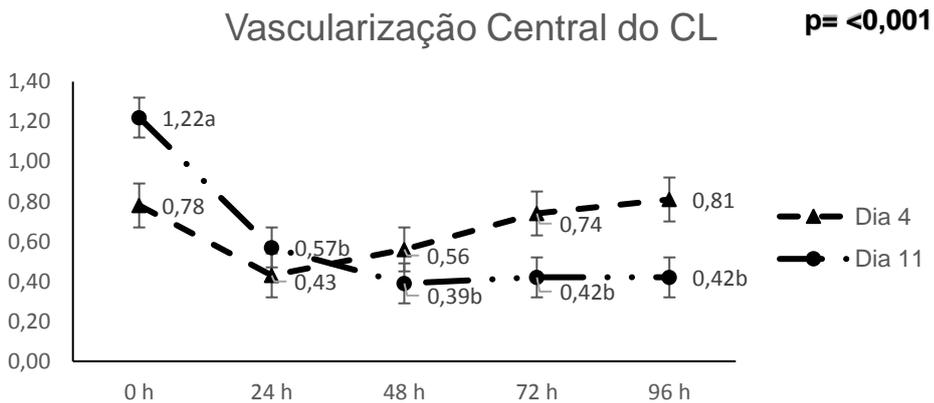


Figura 8. Dinâmica do escore de vascularização central do CL, conforme interação entre o dia do ciclo estral e o tempo após administração dos tratamentos. Valores para o mesmo dia (Dia 4 e Dia 11) seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.

3.1.2.2. Análise computadorizada da área vascularizada do CL

Interação dia x dose x tempo

Animais que se encontravam no momento D4 mantiveram percentual constante de área vascularizada do CL ao longo dos momentos avaliados ($p \geq 0,05$; Tabela 3 e Figura 9). No entanto, após a administração dos tratamentos foi observada redução numérica no percentual de área vascularizada ($p \geq 0,05$; Tabela 3 e Figura 9). Para animais que se encontravam no D11 da fase luteínica, a área vascularizada do CL permaneceu constante para animais não tratados (dose 0%; $p \geq 0,05$; Tabela 3 e Figura 9). Animais que receberam os agentes luteolíticos no D11 apresentaram redução da área vascularizada ($p < 0,05$), a partir de 24 h, independentemente da dose utilizada (Tabela 3 e Figura 9). A administração de 50% ou 100% da dose dos agentes luteolíticos em D11 causou o mesmo efeito sobre a área vascularizada do CL (Tabela 3 e Figura 9).

Tabela 3. Percentual de área vascularizada do CL, conforme interação entre o dia do ciclo estral (D4 e D11), a dose de PGF2 α utilizada e o tempo após administração dos tratamentos. Valores na mesma linha seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes. Valores na mesma coluna seguidos por diferentes letras maiúsculas são significantes.

Dia*Dose	Tempo				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
D4*0%	18,52 \pm 3,33	17,24 \pm 3,33	16,06 \pm 3,33	15,96 \pm 3,33AB	20,30 \pm 3,33A
D4*50%	17,41 \pm 2,30	10,13 \pm 2,30	11,76 \pm 2,30	11,28 \pm 2,30AB	18,00 \pm 2,30A
D4*100%	15,71 \pm 2,30	9,23 \pm 2,30	9,16 \pm 2,30	7,17 \pm 2,30AB	7,23 \pm 2,30AB
D11*0%	14,25 \pm 3,33	17,93 \pm 3,33	18,26 \pm 3,33	19,64 \pm 3,33A	17,57 \pm 3,33A
D11*50%	21,24 \pm 2,03a	12,35 \pm 2,03b	3,54 \pm 2,03c	1,24 \pm 2,03Bc	0,29 \pm 2,03Bc
D11*100%	18,70 \pm 2,21a	6,76 \pm 2,21b	3,97 \pm 2,21b	2,12 \pm 2,21Bb	0,73 \pm 2,21Bb

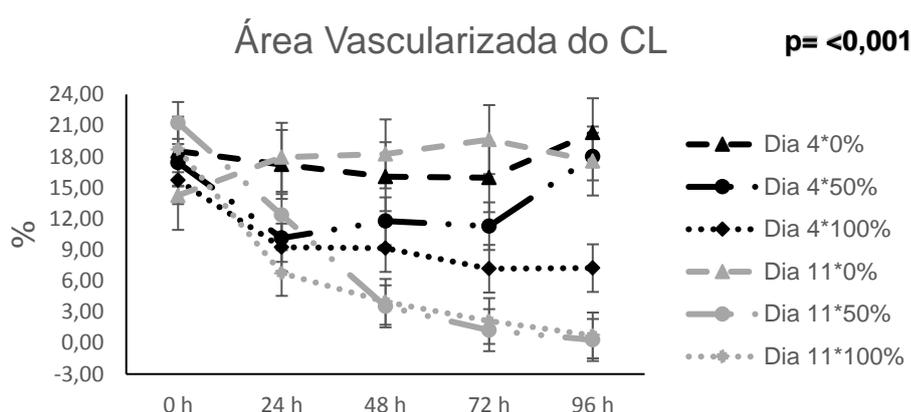


Figura 9. Dinâmica da área vascularizada do CL, conforme interação entre o dia do ciclo estral (D4 e D11), a dose de PGF2 α utilizada e o tempo após administração dos tratamentos.

Interação PGF2 α x dose x tempo

Animais não tratados mantiveram percentual de área vascularizada do CL constante ao longo dos momentos avaliados ($p \geq 0,05$; Tabela 4 e Figura 10). Animais tratados com os diferentes agentes luteolíticos apresentaram redução da área vascularizada ($p < 0,05$). Tal efeito foi observado a partir de 24 h para animais tratados com CS 100% e DT 50%, e a partir de 48 h para animais com DT 100% (Tabela 4 e Figura 10). Animais tratados com CS 50% apresentaram redução da área vascularizada no momento 72 h (Tabela 4 e Figura 10). A administração de 50% ou 100% da dose dos diferentes agentes luteolíticos avaliados exerceu efeito semelhante sobre a área vascularizada ao longo dos momentos avaliados (Tabela 4 e Figura 10).

Tabela 4. Percentual de área vascularizada do CL, conforme interação entre o tipo de PGF2 α (CS: cloprostenol sódico, DT: Dinoprost Trometamina), a dose utilizada e o tempo após administração dos tratamentos. Valores na mesma linha seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes. Valores na mesma coluna seguidos por diferentes letras maiúsculas são significantes.

PGF2 α *Dose	Tempo				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
CS*0%	15,93 \pm 2,98	16,66 \pm 2,98	20,34 \pm 2,98A	17,64 \pm 2,98	18,08 \pm 2,98
CS*50%	16,21 \pm 2,13a	11,55 \pm 2,13ab	7,84 \pm 2,13ABab	6,39 \pm 2,13b	13,08 \pm 2,13ab
CS*100%	19,20 \pm 2,30a	7,36 \pm 2,30b	7,46 \pm 2,30ABb	5,34 \pm 2,30b	3,91 \pm 2,30b
DT*0%	16,84 \pm 3,64	18,51 \pm 3,64	13,98 \pm 3,64AB	17,96 \pm 3,64	19,79 \pm 3,64
DT*50%	22,44 \pm 2,21a	10,93 \pm 2,21b	7,46 \pm 2,21ABb	6,13 \pm 2,21b	5,21 \pm 2,21b
DT*100%	15,21 \pm 2,21a	8,63 \pm 2,21ab	5,67 \pm 2,21Bb	3,95 \pm 2,21b	4,04 \pm 2,21b

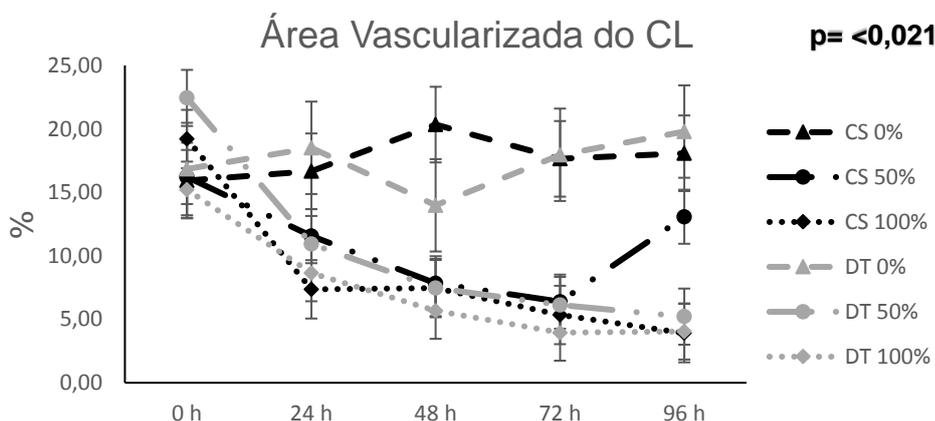


Figura 10. Dinâmica da área vascularizada do CL, conforme interação entre o tipo de PGF2 α (CS: Cloprostenol Sódico, DT: Dinoprost Trometamina), a dose utilizada e o tempo após administração dos tratamentos.

3.1.3. Concentrações séricas de progesterona

Interação dose x tempo

A administração de 50% ou 100% da dose dos ativos avaliados causou redução semelhante da concentração sérica de progesterona entre 0 h e 48 h, podendo ser observada redução significativa já no momento 8 h ($p < 0,05$; Figura 11). Para animais tratados com 100% da dose, a concentração de progesterona atingiu concentrações abaixo de 1 ng/ml em até 8 h após o tratamento, enquanto que para animais tratados com 50% da dose esse efeito foi observado em até 24 h (Figura 11). Para animais não tratados (dose 0%), a concentração sérica de progesterona circulante permaneceu estável ($p \geq 0,05$) e acima de 1 ng/ml até 48 h após o início das avaliações (Figura 11).

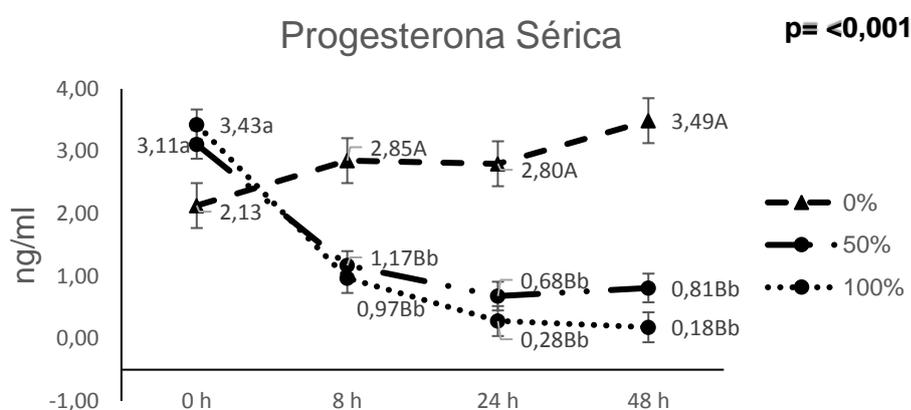


Figura 11. Dinâmica da concentração de progesterona sérica, conforme interação entre a dose de PGF2 α utilizada e o tempo após administração dos tratamentos. Valores para a mesma dose (0%, 50% e 100%) seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes. Valores para o mesmo momento (0 h, 8 h, 24 h, e 48 h) seguidos por diferentes letras maiúsculas são significantes.

Avaliando isoladamente o efeito após a administração das diferentes doses de PGF2 α no momento D11, foi possível observar comportamento similar após o uso de 50% ou 100% da dose (Figura 12). Foi observada queda contínua na concentração sérica de progesterona entre 0 h e 48 h, com concentrações abaixo de 1 ng/ml para ambos os tratamentos em até 24 h após a administração (Figura 12). Ainda com relação aos tratamentos administrados em D11, a análise considerando tipo e dose de PGF2 α demonstra efeito semelhante sobre a concentração sérica de progesterona após administração dos tratamentos avaliados (Tabela 5 e Figura 13). Foi observada queda contínua na concentração sérica de progesterona entre 0 h e 48 h, com concentrações abaixo de 1 ng/ml para todos os tratamentos em até 24 h após a administração (Tabela 5 e Figura 13).

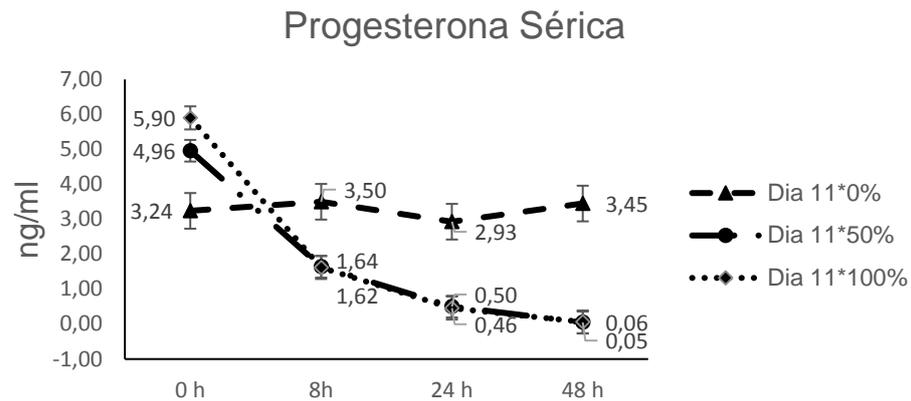


Figura 12. Dinâmica da concentração de progesterona sérica observada em animais avaliados a partir do momento D11, conforme dose de PGF2 α utilizada (0%, 50% ou 100%).

Tabela 5. Concentração de progesterona sérica (ng/ml) em animais avaliados a partir do momento D11, conforme tipo (CS: Cloprostenol Sódico, DT: Dinoprost Trometamina) e dose de PGF2 α utilizada (0%, 50% ou 100%).

Dia*PGF2 α *Dose	Tempo			
	0 h	8 h	24 h	48 h
D11*CS*0%	2,12 \pm 0,64	3,10 \pm 0,64	3,00 \pm 0,64	1,91 \pm 0,64
D11*CS*50%	5,42 \pm 0,42	1,36 \pm 0,42	0,53 \pm 0,42	0,06 \pm 0,42
D11*CS*100%	5,82 \pm 0,50	1,61 \pm 0,50	0,26 \pm 0,50	0,00 \pm 0,50
D11*DT*0%	4,37 \pm 0,79	3,90 \pm 0,79	2,85 \pm 0,79	4,99 \pm 0,79
D11*DT*50%	4,49 \pm 0,45	1,93 \pm 0,45	0,47 \pm 0,45	0,04 \pm 0,45
D11*DT*100%	5,98 \pm 0,45	1,63 \pm 0,45	0,67 \pm 0,45	0,12 \pm 0,45

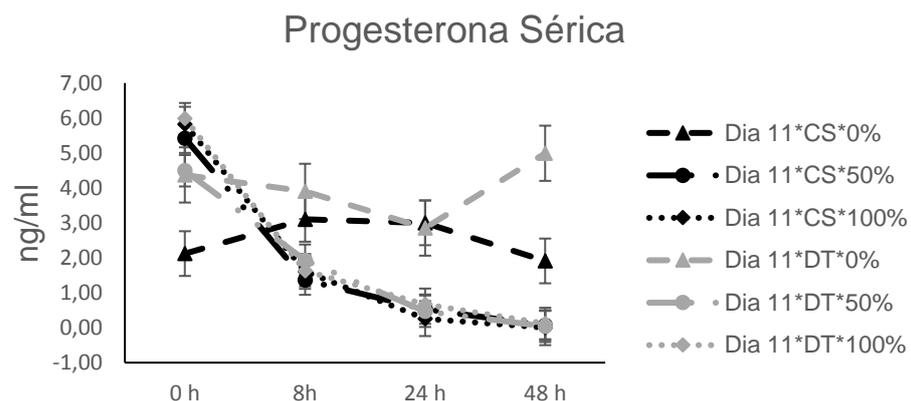


Figura 13. Dinâmica da concentração de progesterona sérica em animais avaliados a partir do momento D11, conforme tipo (CS: Cloprostenol Sódico, DT: Dinoprost Trometamina) e dose de PGF2 α utilizada (0%, 50% ou 100%).

Interação dia x tempo

Animais que se encontravam no momento D4 mantiveram concentrações constantes ($p \geq 0,05$) de progesterona durante as avaliações realizadas entre 0 h e 48 h (Figura 14). Apesar da ausência de alterações na concentração sérica de progesterona para animais avaliados a partir de D4, a análise dos dados agrupados conforme dose de PGF2 α demonstra redução seguida de aumento, ao menos numéricos, para animais tratados com 50% ou 100% da dose no período entre 0 h e 48 h. Dos 20 animais que receberam algum tratamento luteolítico no D4, 14 (CS 50% = 2; CS 100% = 5; DT 50% = 3; DT 100% = 4) apresentaram concentração de progesterona abaixo de 1 ng/ml 48 h após o tratamento.

Animais avaliados a partir do momento D11 apresentaram redução ($p < 0,05$) da concentração de progesterona entre 0 h e 48 h, podendo ser observada redução significativa já no momento 8 h (Figura 14). Conforme demonstrando na Tabela 5 e na Figura 15, a administração dos tratamentos propostos no momento D11 foi eficiente em reduzir a concentração de progesterona sérica. Dos 24 animais tratados no referido momento, apenas dois (tratados com DT 100%) não apresentavam concentração de progesterona abaixo de 1 ng/ml 24 h após o tratamento. No entanto, no momento 48 h todos os animais tratados apresentavam concentração de progesterona abaixo de 1 ng/ml.

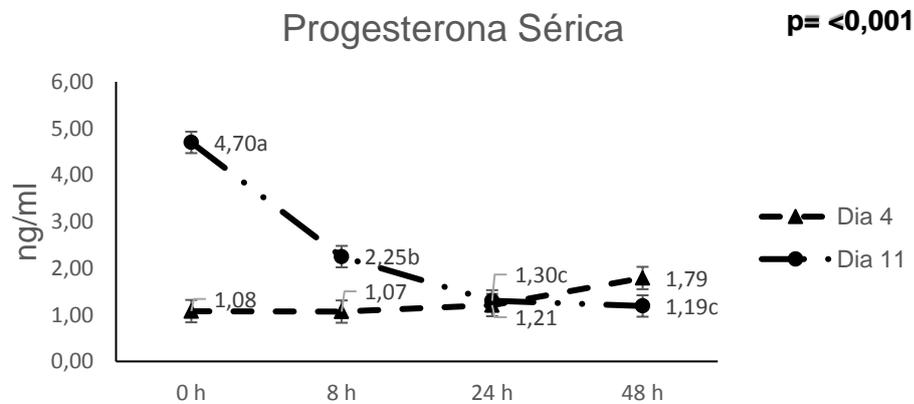


Figura 14. Dinâmica da concentração de progesterona sérica, conforme interação entre dia do ciclo estral e o tempo após administração dos tratamentos. Valores para o mesmo dia (Dia 4 e Dia 11) seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.

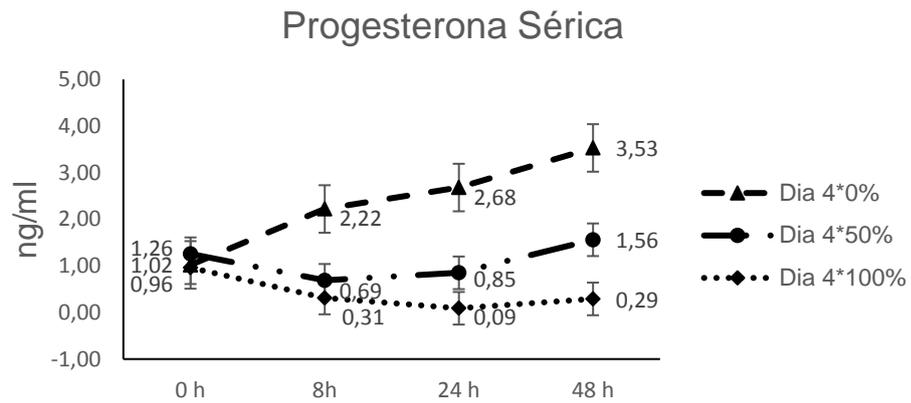


Figura 15. Dinâmica da concentração de progesterona sérica observada em animais avaliados a partir do momento D4, conforme dose de PGF2 α utilizada (0%, 50% ou 100%).

3.2. EXPERIMENTO 2

Os valores de P para as variáveis analisadas, conforme efeitos principais e interações, estão representados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de P para cada variável analisada, conforme efeitos principais e interações.

Variável	Dia	PGF2 α	Dose	Tempo	Dia* PGF2 α	Dia* Dose	PGF2 α * Dose	Dia* Tempo	PGF2 α * Tempo	Dose* Tempo	Dia* Dose* PGF2 α	Dia* PGF2 α * Tempo	Dia* Dose* Tempo	PGF2 α * Dose* Tempo	Dia* PGF2 α * Dose* Tempo
Imunomarcção CLG	0,199	0,199	0,023	-	0,886	0,567	0,253	-	-	-	1,000	-	-	-	-
Imunomarcção CLP	<0,001	0,898	0,607	-	0,006	0,607	0,266	-	-	-	0,042	-	-	-	-
Área CLG	<0,001	0,035	0,006	-	0,604	0,353	0,003	-	-	-	0,003	-	-	-	-
Área CLP	<0,001	<0,001	0,805	-	<0,001	<0,001	<0,001	-	-	-	0,102	-	-	-	-
Progesterona (ng/ml)	<0,001	0,971	0,516	<0,001	0,160	0,746	0,761	<0,001	0,714	0,543	0,282	0,702	0,283	0,646	0,105

Dia: dia do ciclo estral; PGF2 α : tipo de PGF2 α ; Dose: dose de PGF2 α ; Tempo: tempo após a administração dos tratamentos; CLG: células luteais grandes; CLP: células luteais pequenas; Valores de p<0,05 são significativos.

3.2.1. Atividade da caspase-3 por imunohistoquímica (imunomarcção)

Interação dia x PGF2 α x dose

Após a administração dos agentes luteolíticos, o número de células luteais pequenas positivas para imunomarcção para caspase-3 foi semelhante entre os tratamentos, quando agrupados conforme o dia do ciclo estral (D4 ou D11; $p > 0,05$). Entretanto, o CL de animais tratados com 100% da dose de dinoprost trometamina no D11 exibiu maior número de células luteais pequenas imunomarcadas quando comparado com o CL de todos os animais tratados no D4. Além disso, todos os tratamentos no D11, exceto o CS 100%, apresentaram contagem superior destas células comparado ao DT 100% no D4 ($p < 0,05$; Figura 16).

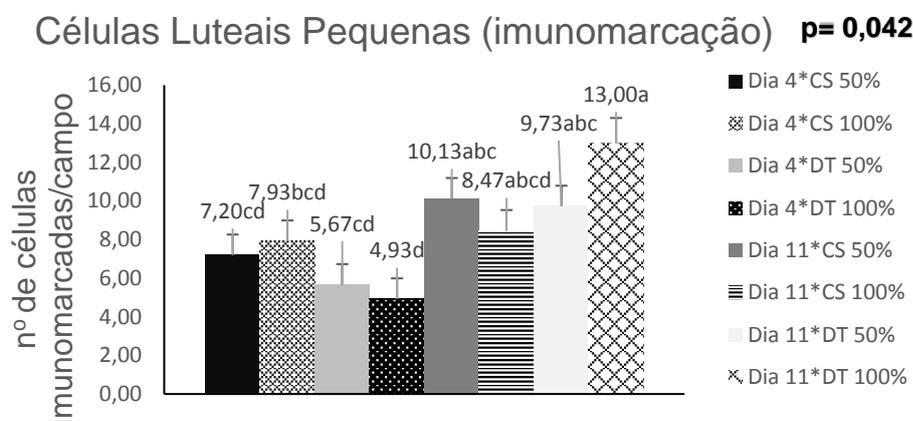


Figura 16. Número de células luteais pequenas imunomarcadas por campo, conforme interação entre o dia do ciclo estral, o tipo (CS: Cloprostenol Sódico; DT: Dinoprost Trometamina) e a dose de PGF2 α utilizados. Valores seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.

Efeito de dose de PGF2 α

Após a administração das diferentes doses de PGF2 α avaliadas, foi observado que o CL de animais tratados com 50% da dose dos agentes luteolíticos apresentaram maior número de células luteais grandes positivas para imunomarcção para caspase-3 quando comparados com CL de animais tratados com 100% da dose ($p < 0,05$; Figura 17).

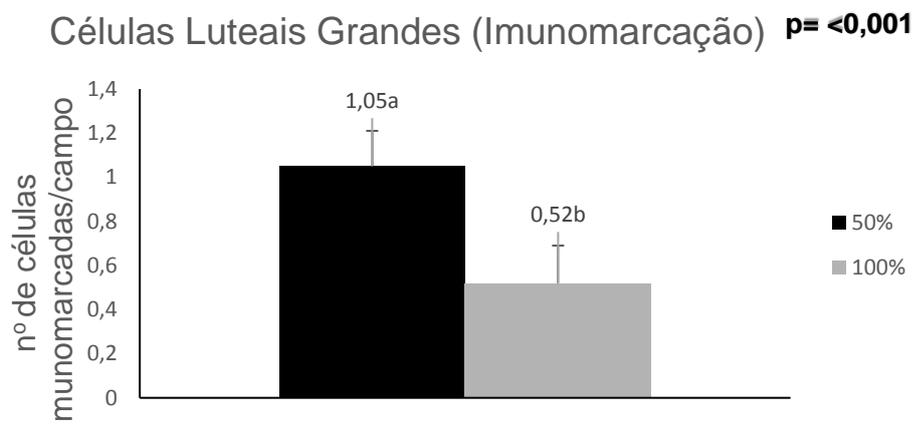


Figura 17. Número de células luteais grandes imunomarcadas por campo, conforme fator dose de PGF α . Valores seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.

3.2.2. Análise morfométrica das células luteais

Interação dia x dose x PGF2 α

A área das células luteais grandes foi semelhante ($p > 0,05$) entre os animais tratados no D11 do ciclo estral, independentemente da dose ou do agente luteolítico avaliado. Já para animais tratados no D4, foi observado que fêmeas tratadas com CS 100% apresentaram células luteais grandes com área inferior à das fêmeas tratadas com CS 50% e DT 100% ($p < 0,05$; Figura 18). Comparando o efeito dos tratamentos nos diferentes momentos, foi observado que animais tratados com CS 50% e DT 100% no D4 apresentaram células luteais grandes com área superior ($p < 0,05$) à de todos os animais tratados no D11 (Figura 18). Animais tratados com DT 50% no D4 apresentaram área de células luteais grandes semelhante ($p \geq 0,05$) à daqueles tratados com a mesma dose no D11 e superior ($p < 0,05$) à dos demais tratamentos administrados no D11 (Figura 18). Animais tratados com CS 100% no D4 apresentaram área de células luteais grandes superior ($p < 0,05$) à daqueles tratados com a mesma dose no D11 e semelhante ($p \geq 0,05$) à dos demais tratamentos administrados no D11 (Figura 18).

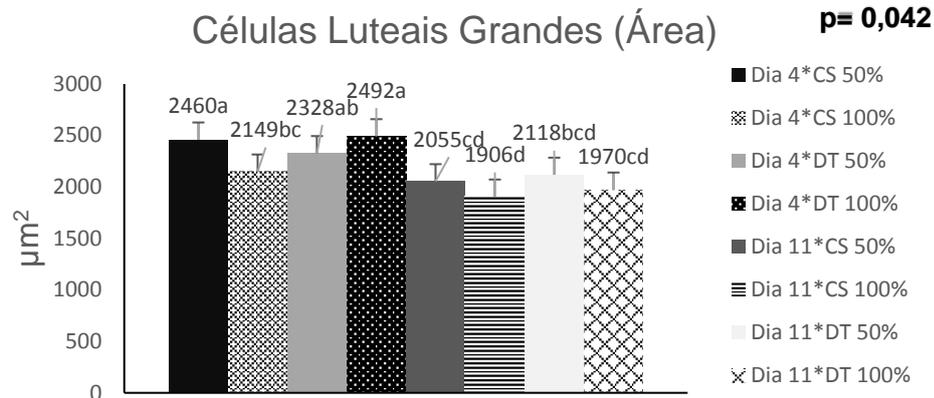


Figura 18. Área das células luteais grandes, conforme interação entre o dia do ciclo estral, o tipo (CS: Cloprostenol Sódico; DT: Dinoprost Trometamina) e a dose de PGF2 α utilizados. Valores seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.

Interação dia x PGF2 α

A área das células luteais pequenas foi superior em animais tratados com cloprostenol sódico no momento D4 em comparação com os que receberam dinoprost trometamina no mesmo momento e também com aqueles tratados no D11 ($p < 0,05$). O uso de cloprostenol sódico e dinoprost trometamina influenciou de maneira semelhante a área das células luteais pequenas no momento D11 ($p > 0,05$; Figura 19).

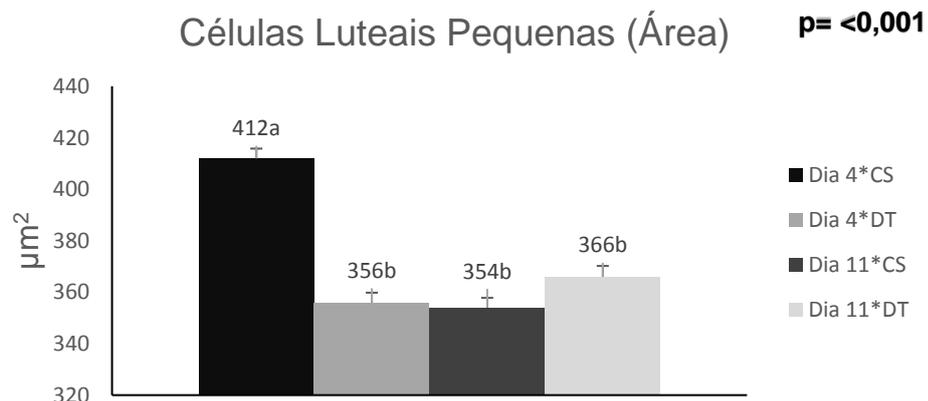


Figura 19. Área das células luteais pequenas, conforme interação entre o dia do ciclo estral e o tipo PGF2 α utilizada (CS: Cloprostenol Sódico; DT: Dinoprost Trometamina). Valores seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.

Interação dia x dose

A área das células luteais pequenas foi superior em animais tratados com 100% da dose dos agentes luteolíticos no momento D4 em comparação com a área celular de animais que receberam 50% da dose no D4 e também com aqueles tratados no D11 ($p < 0,05$). O uso de 50% ou 100% da dose influenciou de maneira semelhante a área das células luteais pequenas no momento D11 ($p > 0,05$; Figura 20).

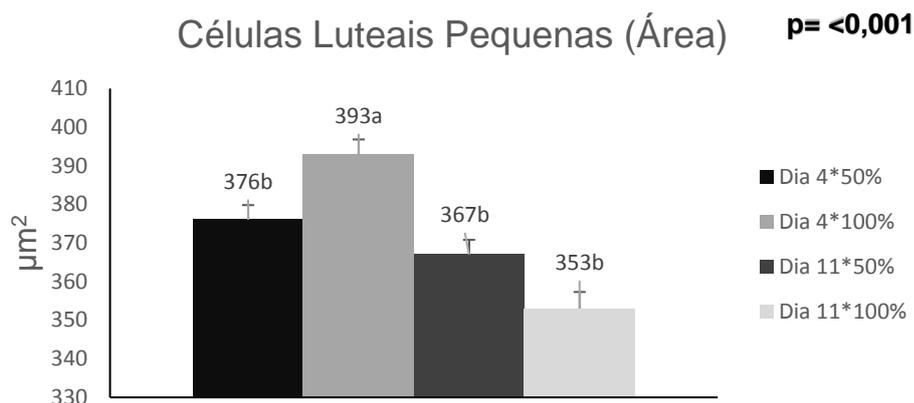


Figura 20. Área das células luteais pequenas, conforme interação entre o dia do ciclo estral e a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ utilizada. Valores seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.

Interação $\text{PGF}_{2\alpha}$ x dose

Animais tratados com 50% da dose de dinoprost trometamina apresentaram menor área de células luteais pequenas ($p < 0,05$) quando comparados com animais que receberam os demais tratamentos (dinoprost trometamina 100% e cloprostenol sódico 50% e 100%). Não houve diferença para a área celular de animais tratados com 100% da dose de cloprostenol sódico e dinoprost trometamina ($p > 0,05$; Figura 21).

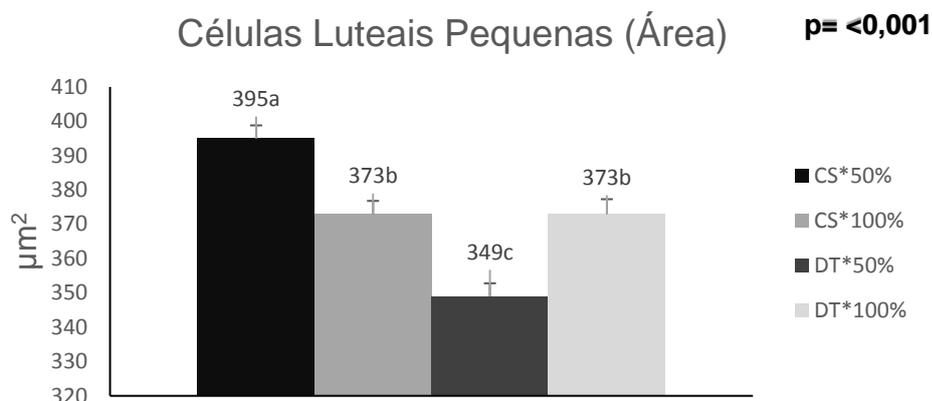


Figura 21. Área das células luteais pequenas, conforme interação entre o tipo de PGF2 α (CS: Cloprostenol Sódico; DT: Dinoprost Trometamina) e a dose utilizada. Valores seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.

3.2.3. Concentrações séricas de progesterona

Interação dia x tempo

A administração dos agentes luteolíticos avaliados causou redução da concentração sérica de progesterona entre 0 h e 24 h, independentemente do dia de realização do tratamento ($p < 0,05$; Figura 22).

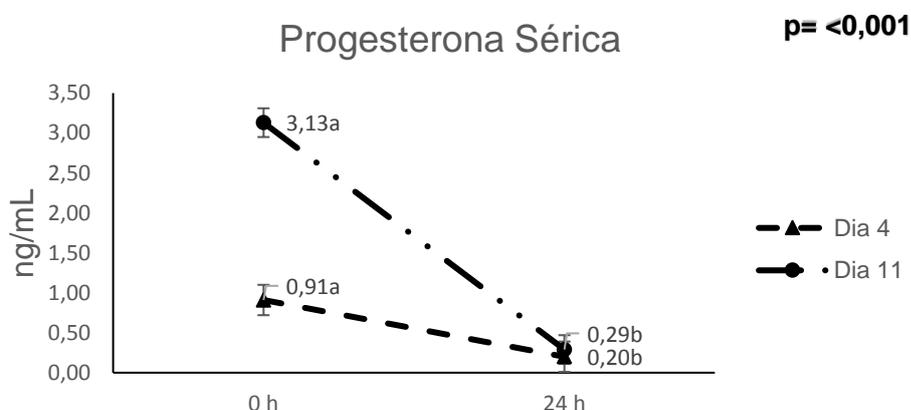


Figura 22. Dinâmica da concentração de progesterona sérica, conforme interação entre dia do ciclo estral e o tempo após administração dos tratamentos. Valores para o mesmo dia (Dia 4 e Dia 11) seguidos por diferentes letras minúsculas são significantes.

4. DISCUSSÃO

Os achados no presente estudo corroboram com parte do que há disponível na literatura sobre a redução de doses de diferentes princípios ativos de PGF2 α em diferentes momentos do ciclo estral. Contudo, o principal resultado encontrado no

presente trabalho se refere a diferenças morfológicas e da atividade de caspase-3 entre células luteínicas pequenas e grandes quando submetidas a estes tratamentos.

Em concordância com o previamente relatado em ovelhas [19] e em vacas leiteiras [20], os princípios ativos não diferiram quanto à eficiência luteolítica referente aos achados ultrassonográficos ou de dosagem de progesterona em fêmeas bovinas de corte. Contudo, evidenciou-se que ambos agentes luteolíticos quando administrados no D11 foram eficientes em reduzir as dimensões luteais (avaliações ultrassonográficas) entre 0 h e 96 h, caracterizando o processo de luteólise estrutural, fato que não ocorreu aos animais tratados no D4. Com relação ao efeito das diferentes doses dos agentes luteolíticos avaliados, foi observado que o uso de 50% ou 100% da dose recomendada causou redução semelhante das dimensões luteais, diferente do demonstrado por Castro Ferraz Júnior et al. (2016) [21], avaliando diferentes doses de dinoprost (12,5; 25,0 ou 50,0 mg) em vacas de corte nos momentos D5 e D7 do ciclo estral. Diversos trabalhos avaliaram o uso e o efeito de diferentes doses de PGF₂ α [12-14, 19, 22-24], demonstrando que a redução de dose dos agentes luteolíticos é uma alternativa viável que pode ser adotada no manejo reprodutivo. O presente trabalho demonstrou que o uso de 50% da dose convencional, garantiu resultados semelhantes ao uso de 100% da dose. Esse fato demonstra que o uso de metade da dose convencional de cloprostenol sódico (250 μ g) e de dinoprost trometamina (12,5 mg) pode ser uma alternativa eficaz de induzir luteólise em fases responsivas do CL em fêmeas bovinas de corte.

Além da luteólise estrutural, observou-se luteólise funcional (queda nas concentrações de progesterona) em animais tratados no D11, sendo que o uso de 50% ou 100% da dose recomendada foi igualmente eficaz em promover valores menores que 1 ng/ml em até 24 h após o tratamento. Já no D4, os animais do Experimento 1 tratados com 50% ou 100% da dose dos ativos avaliados apresentaram redução e posterior aumento, ao menos numéricos, na concentração sérica de progesterona entre 0 h e 48 h. Para os animais avaliados no Experimento 2, foi observada redução na concentração sérica de progesterona entre 0 h e 24 h, tanto para animais tratados no D4, quanto para animais tratados em D11.

A diminuição das dimensões luteais é causada pela morte celular, apoptose e degeneração do tecido luteal [25, 26] e, como consequência, há queda nas concentrações de progesterona. Conjuntamente, os dados do presente estudo estão em concordância com outros relatos descritos na literatura, demonstrando a eficácia de tratamentos luteolíticos administrados apenas em fases responsivas do CL [10, 12, 19, 21, 22] e ausência de luteólise estrutural e funcional completa quando o tratamento é administrado na fase inicial do ciclo estral [10, 12, 21, 22, 24, 27-29], sugerindo que nesta fase há ocorrência de luteólise parcial [11, 12, 21]. No entanto, como no presente estudo a concentração de progesterona foi mensurada até 24 h (experimento 1) ou 48 h (experimento 2) após o tratamento, não foi possível registrar a retomada na produção esteroidogênica para alguns grupos de tratamento.

Tsai e Wiltbank (1998) [9] demonstraram que não há diferença na expressão de RNAm de receptores de PGF2 α em CL bovino no D4 ou D11 do ciclo estral, e que a administração de tratamento luteolítico diminui a quantidade de RNAm de receptores de PGF2 α em ambos os momentos do ciclo estral, quando comparados a animais não tratados. Sakamoto et al. (1995) [30] e Shirasuna et al. (2012) [31] também demonstraram a presença de expressão de RNAm de receptores de PGF2 α em CL bovino no início do ciclo estral (3 a 5 dias), no entanto, os autores observaram aumento de expressão com o avançar das fases do ciclo. Miyamoto et al. (2009) [32] revisando o impacto dos processos hemodinâmicos no processo de formação e regressão do CL, associam a maior resistência à luteólise com a presença de maiores níveis da enzima catalisadora de PGF2 α , 15-hydroxyprostaglandina dehydrogenase (PGDH) no CL de início do ciclo. Esses achados podem explicar as diferenças observadas na resposta luteolítica conforme a fase do ciclo estral que os tratamentos foram administrados.

Com relação à expressão de RNAm codificador de ciclo-oxigenase-2 (COX-2), Tsai e Wiltbank (1998) [9] observaram expressão de concentrações basais em animais não tratados, em ambas as fases do ciclo (D4 e D11). Já em animais tratados pode-se observar aumento da concentração de RNAm de COX-2 em CL de 11 dias e diminuição significativa em CL de 4 dias. Com isso os autores citam que a administração intramuscular de PGF2 α (25 mg de dinoprost trometamina) em animais no dia 4 do ciclo alcança o CL, se liga aos receptores de PGF2 α , e inicia ao menos em partes os eventos fisiológicos que induzem o processo luteolítico; contudo, uma injeção simples de PGF2 α não seria capaz de completar o processo de luteólise nesta fase. Resultado semelhante foi observado por Nascimento et al. (2014) [11] que relataram ausência de efeito luteolítico completo após administração de uma (25 mg) ou duas doses (2 x 25 mg; 50 mg) de dinoprost trometamina em vacas holandesas não lactantes tratadas na fase inicial do ciclo estral (D5). Os autores observaram que animais tratados apresentaram menor concentração de progesterona que animais não tratados nas primeiras 24 h após a administração do ativo, no entanto, no 15^o do ciclo estral todos os grupos tratados com dinoprost trometamina apresentavam concentrações séricas de progesterona condizentes com CL funcionais. Os autores ainda demonstraram por meio de avaliações ultrassonográficas que nenhum CL regrediu completamente durante o período experimental e que não ocorreram novas ovulações para que houvesse a formação de novos CL funcionais durante o ciclo avaliado. Esses eventos podem explicar a semelhança observada entre a área de células luteais grandes e pequenas de animais tratados nos momentos D4 e D11, observada no experimento 2, uma vez que a administração de agentes luteolíticos na fase inicial do ciclo estral é capaz de induzir um processo de luteólise parcial.

Ao observar os resultados obtidos para os diferentes modelos de análise da vascularização do CL (subjetiva: escores de vascularização central e periférica; objetiva: % de área vascularizada), pode-se observar que os valores foram afetados

de maneira similar pelas variáveis analisadas. Os resultados evidenciaram respostas como ausência de alteração, apenas redução numérica, da vascularização tecidual em animais avaliados a partir do momento D4 do ciclo estral, com exceção para vascularização periférica de animais tratados com 100% da dose, para os quais os valores médios dos momentos 72 h e 96 h foram menores que 0 h. Para animais tratados no momento D11, foi observada redução da vascularização tecidual do CL, independentemente do ativo e da dose utilizados. Acosta et al. (2002) [10] observaram resultado semelhante ao apresentado neste trabalho, demonstrando redução da área vascularizada do CL para animais tratados com 500 µg de cloprostenol na fase luteínica intermediária (diestro), bem como ausência de alteração da área vascularizada para animais tratados na fase luteínica inicial (metaestro). Ginther et al. (2007) [23], avaliando o fluxo sanguíneo do CL de animais submetidos a diferentes tratamentos luteolíticos, observaram que a administração de 500 µg de cloprostenol e de 25 mg de dinoprost foi eficiente em reduzir a área vascularizada do CL. Trevisol et al. (2015) [12] avaliando o efeito de doses luteolíticas (2 x 500 µg) e subluteolíticas (83,33 µg) de cloprostenol sódico observaram redução da área vascularizada do CL para animais tratados com 2 x 500 µg de cloprostenol e área vascularizada constante para animais tratados com 83,33 µg do ativo.

O resultado observado para os métodos de avaliação de vascularização do CL corrobora com o observado por Viana et al. (2013) [33] que, revisando o uso da ultrassonografia doppler na avaliação ovariana, citam a existência de boa correlação entre métodos objetivos e subjetivos para avaliação do fluxo sanguíneo do CL. Ghetti et al. (2012) [34] também observaram forte correlação entre métodos objetivos e subjetivos para avaliação da vascularização de folículos pré-ovulatórios de bovinos.

Não foi encontrado nenhum trabalho avaliando a ação dos agentes luteolíticos sobre a vascularização central, no entanto, Miyamoto et al. (2009) [32] relatam que uma dose luteolítica de PGF₂α induz aumento agudo, entre 30 minutos e 2 h após o tratamento, de fluxo sanguíneo periférico do CL responsivo ao tratamento, juntamente com aumento da expressão de óxido nítrico (NOS), no entanto, esse efeito não é observado no fluxo sanguíneo central do CL. Logo após esse aumento de fluxo sanguíneo periférico, observa-se drástica supressão na expressão de fator de crescimento endotelial (VEGF), coincidentemente com o aumento de Endotelina 1, Angiotensina II e PGF₂α luteal, dando início a uma severa vasoconstrição, reduzindo o suprimento sanguíneo, acelerando a cascata luteolítica.

Contudo, há também alguns estudos demonstrando diferenças pontuais na resposta luteolítica após o uso dos referidos fármacos, como o de Stevenson e Phatak (2010) [7], que observaram que a administração de 25 mg de dinoprost foi mais eficiente que 500 µg de cloprostenol em reduzir a concentração de progesterona em vacas leiteiras submetidas a programa de inseminação artificial em tempo fixo. No entanto, esse efeito não influenciou a taxa de concepção aos 30-36 dias, que foi igual entre os dois tratamentos.

Na análise microscópica das células luteínicas grandes e pequenas ocorrida no presente estudo, pode-se verificar algumas diferenças entre estes tipos celulares e as respostas aos tratamentos impostos. Com relação à área das células luteínicas, nas grandes observou-se melhor resposta luteolítica (menor área) quando 100% do cloprostenol sódico foi utilizado no diestro. Já nas pequenas, a melhor resposta foi obtida com ambos fármacos, independente da dose, quando administrada também no diestro. Quanto à imunolocalização da caspase-3, maior quantidade de células luteínicas grandes imunomarcadas foram observadas quando 50% da dose foi administrada, independente do fármaco. Nas células pequenas, o melhor resultado (maior número de células imunomarcadas) foi alcançado quando 100% de dinoprost trometamina foi administrado no diestro. Korzekwa et al. (2014) [35] avaliaram a influência de análogos de PGF2 α , incluindo cloprostenol e dinoprost, sobre células luteais bovinas e na contratilidade da artéria ovariana *in vitro*. Os pesquisadores observaram que o cloprostenol foi mais eficaz em reduzir a função secretora de progesterona, a viabilidade celular, além de aumentar a fragmentação de DNA no núcleo celular, enquanto que o dinoprost exerceu efeito semelhante à PGF2 α natural para esses parâmetros avaliados. Com relação a contratilidade da artéria uterina, os ativos apresentaram efeito semelhante. Os dados observados pelos autores citados, em conjunto com o que foi observado no presente trabalho, demonstram que os ativos podem agir de maneira diferente, sem, no entanto, haver diferença na indução de luteólise.

Com relação à atividade da enzima caspase-3, altamente relacionada ao processo de apoptose, Korzekwa et al. (2014) [35] demonstraram que cloprostenol sódico e dinoprost trometamina induziram de maneira semelhante a atividade dessa enzima em células luteais bovinas cultivadas *in vitro*. Resultado semelhante foi observado no experimento 2 deste trabalho, no qual não foram demonstradas diferenças no número de células luteais grandes e pequenas imunomarcadas para caspase-3 após o uso dos dois agentes luteolíticos. Com relação ao uso de doses reduzidas de PGF2 α na indução de luteólise, no presente trabalho demonstrou-se que a utilização de 50% da dose foi mais eficiente em induzir a atividade da caspase-3 em células luteais grandes em comparação ao uso de 100% da dose. Esse fato indica que o uso de 50% da dose de PGF2 α pode ser uma alternativa eficaz na indução de luteólise, uma vez que segundo Stocco et al. (2007) [36], células luteais grandes produzem entre 2 e 40 vezes mais progesterona que células luteais pequenas.

5. CONCLUSÕES

A principal diferença observada após a administração de cloprostenol sódico e dinoprost trometamina ocorreu no efeito exercido pelos ativos sobre as células luteais grandes e pequenas. As dimensões luteais, a vascularização do CL e os níveis séricos de progesterona foram afetados de maneira semelhante após a administração dos ativos avaliados. A administração dos agentes luteolíticos em D4 (metaestro) foi capaz

de induzir ao menos luteólise parcial, demonstrada pela diminuição da concentração sérica de progesterona, redução da área de células luteais, indução da atividade da caspase-3, além de redução numérica nas dimensões luteais (ultrassonografia) e na vascularização do CL. Já a administração no D11 (diestro) foi eficiente em induzir luteólise completa, provocando redução da concentração de progesterona, das dimensões (ultrassonografia e morfometria) e da vascularização luteais, além de indução da atividade de caspase-3. Demonstrou-se também a capacidade luteolítica do uso de 50% da dose de cloprostenol sódico e de dinoprost trometamina, quando administradas no diestro (D11).

Agradecimentos

Os autores agradecem à Ourofino Saúde Animal por todo o auxílio disponibilizado durante o desenvolvimento do trabalho.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Bó, G.A.; Baruselli, P.S.; Martínez, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science* 2003;28:307-26.
- [2] Bó, G.A.; Cutaia, L.; Tríbulo, R. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en argentina. *Sítio Argentino de Producción Animal* 2002;1-14.
- [3] Monteiro Júnior, P.L.; Borsato, M.; Silva, F.L.; Prata, A.B.; Wiltbank, M.C.; Sartori, R. Increasing estradiol benzoate, pretreatment with gonadotropin-releasing hormone, and impediments for successful estradiol-based fixed-time artificial insemination protocols in dairy cattle. *Journal Dairy Science* 2015;98: 3826-39.
- [4] Donaldson, L.E. A comparison of cloprostenol and dinoprost tromethamine for the control of estrus in bovine embryo transfer. *Theriogenology* 1984;21:1019-22.
- [5] Salverson, R.R.; DeJarnette, J.M.; Marshall, C.E.; Wallace, R.A. Synchronization of estrus in virgin beef heifers using melengestrol acetate and PGF_{2α}: an efficacy comparison of cloprostenol and dinoprost tromethamine. *Theriogenology* 2002;57:853-58.
- [6] Etherington, W.G.; Kelton, D.F.; Adams, J.E. Reproductive performance of dairy cows following treatment with fenprostalene, dinoprost, or cloprostenol between 24 and 31 days post partum: a field trial. *Theriogenology* 1994;42:739-52.
- [7] Stevenson, J.S.; Phatak, A.P. Rates of luteolysis and pregnancy in dairy cows after treatment with cloprostenol or dinoprost. *Theriogenology* 2010;73:1127-38.

- [8] Pursley, J.R.; Martins, J.P.N.; Wright, C.; Stewart, N.D. Compared to dinoprost tromethamine, cloprostenol sodium increased rates of estrus detection, conception and pregnancy in lactating dairy cows on a large commercial dairy. *Theriogenology* 2012;78:823-29.
- [9] Tsai, S.J.; Wiltbank, M.C. Prostaglandin F_{2α} regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biology of Reproduction* 1998;58:346-52.
- [10] Acosta, T.J.; Yoshizawa, N.; Ohtani, M.; Miyamoto, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F_{2α} injection in the cow. *Biology of Reproduction* 2002;66:651-58.
- [11] Nascimento, A.B.; Souza, A.H.; Keskin, A.; Sartori, R.; Wiltbank, M.C. Lack of complete regression of the day 5 corpus luteum after one or two doses of PGF_{2α} in non lactating holstein cows. *Theriogenology* 2014;81:389-95.
- [12] Trevisol, E.; Ferreira, J.C.; Ackermann, C.L.; Destro, F.C.; Marques Filho, W.C.; Carmagos, A.S.; Biehl, M.V.; Amaral, J.B.; Pantoja, J.C.F.; Sartori, R.; Ferreira, J.C.P. Luteal changes after treatment with sub-luteolytic doses of prostaglandin (cloprostenol sodium) in cattle. *Animal Reproduction Science* 2015;153:8-12.
- [13] Meira, C.; Pessoa, V.M.; Ferreira, J.C.P.; Araujo, G.H.M.; Gioso, M.M.; Bicudo, S.M.; Oba, E.; Orlandi, C. Alternative low doses and routes of administering a prostaglandin F_{2α} analogue to induce luteolysis in Nelore cows. *Journal of Veterinary Science* 2006;7:387-90.
- [14] Granados-Villarreal, L.M.; Zarco, L.; Mejía, O.; Sánchez-Torres, M.T.; Pablos-Hach, J.P. Luteolytic efficiency of reduced doses of cloprostenol in the ewe. Effect of progesterone concentrations at the time of treatment. *Animal Reproduction Science* 2017;186:68–76.
- [15] Cachapuz, J.M.S. Experiências com o desmame aos 60 e 90 dias. *EMATER* 1997;1-52.
- [16] Pugliesi, G.; Rezende, R.G.; Silva, J.C.B.; Lopes, E.; Nishimura, T.K.; Baruselli, P.S.; Madureira, E.H.; Binelli, M. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2017;41:140-50.
- [17] Bertolo, P.H.L.; Conceição, M.E.B.A.M.; Moreira, P.R.R.; Souza, D.C.; Rozza, D.B.; Cipriano, R.S.; Amoroso, L.; Vasconcelos, R.O. Immunodetection of *Leishmania infantum* in the subungual área of dogs with visceral leishmaniasis. *Journal of Veterinary Healthcare* 2019;2:1-10.
- [18] Melo-Júnior, M.R.; Araújo-Filho, J.L.S.; Machado, M.C.F.P.; Patu V.J.R.M.; Machado, C.B.; Pereira, W.C.A.; Meziri, M.; Laugier, P. Análise digital de imagens em patologia – a interface com Engenharia Biomédica. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica* 2006;22:239-42.
- [19] El-Sherry, T.M.; Senosy, W.; Mahmoud, G.B.; Wasfy, S.I. Effect of dinoprost and cloprostenol on serum nitric oxide and corpus luteum blood flow during luteolysis in ewes. *Theriogenology* 2013;80:513–18.

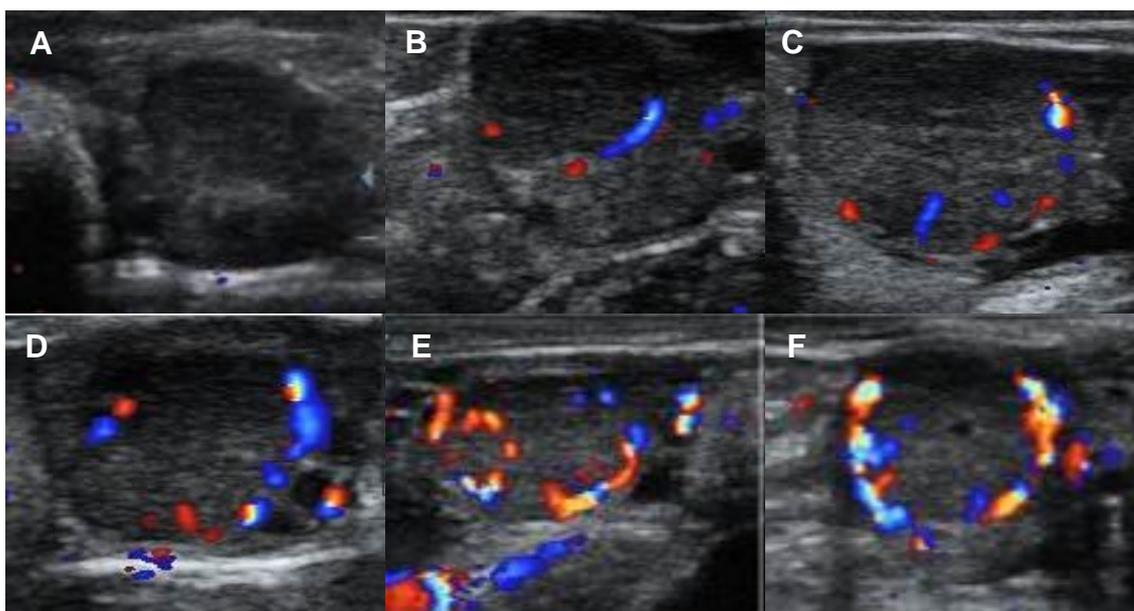
- [20] Martins, J.P.N.; Policelli, R.K.; Neuder, L.M.; Raphael, W.; Pursley, J.R. Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin $F_{2\alpha}$ of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. *Journal Dairy Science* 2011;94:2815-24.
- [21] Castro Ferraz Junior, M.V.; Pires, A.V.; Biehl, M.V.; Dos Santos, M.H.; Polizel, D.M.; De Deus Nepomuceno, D.; Sartori, R.; Barreto Filho, J.B.; Da Silva Gonçalves, J.R.; Day, M.L. Luteolysis in *Bos indicus* cows on days 5 and 7 of estrous cycle with varying doses of prostaglandin $F_{2\alpha}$. *Theriogenology* 2016;86:1268–74.
- [22] Colazo, M.G.; Martínez, M.F.; Kastelic, J.P.; Mapletoft, R.J. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. *Animal Reproduction Science* 2002;72:47–62.
- [23] Ginther, O.J.; Silva, L.A.; Araujo, R.R.; Beg, M.A. Temporal associations among pulses of 13,14-Dihydro-15-keto-PGF $_{2\alpha}$, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biology of Reproduction* 2007;76:506-13.
- [24] Rovani, M.T.; Barreta, M.H.; Ferreira, R.; Gasperin, B.G.; Antoniazzi, A.Q.; Festugatto, R.; Oliveira, J.F.C.; Gonçalves, P.B.D. Luteolysis after the intravulvosubmucosal injection of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in cattle: Systemic or local mechanism? *Livestock Science* 2012;148:60-66.
- [25] Niswender, G.D.; Juengel, L.J.; Silva, P.J.; Rollyson, M.K.; McIntush, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews* 2000;80:1-29.
- [26] Nishimura, R.; Komiyama, J.; Tasaki, Y.; Acosta, T.J.; Okuda, K. Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction* 2008;78:529-536.
- [27] Siqueira, L.G.B.; Torres, C.A.A.; Amorim, L.S.; Souza, E.D.; Camargo, L.S.A.; Fernandes, C.A.C.; Viana, J.H.M. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Animal Reproduction Science* 2009;115:18-28.
- [28] Shrestha, H.K.; Ginther, O.J. Increase in progesterone and luteal blood without a luteolytic response after prostaglandin $F_{2\alpha}$ treatment in early luteal-phase heifers. *Animal Reproduction Science* 2011;124:7-11.
- [29] Valdecabres-Torres, X.; Larrosa-Morales, P.; Cuervo-Arongo, J. The effect of dose and type of cloprostenol on the luteolytic response of dairy cattle during the ovsynch protocol under different oestrus cycle and physiological characteristics. *Reproduction in Domestic Animals* 2013;48:874-80.
- [30] Sakamoto, K.; Miwa, K.; Ezashi, T.; Okuda-Ashitaka, E.; Okuda, K.; Houtani, T.; Sugimoto, T.; Ito, S.; Hayaishi, O. Expression of mRNA encoding the prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptor in bovine corpora lutea throughout the oestrus cycle and pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 1995;103:99-105.

- [31] Shirasuna, K.; Akabane, Y.; Beindorff, N.; Nagai, K.; Sasaki, M.; Shimizu, T.; Bollwein, H.; Meidan, R.; Miyamoto, A. Expression of prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) receptor and its isoforms in the bovine corpus luteum during the estrous cycle PGF_{2α}-induced luteolysis. *Domestic Animal Endocrinology* 2012;43:227-38.
- [32] Miyamoto, A.; Shirasuna, K.; Sasahara, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. *Domestic Animal Endocrinology* 2009;37:159-69.
- [33] Viana, J.H.M.; Arashiro, E.K.N.; Siqueira, L.G.B.; Ghetti, A.M.; Areas, V.S.; Guimarães, C.R.B.; Palhão, M.P.; Camargo, L.S.A.; Fernandes, C.A.C. Doppler ultrasonography as a tool for a ovarian management. *Animal Reproduction* 2013;10:215-222.
- [34] Ghetti, A.M.; Brandão, F.Z.; Siqueira, L.G.B.; AREAS, V.S.; Arashiro, E.K.N.; Fernandes, C.A.C.; Palhão, M.P.; Viana, J.H.M. Comparison of objective and subjective methods for evaluating the vascular pattern of the preovulatory follicle using color Doppler. *Animal Reproduction* 2012;9:657.
- [35] Korzekwa, A.J.; Lukasik, K.; Pilawski, W.; Piotrowska-Tomala, K.K.; Jaroszewski, J.J.; Yoshioka, S.; Okuda, K.; Skarzynski, D.J. Influence of prostaglandin F_{2α} analogues on the secretory function of bovine luteal cells and ovarian arterial contractility in vitro. *The Veterinary Journal* 2014;199:131–37.
- [36] Stocco, C.; Telleria, C.; Gibori, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine Reviews* 2007;28:117-149.

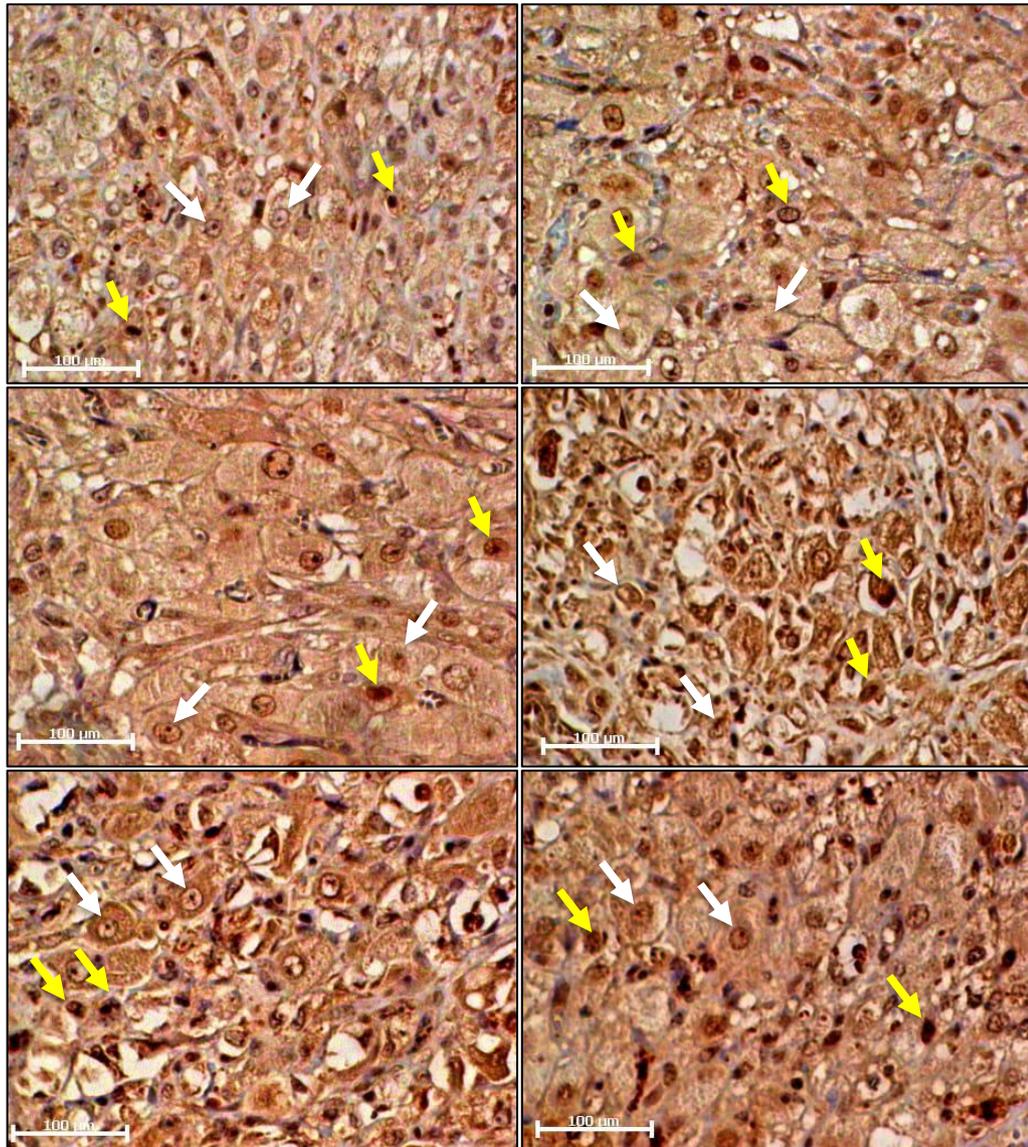
7. APÊNDICE

ANEXO I - ESCORES DE VASCULARIZAÇÃO CENTRAL E PERIFÉRICA DO CL

Durante as avaliações realizadas não foram observados CLs com escore 4 para vascularização periférica e escores 3 e 4 para vascularização central.



Imagens ilustrativas de CLs apresentando diferentes escores de vascularização central e periférica: A - vascularização central escore 0 e vascularização periférica escore 0; B - vascularização central escore 0 e vascularização periférica escore 1; C - vascularização central escore 1 e vascularização periférica escore 1; D - vascularização central escore 1 e vascularização periférica escore 2; E - vascularização central escore 2 e vascularização periférica escore 2; F - vascularização central escore 2 e vascularização periférica escore 3.

ANEXO II – AVALIAÇÃO DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS

Imagens ilustrativas demonstrando exemplos de células luteais com imunomarcacão positiva (ponta das setas amarelas) e negativa (ponta das setas brancas) para caspase-3.