

Gustavo Henrique Marques Araujo

**Efeito do tratamento com extrato de pituitária
ou FSH purificado eqüino sobre a concentração
plasmática de progesterona durante a luteólise
induzida em éguas.**

Dissertação

Mestrado

Botucatu

2006

Gustavo Henrique Marques Araujo

Efeito do tratamento com extrato de pituitária ou FSH purificado eqüino sobre a concentração plasmática de progesterona durante a luteólise induzida em éguas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Unesp, Campus de Botucatu, para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Cezinande de Meira

Botucatu – SP

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Araújo, Gustavo Henrique Marques.

Efeito do tratamento superovulatório com extrato de pituitária ou FSH purificado eqüino sobre a concentração plasmática de progesterona durante a luteólise induzida com dinoprost trometamina em éguas / Gustavo Henrique Marques Araujo. – 2006.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

Orientador: Cezinande de Meira

Assunto CAPES: 50504002

1. Eqüino -Reprodução

CDD 636.10896

Palavras-chave: Égua; EPE, FSH, LH; Luteólise; Progesterona

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Roberto Araujo e Neusa Maria Marques Araujo, que primeiramente me deram a vida, o bem mais precioso, e, que incansavelmente se superaram em todos os momentos para que eu alcançasse meus sonhos.

Ao meu irmão Guilherme que no seu imenso altruísmo nunca mediu esforços para me apoiar.

Amo vocês.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por todas as graças que tem me concedido na minha vida, obrigado Senhor.

Ao meu Orientador Professor Dr. Cezinande de Meira pela amizade, por todos conhecimentos transmitidos, e pela compreensão tanto como orientador quanto como pessoa. E à sua família: Ivone, Vinícius e Janaína, que sempre me acolheram de braços abertos e carinho.

Ao Professor Dr. Marco Alvarenga pela sua presteza em todos momentos de necessidade e pela experiência profissional que sempre me passou sem a qual não estaria aqui hoje, e aos seus alunos de pós-graduação Márcio Teoro do Carmo e Milena Machado pela coleta de dados e controle das éguas que tornaram possível a execução dessa dissertação.

Ao DRARV da FMVZ/UNESP – Botucatu, pelo apoio. A todos os colegas do departamento, pelo apoio e pela palavra amiga transmitida na convivência.

Aos professores João Carlos P. Ferreira e Maria Denise Lopes pelas contribuições no exame de qualificação.

Aos professores Papa, Sony, Eunice, Denise, Fernanda, João e Nereu do DRARV da FMVZ/UNESP – Botucatu pelo incentivo e exemplo profissional.

Aos funcionários Cristina, Valter, Edílson, Marquinhos, Marcio e “Tico” pela dedicação em todas as atividades solicitadas.

A Luciana Pizzani pela Revisão Bibliográfica e a Selma pela elaboração da ficha catalográfica.

A banca examinadora deste trabalho pelas sugestões importantes para a redação final desta dissertação.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos amigos de Pós-graduação: Annelise, Alexandre “Xandão”, Karina e Berbeque, Camila e Zé Dell’Aqua, Marilu, Adriano, Edmilson, João “Doidão”, Danilas, Vivi, Fabiana, Ian, Marilú e André pelos momentos alegres que passamos juntos.

Aos colegas que sempre colaboraram muito comigo: Márcio Teoro do Carmo, Antônio Sylvio, Zé Dell’Aqua, Edilson de Paula Lopes, Rafael Guedes Goreti e Alexandre Rocha. O companheirismo e a troca de conhecimento sempre vão enriquecer minha vida.

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta.”

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço a você Carla Fredrichsen Moya, companheira inseparável, minha outra metade, que me trouxe equilíbrio na vida. Com você nenhum obstáculo é impossível de se superar.

Te amo!

RESUMO

Estudos sobre a luteólise os fatores que a influenciam foram conduzidos em diferentes espécies de interesse econômico, recentemente, verificou-se a influência do LH sobre a luteólise ocorrida nas espécies suína e bovina, mostrando sua função nestas espécies. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de se avaliar o efeito do LH sobre as concentrações plasmáticas de progesterona durante a luteólise induzida com dinoprost, usou diferentes tratamentos superovulatórios como modelos que simularam ambientes com concentrações plasmáticas de LH distintas. Sete éguas foram divididas e utilizadas uma vez em cada um dos seguintes 4 grupos: Grupo 01 (n=6): controle que recebeu a aplicação de 5 mg de dinoprost, IM no 7º dia após a ovulação (dia 0); Grupo 02 (n=7): recebeu aplicação de 5 mg de dinoprost no dia 0 e EPE doses constantes (25mg/IM/b.i.d.) do dia 0 até o dia 3; Grupo 03 (n=7): recebeu aplicação de 5 mg de dinoprost no dia 0 e EPE doses decrescentes (40 mg/IM. no dia 0, 35 mg/IM/b.i.d. no dia 1, 30 mg/IM/b.i.d no dia 2; e, no dia 3, 25 mg/IM/b.i.d); Grupo 04 (n=5): FSH purificado eqüino (eFSH), aplicação de 5 mg de dinoprost no dia 0 e eFSH (12,5 mg/IM/b.i.d.) até o dia 3. As coletas de sangue foram realizadas dia -1 ao dia 3 dos tratamentos para as dosagens hormonais de progesterona (P4) e LH por radioimunoensaio. No dia -1 não foi observada qualquer diferença entre os grupos, indicando iguais condições dos grupos no momento do início dos tratamentos. A luteólise ($P4 < 1 \text{ ng/mL}$) foi alcançada em todos os grupos em até 48 horas (dia 2) após o início dos tratamentos. Sendo observada diferenças nos valores plasmáticos de LH desde da primeira aplicação do EPE ou eFSH. Já a P4 mostrou diferença a partir dia 2 com $0,61 \pm 0,10^a \text{ ng/mL}$ no Grupo 01; $0,28 \pm 0,09^b \text{ ng/mL}$ no Grupo 02; $0,25 \pm 0,23^b \text{ ng/mL}$ no Grupo 03; e, $0,45 \pm 0,42^{ab} \text{ ng/mL}$ no Grupo 04, e, no dia 3: $0,34 \pm 0,12^a$; $0,18 \pm 0,07^b$; $0,24 \pm 0,35^b$; $0,32 \pm 0,24^{ab} \text{ ng/mL}$, respectivamente. O que foi correlacionado negativamente com os valores de LH de cada grupo. Demonstrou-se, então, um efeito negativo dos altos níveis de LH plasmático sobre a luteólise, evidenciado pelas diferenças na P4 plasmática.

Palavras chave: LH, progesterona, EPE, eFSH, luteólise, égua.

ABSTRACT

Researches has been conducted about luteolysis and other factors that affect in some way the lifespan of the corpus luteum in different species, recently, has been shown the effect of the LH on the luteolysis in swine and bovine specie, demonstrating its function in this species. The aim of the present study was to evaluate the effect of the LH concentrations on the progesterone levels during the induced luteolysis with dinoprost, using as a model for different LH concentrations environments the superovulatory treatment with EPE and purified equine FSH. Seven mares were divided and utilized once in all 4 groups: Group 01 (n=6): control, 5 mg of dinoprost, IM in the seventh day after the ovulation (day 0); Group 02 (n=7): 5 mg of dinoprost, IM in the seventh day after the ovulation (day 0) and EPE in constant doses till day 3; Group 03 (n=7): 5 mg of dinoprost, IM in the seventh day after the ovulation (day 0) and EPE in decreased doses (40 mg/IM in day 0, 35 mg/IM/b.i.d. in day 1, 30 mg/IM/b.i.d. in day 2, and, 25 mg/IM/b.i.d. in day 3); Group 04 (n=5): equine purified FSH, 5 mg of dinoprost, IM in the seventh day after the ovulation (day 0) and 12.5 mg/IM/b.i.d. of eFSH until day 3. The blood samples have been taken from the day -1 to day 3 daily with the objective of evaluated LH and progesterone levels. In the day -1, no differences were observed on hormones dosages among the groups, indicating the same conditions for all groups before the treatments. The luteolysis ($P4 < 1 \text{ ng/mL}$) was reached in all groups until 48 hours (day 2) after the beginning of the treatments. Differences were found among the plasmatic values of LH since the first treatment of EPE or eFSH. Differences were observed in P4 levels after day 2 with $0.61 \pm 0.10^a \text{ ng/mL}$ in Group 01; $0.28 \pm 0.09^b \text{ ng/mL}$ in Group 02; $0.25 \pm 0.23^b \text{ ng/mL}$ in Group 03; and, $0.45 \pm 0.42^{ab} \text{ ng/mL}$ in Group 04. In the day 3: 0.34 ± 0.12^a ; 0.18 ± 0.07^b ; 0.24 ± 0.35^b ; $0.32 \pm 0.24^{ab} \text{ ng/mL}$ respectively, which has a negative correlation with the LH concentrations. Demonstrating, in an indirect form, an effect of the high concentrations of plasmatic LH on the luteolysis, evidenced by the differences in the P4 concentrations.

Key words: LH, progesterone, EPE, eFSH, luteolysis and mare.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 01 - Representação dos valores hormonais de LH e P4 médios durante os dias analisados.....	40
Gráfico 02 - Representação dos valores médios de LH do dia -1 ao 3 dos tratamentos superovulatórios (a seta indica o início dos tratamentos), destacando somente as diferenças presentes no D3.....	41
Figura 01 - Representação esquemática das interações entre as células endoteliais e células luteais em um corpo lúteo bovino. $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina liberada, induz a vasoconstrição da vasculatura luteal resultando na hipóxia e liberação de endotelina-1 (ET-1) residentes nas células epiteliais. ET-1 inibe a biossíntese basal de progesterona das células LH-estimuladas (CLP) e das CLG diretamente via ação da endotelina -1 nos receptores ET_A adicionalmente, ET-1 altera o metabolismo do ácido aracdônico resultando em uma rede aumentada de produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e redução de luteotropinas, PGI_2 , pelas células bovinas luteais.....	26
Figura 02 - Apresentação esquemática do LH na estimulação da ciclo-oxigenase (COX-2) uterina e seus produtos, PGE e PGF, durante a fase luteal. Sob estimulação do LH, o principal produto da COX-2 é a PGF no endométrio e PGE no miométrio. Este esquema é representativo primeiramente para bovinos, embora parece ser válido também para suínos.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Média \pm desvio padrão da progesterona plasmática (ng/mL) dos diferentes grupos nos dias analisados.....	39
Tabela 02 - Média \pm desvio padrão do LH plasmático (ng/mL) dos diferentes grupos nos dias analisados.....	40

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Revisão de Literatura.....	14
2.1. Extrato de Pituitária Eqüina.....	15
2.1.1. Anatomia da Glândula Pituitária (Hipófise).....	15
2.1.2. Produção hormonal da Glândula Pituitária.....	15
2.1.3. Extração do EPE.....	16
2.1.4. Funções biológicas do LH.....	17
2.2. PGF _{2α} e Luteólise.....	20
2.3. Sinais intracelulares, regressão funcional e morfológica do CL.....	23
2.4. Correlação LH e PGF.....	28
3. Objetivo.....	31
4. Material e Métodos.....	33
4.1. Preparação do EPE.....	34
4.2. Animais.....	35
4.3. Grupos Experimentais.....	35
4.3.1 Grupo 01: Controle.....	35
4.3.2 Grupo 02: EPE Doses Constantes.....	35
4.3.3 Grupo 03: EPE Doses Decrescentes.....	36
4.3.4 Grupo 04: FSH Eqüino Purificado.....	36
4.4. Protocolos Superovulatórios.....	36
4.5. Coletas de Sangue e Ensaio Hormonais.....	37
4.6. Análise Estatística.....	37
5. Resultados.....	38
6. Discussão.....	42
7. Conclusão.....	45
8. Referências.....	47

1. INTRODUÇÃO

Na espécie eqüina, os tratamentos superestimulantes da atividade ovariana, que em sua maioria se iniciam durante o diestro, quando há altas concentrações plasmáticas de progesterona (P4), devido à presença de corpo lúteo (CL) ativo. Esse hormônio é um fator que interfere nos resultados quanto ao número de ovulações e número de dias de tratamento, sendo encarado como uma influência negativa sobre a resposta superovulatória final das drogas utilizadas, gerando, então, a necessidade de se incorporar agentes luteolíticos no início dos tratamentos, visando melhorar os seus resultados (WOODS & GINTHER, 1983).

O conhecimento dos valores plasmáticos de diversos hormônios durante o tratamento superovulatório em éguas tem sido de grande importância para se reconhecer nuances e peculiaridades hormonais inerentes a cada tipo de tratamento superovulatório. A idéia de que os tratamentos que geram as melhores respostas estimulantes têm perfis hormonais distintos, remete à importância desse conhecimento para compreender o que determina o sucesso do tratamento em conjunto com a resposta individual de cada animal e o padrão hormonal que eles originam e, se isso tem alguma discrepância indesejável com o contexto fisiológico normal do animal.

O mecanismo de luteólise induzida é bem conhecido em várias espécies, mas há uma lacuna de conhecimentos sobre fatores que podem influenciar esse evento, principalmente na espécie eqüina. A análise de níveis plasmáticos do hormônio luteinizante (LH), em conjunto com os de progesterona (P4), durante o início do tratamento superovulatório com extrato de pituitária eqüina (EPE), em doses constantes ou decrescentes, ou hormônio folículo estimulante purificado eqüino (eFSH) permite investigar se a concentração do LH plasmático influencia de alguma forma a luteólise induzida com dinoprost trometamina em éguas.

Tendo em vista a possibilidade de se utilizar os referidos tratamentos superovulatórios como modelos experimentais de diferentes concentrações de LH quando da aplicação do agente luteolítico, objetivou-se investigar o efeito desse hormônio sobre a queda da progesterona no início dos tratamentos, evento intimamente ligado à luteólise.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Extrato de Pituitária Equina

2.1.1. Anatomia da Glândula Pituitária (Hipófise)

Extensivas pesquisas sobre a hipófise existem devido à importância econômica dos processos fisiológicos que são por ela controlados como reprodução, crescimento, lactação e estresse.

A hipófise é um corpo elipsóide escuro, suspenso abaixo do hipotálamo por um pedúnculo estreito e frágil (pedúnculo hipofisário), que repousa sobre a fossa hipofisária, conhecida como *sella turcica*, no osso esfenóide no assoalho craniano, envolvida pela dura-máter, exceto onde está ligada ao assoalho do diencéfalo pelo infundíbulo (DYCE, 1996).

Durante o processo de formação da hipófise na vida embrionária, observa-se que "a pars distalis" e a "pars intermedia" se originam da bolsa de Rathke (originada do teto da cavidade oral do embrião) e que a "pars nervosa" se origina de uma evaginação do assoalho do terceiro ventrículo. Em seguida, as duas partes se fundem e formam uma glândula aparentemente única, envolvendo, então, a confluência de partes rudimentares do epitélio cerebral e da cavidade oral. A porção da glândula formada pelo tecido neural é chamada de neurohipófise e a parte oriunda da cavidade oral de adenohipófise. Esta é constituída pela *pars distalis*, *pars tuberalis* e *pars intermedia*. A *pars distalis* e *pars tuberalis* constituem o lobo anterior da pituitária, comumente chamada de pituitária anterior ou hipófise anterior. A neurohipófise consiste basicamente do lobo neural e é também chamado de pituitária posterior ou hipófise posterior (GINTHER, 1992; KAINER, 1992; DYCE, 1996).

2.1.2. Produção hormonal da Glândula Pituitária

A pituitária anterior é composta por uma população de células secretoras em conjunto com células não secretoras. Nas espécies equina e ovina estas células são observadas tanto na fase de desenvolvimento fetal quanto no crescimento pós-natal enquanto em aves são observadas apenas após a eclosão do ovo. As células secretoras são divididas de acordo com a sua produção hormonal, sendo os corticotrofos [produtores o hormônio adenocorticotropico (ACTH)], os gonadotrofos

(produtores de LH e FSH), os lactotrofos (produtores de prolactina), os somatotrofos [produtores do hormônio de crescimento (GH)] e os tireotrofos [produtores de tireotrofina (TSH)]. Além de produzir, a pituitária é responsável pelo armazenamento da ocitocina (OT) produzida pelo hipotálamo e, transportada do corpo celular, no núcleo do hipotálamo, para os terminais nervosos da pituitária posterior carregada por uma proteína (neurofisina II) atingindo o peso molecular de 20.000, o dobro de seu peso inicial (GAINÉ et al., 1985).

O LH e o FSH são hormônios glicoprotéicos que consistem de duas subunidades, α e β . A subunidade α é espécie específica e essencialmente idêntica nestes hormônios, a β parece conferir a cada hormônio sua função biológica (PIERCE & PARSONS, 1981). Essas gonadotrofinas podem ser isoladas, purificadas e seqüenciadas, possuindo cerca de 34.000 de peso molecular, como demonstrado em trabalhos iniciais com sua extração da glândula pituitária de eqüinos (BRASELTON & MCSHAN, 1970).

2.1.3. Extração do EPE

Atualmente, a metodologia utilizada para a extração dos hormônios LH e FSH do preparado bruto de pituitária eqüina segue proposta de Guillon & Combarous (1983), experimentalmente, em outras espécies, se utiliza alguns tipos de cromatografias com essa finalidade (HIYAMA et al., 1990; CHAND et al., 2005). A técnica mais empregada envolve na fase final a utilização de um sistema de filtragem por membranas de diálise que permitem a passagem de todas substâncias presentes com pesos moleculares menores que 12.000 a 14.000, o que, na espécie eqüina, garante a seleção tanto do FSH (33.200) quanto do LH (33.500). Os níveis de FSH e LH presentes no EPE variam de acordo com a partida preparada, devido à variação individual, sexo, faixa etária, estágio reprodutivo e época do ano que são coletadas as pituitárias para produção do extrato, apresentando em torno de 40% de FSH para 60% de LH (CARMO, 2003). Sendo que o EPE foi apontado como o único preparado comercialmente viável para estimular múltiplas ovulações em éguas, apesar de sua baixa e inconsistente resposta ovulatória muitas vezes atribuída à variável presença, mas sempre em quantidades significativas, do LH (THARASANIT et al., 2006). As aplicações de técnicas para purificação do FSH presente no EPE são extremamente desejáveis para minimizar a contaminação por LH. Esse

preparado enriquecido se mostrou ser tão eficiente quanto o EPE para a indução de múltiplas ovulações em éguas e para o aumento da taxa de recuperação embrionária por égua, em doses variando de 5 mg (IM, s.i.d.) a 50 mg (IM, s.i.d.), segundo alguns autores (ROSAS et al., 1998; NISWENDER et al., 2004; PERES, 2004; MACHADO, 2004). Recentemente, um trabalho tentou demonstrar a eficácia da utilização de uma fração pura de FSH recombinante humano (livre de LH), mas em conclusão ao trabalho, sem resultados de múltiplas ovulações ou embriões, atribuiu às doses empregadas a falta de estimulação obtida (THARASANIT et al., 2006).

2.1.4. Funções biológicas do LH

O LH atua nas células-alvo foliculares ligando-se a receptores específicos, que gera a ativação da proteína de membrana adenil ciclase, que aumenta a produção intracelular de AMPc (segundo mensageiro). É possível também ser translocado estimulando a produção de glicose-6-fosfato, o que vai prover NADPH para a hidroxilação de esteróides e outros propósitos biosintéticos, ainda é possível a atuação do LH ativando diretamente a RNA polimerase (ALEXANDER & IRVINE, 1992).

Os receptores de LH estão presentes nas células da teca de folículos pré-antrais e nos folículos com antro formado está presente nas células da teca bem como nas células da granulosa, a expressão desses receptores é induzida pela presença de FSH e estradiol (GINTHER, 1992). A fase final da maturação folicular e a ovulação necessitam do LH para ocorrerem, e, por esse motivo, a aplicação de substâncias semelhantes ao LH, como a gonadotrofina coriônica humana (hCG), em folículos com mais de 30-35 mm de diâmetro antecipa a ovulação por acelerar a maturação folicular. Mas, a ausência do pico de LH fisiológico não impede totalmente a ocorrência de ovulações, evento considerado normal no diestro da égua, quando as concentrações plasmáticas de LH estão baixas (EVANS et al., 1982; MONTOVAN et al., 1990).

Ainda não é bem conhecido o papel do LH durante todo o processo de desenvolvimento folicular, mas pontualmente se evidenciou seu envolvimento nesse processo e nos de maturação folicular, ovulação, formação e manutenção do corpo

lúteo e, mais recentemente, no da luteólise. Progesterona exógena foi utilizada para estudar-se o papel das gonadotrofinas na divergência das taxas de crescimento dos dois maiores folículos durante o estabelecimento da dominância folicular (GASTAL et al., 1999). Diferentes doses de progesterona foram usadas e seus efeitos sobre as concentrações séricas de LH e FSH avaliados. A administração prolongada de uma dose de 100 mg/dia de progesterona reduziu as concentrações de LH antes da divergência, sugerindo que o começo do mecanismo de divergência folicular não depende de grandes quantidades de LH. No entanto, após a divergência, este ambiente com concentrações baixas de LH causou uma diminuição nas taxas de crescimento do maior folículo. Esses resultados indicam que as concentrações circulantes de LH não estão diretamente relacionadas ao momento inicial da dominância, mas são essenciais após o estabelecimento da mesma, conforme observado em vacas (GINTHER, 2001).

Em éguas, o aumento nas concentrações de LH e a diminuição das concentrações plasmáticas de FSH durante a divergência folicular, foi estudado para determinar-se o papel do LH na produção de estradiol e inibina (BERGFELT et al., 2001). A redução das concentrações de LH a partir do dia -4 (dia 0 = divergência), no grupo tratado com progesterona exógena, retardou e limitou a elevação das concentrações de inibina e estradiol a partir dos dias -3 e -1, respectivamente. Concluiu-se que o aumento nas concentrações de LH que precede a divergência exerce um papel funcional no maior folículo, no que diz respeito à produção de estradiol e inibina. Vale salientar que esse papel parece ser crucial para a consolidação da dominância desse folículo após a divergência folicular ter ocorrido.

A utilização de antagonistas do GnRH (antarelix e cetorelix), durante o ciclo estral da égua, geraram um atraso no desenvolvimento folicular e na ovulação, aumentando o intervalo para a ovulação (WATSON et al., 2000; GUILLAUME et al., 2002).

O processo ovulatório é ativado pelo aumento nas concentrações plasmáticas de LH que inicia dramáticas mudanças bioquímicas, físicas e de expressão gênica no folículo, que culmina na ruptura folicular e liberação do oócito (KO et al., 2006). Com o LH sendo considerado um remodelador do folículo ovariano em preparação para o processo ovulatório. Mudanças foliculares que incluem a reprogramação das células da granulosa diferenciando-as para células luteínicas grandes (CLG) e das

células da teca em células luteínicas pequenas (CLP), alteração das propriedades secretórias das células do cumulus e maturação oocitária. Conti et al (2006) em revisão, incluindo estudos em outras espécies como a humana, aponta que a estimulação do folículo pré-ovulatório com o LH envolve a ativação de uma rede de fatores de crescimento epidermal (EGF). Essa ativação se dá via estimulação das células murais da granulosa via sinalização com AMPc, isso gera a expressão de fatores semelhantes ao EGF. Esses fatores de crescimento por sua vez ativam os receptores de EGF com atuação autócrina/justácrina na camada mural, ou difundida para atuar nas células do cumulus. A ativação deste último receptor (EGF) sinaliza para as células do cumulus, em conjunto com o AMPc, provocando o início da maturação nuclear do oócito e a aquisição de competência para desenvolver-se, bem como estimula a expansão do cumulus. Segundo recente trabalho, utilizando camundongos sem produção, bloqueio ou com secreção reduzida de GnRH, a aplicação de leptina após tratamento com gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) induziu ovulação nos três modelos. Esta não foi desencadeada pelo incremento nos níveis plasmático de LH, diferente do que ocorre nos camundongos normais, assim confirmado pela ausência de aumento da progesterona pós-ovulação. A leptina foi capaz de induzir hiperemia e o rompimento folicular, além da proteinase que facilita a extrusão do conteúdo folicular, indicando a participação de outros fatores nestes eventos (BARKAN et al., 2005).

O papel do LH na formação e manutenção do corpo lúteo está intimamente ligado aos pulsos associados do LH e da P4 no início da fase luteal. O proeminente pico de LH, que ocorre em éguas, com os maiores níveis sendo atingidos após a ovulação ajuda o incremento nos valores de progesterona pós-ovulação (GINTHER, 1992). Utilizando-se um antagonista do GnRH (Antarelix), que gera uma queda na produção tanto do LH quanto do FSH, no oitavo dia de diestro em éguas pôneis, observou-se uma queda significativa nos valores plasmáticos de progesterona quando comparada aos valores do grupo controle. Esses valores se mantiveram baixos até a luteólise, o tempo para a ocorrência da luteólise não foi afetado pelo tratamento, demonstrando, então, o papel do LH no controle da função do CL na espécie eqüina (WATSON et al., 2000). Ainda, recentemente, comprovou-se um efeito negativo da porção final do acréscimo de LH periovulatório sobre o estradiol

(E2) simulada pela aplicação de hCG, observou-se uma queda significativa do E2 após esta aplicação (GASTAL et al., 2006).

2.2. $\text{PGF}_{2\alpha}$ e Luteólise

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ é um ácido graxo de 20 carbonos que é sintetizado pelo endométrio a partir do ácido araquidônico pela via da cicloxigenase que envolve a prostaglandina sintetase e o complexo enzimático microsomal. A $\text{PGF}_{2\alpha}$, após sua liberação na circulação, é metabolizada seqüencialmente pelo pulmão, fígado e rim em 15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ e seu principal metabólito 15-ceto-13,14-dihidro- $\text{PGF}_{2\alpha}$ e finalmente para 11-cetotetranor $\text{PGF}_{2\alpha}$ que é excretado pela urina (GRANSTRÖM & KINDAHL, 1982; GOFF et al., 1984). Segundo esses mesmos autores a $\text{PGF}_{2\alpha}$ apresenta meia-vida extremamente curta no plasma sanguíneo (menos de um minuto), seus metabólitos, 15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ e 15-ceto-13,14-dihidro- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PGFM), tem cerca de 5 minutos de meia-vida e o 11-cetotetranor $\text{PGF}_{2\alpha}$ em torno de uma hora e meia. Esses metabólitos da $\text{PGF}_{2\alpha}$ não possuem efeitos luteolíticos e, portanto, não diminuem a concentração plasmática de progesterona (VANDERWALL et al., 2000).

A ocitocina (OT) contribui para a luteólise estimulando a secreção endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (BETTERIDGE et al., 1985). O nanopeptídeo OT é secretado a partir de células nervosas do hipotálamo via pituitária posterior e também pelo endométrio de éguas e sua meia-vida é de 6,8 minutos (GAINER et al., 1985; PACCAMONTI et al., 1999; STOUT et al., 2000; WATSON et al., 2000; HANDLER et al., 2004).

Em éguas vazias ciclando normalmente, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretada pelo endométrio entre 13 e 16 dias após a ovulação induz a regressão do CL. A concentração plasmática de P4 começa a declinar três a quatro horas após a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (STABENFELDT et al., 1981).

Na ausência da prenhez, o CL entra em regressão morfológica e funcional (MILVAE et al., 2000). Este processo, denominado luteólise, é caracterizado pela cessação da produção de progesterona e perda dos componentes celulares, incluindo redução do suprimento vascular, proliferação do tecido conjuntivo,

aumento da desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteais (CARLSON et al., 1982; PATE, 1994; MIYAMOTO, 1996).

A principal função da $\text{PGF}_{2\alpha}$ na reprodução é provocar a regressão do CL, através do processo de luteólise (TSAI & WILTBANK, 1997). Portanto, pode-se dizer que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ é responsável pelo tempo de vida do CL (SPINOSA et al., 1997) causando sua regressão morfológica e funcional (KOTWICA et al., 2002), sendo que a regressão funcional precede a regressão morfológica (VIANA et al., 1999).

Em ruminantes domésticos, somente uma pequena quantidade da $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina alcança o ovário, por difusão da veia uterina para a artéria ovariana (mecanismo denominado de contra corrente), com mais de 95% da $\text{PGF}_{2\alpha}$ sendo metabolizada a componentes inativados como a 15-ceto-13, 14-diidroprostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$, por uma única passagem pelos pulmões (FERREIRA & VANE, 1967). Em eqüinos não existe esse mecanismo de contra corrente, e sua forma de transporte até o ovário se dá eficientemente pela via sistêmica. Esses fatos explicam o motivo pelo qual a espécie bovina exige maior dosagem de agente luteínico exógeno que a eqüina para alcançar a luteólise completa (GINTHER, 1981, 1992; NISWENDER et al., 2000).

Ao alcançar o CL, o efeito luteolítico da $\text{PGF}_{2\alpha}$ resultará na associação com os receptores presentes na membrana plasmática das células luteínicas grandes (CLGs), iniciando a cascata de rotas intracelulares que resultam na luteólise e conseqüentemente levando a inibição da síntese de progesterona (ANDERSON et al., 2001). Um pulso inicial de prostaglandina, mesmo sendo de baixa magnitude, pode potencialmente iniciar os mecanismos para que as grandes células luteínicas produzam consideráveis concentrações locais de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (TSAI & WILTBANK, 1997). Isto pode explicar porque uma pequena quantidade de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina é capaz de iniciar a regressão luteal em bovinos.

Assim, dois mecanismos podem existir, em ruminantes, para a amplificação dos pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Em primeiro, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina pode estimular a liberação de ocitocina pelo CL, a qual estimula a produção de mais $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina dentro de minutos de iniciação do pulso (BAIRD, 1992). Em adição, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina pode estimular a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ intraluteal (TSAI & WILTBANK, 1997).

O decréscimo da concentração plasmática de progesterona é mais comumente devido à diminuição da capacidade esteroidogênica das células luteais individuais e do fluxo sanguíneo luteal (MILVAE et al., 1996).

Tem sido proposto, em bovinos, que o estradiol dos folículos pré-ovulatórios engatilham a liberação de ocitocina na hipófise, que estimula uma pequena quantidade de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina. Esta $\text{PGF}_{2\alpha}$ inicia uma onda de feedback positivo implicando na liberação adicional de ocitocina luteal e $\text{PGF}_{2\alpha}$ proveniente do CL e do útero. É proposto que a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ luteal amplifica o sinal luteolítico de uma maneira autócrina ou parácrina. Adicionalmente, a ocitocina liberada pela ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ adere aos receptores causando um aumento da atividade da proteína quinase C (NISWENDER et al., 2000).

Hansel & Blair (1996) comentam que a ocitocina hipofisária desempenha um papel secundário na regressão dos CLs bovinos. Isto porque, com base na microdiálise *in vivo*, estes pesquisadores observaram que a regressão luteal parece ocorrer normalmente, na ausência de concentrações mensuráveis de ocitocina.

Entretanto, apesar da intensa investigação sobre o real mecanismo pelo qual a $\text{PGF}_{2\alpha}$ causa regressão luteal, este ainda permanece indeterminado tanto em bovinos quanto para a espécie eqüina (MILVAE, 2000).

2.3. Sinais intracelulares, regressão funcional e morfológica do CL.

Embora a $\text{PGF}_{2\alpha}$ possa iniciar a luteólise funcional, mecanismos adicionais parecem ser necessários para a luteólise completa. A luteólise é um evento contínuo, e a distinção entre mudanças funcionais e estruturais faz-se necessário para entender o processo como um todo. As grandes células luteínicas provavelmente respondem inicialmente ao sinal luteolítico, mas as comunicações entre grandes e pequenas células, bem como entre células luteais e não luteais, parecem ser requeridas para a regressão completa se proceder (PATE, 1994; SPINOSA et al., 1997).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ atua pela adesão a receptores específicos localizados nas CLGs (ANDERSON et al., 2001) onde se unem à proteína G estimulatória, induzindo a ativação da fosfolipase C (PLC). A PLC, por sua vez, catalisa a hidrólise do inositol trifosfato (IP_3) e do diacilglicerol (DAG). O aumento das concentrações citosólicas

de IP_3 resultam na liberação de cálcio livre do retículo endoplasmático liso para o compartimento citoplasmático. Este aumento de cálcio e do DAG (localizado na membrana plasmática) estimula a atividade catalítica da enzima Ca^{+2} - dependente proteína quinase C (PKC, também localizada na membrana plasmática). Acredita-se que a PKC medeia muitas ações anti-esteroidogênicas da $PGF_{2\alpha}$ nas CLGs (NISWENDER et al., 2000).

A inibição da síntese de progesterona pela $PGF_{2\alpha}$ se dá por: feedback negativo dos receptores para hormônios luteotrópicos; diminuição na distribuição de colesterol no interior celular e diminuição do transporte de colesterol para o interior da membrana mitocondrial (JUENGEL et al., 1995). Ainda sobre a luteólise, não foram encontrados receptores de alta afinidade para a $PGF_{2\alpha}$ nas células luteínicas pequenas (CLP) ovinas e o tratamento de CLP com $PGF_{2\alpha}$ não afetou a secreção de progesterona (NISWENDER et al., 2000).

Sobre a regressão morfológica, pesquisas têm sido focadas sobre a possibilidade da regressão luteal ocorrer por processos degenerativos de apoptose. Há evidências morfológicas que as células não esteroidogênicas (células não luteais) presentes no CL sofrem apoptose, possivelmente iniciado por hipóxia (NISWENDER et al., 1990).

Recentes estudos têm demonstrado que as células endoteliais e seus produtos, como a Endotelina-1 (ET-1), são requeridos para a manifestação dos efeitos luteolíticos da $PGF_{2\alpha}$ (MILVAE, 2000; PATE & KEYES, 2001). Esta proteína atua como um potente vasoconstritor (Figura 01), inibe a atividade esteroidogênica, reduz o fluxo sanguíneo durante a luteólise inicial pela constrição arteriolar, leva à hipóxia, e por conseguinte a apoptose das células (MILVAE et al., 1996; MILVAE, 2000; PATE & KEYES, 2001).

A ET-1, que é produzida pelas células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos, apresenta receptores específicos nas CLGs e CLPs (MILVAE, 2000) e desempenha um papel crucial durante a luteólise induzida pela $PGF_{2\alpha}$ (LEVY et al., 2000), agindo como um mediador/promotor luteolítico local na regressão do CL (OHTANI et al., 1998). Estas condições sugerem que a $PGF_{2\alpha}$ e a ET-1 são importantes na rápida cascata funcional da luteólise “*in vivo*” com uma possível

interação entre as células endoteliais e luteais durante a regressão (OHTANI et al., 1998; MILVAE, 2000; MEIDAN & LEVY, 2002).

O sistema imune medeia ativamente o processo de luteólise (PATE & KEYES, 2001). As células imunológicas (macrófagos e linfócitos T) produzem citocinas como o interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$), fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e interleucina- β ($\text{IL}\beta$ -1) que podem modificar a síntese de progesterona e prostaglandinas pelas células luteais. Podem também apresentar efeitos citotóxicos diretos, onde as células luteais mortas são fagocitadas pelos macrófagos (MIYAMOTO, 1996; PATE, 1996).

Também, fatores secretados pelas células presentes no CL (endoteliais, esteroidogênicas, macrófagos) como o complexo de histocompatibilidade maior (MHC), pode servir como quimiostáticos para as células linfocíticas (PATE, 1996).

Adicionalmente, a proteína quimioatratante de monócitos 1 (MCP-1) também está envolvida. As células fontes de MCP-1 são as endoteliais, que estão em abundância no corpo lúteo tardio. Esta proteína está associada com o aumento da infiltração de macrófagos nas células luteais indicando que a MCP-1 pode atuar como mediador durante a luteólise (PENNY, 2000).

Portanto, a principal função das células imunes no CL, neste estágio, é a fagocitose levando a luteólise estrutural (MIYAMOTO, 1996). As células imunológicas produzem citocinas que podem modificar a síntese de progesterona e prostaglandinas pelas células luteais. Podem também apresentar efeitos citotóxicos diretos, e as células mortas são fagocitadas pelos macrófagos. Além disso, fatores secretados pelas células luteais podem servir como quimiostáticos para as células imunes, aumentando ou suprimindo suas funções (PATE, 1996).

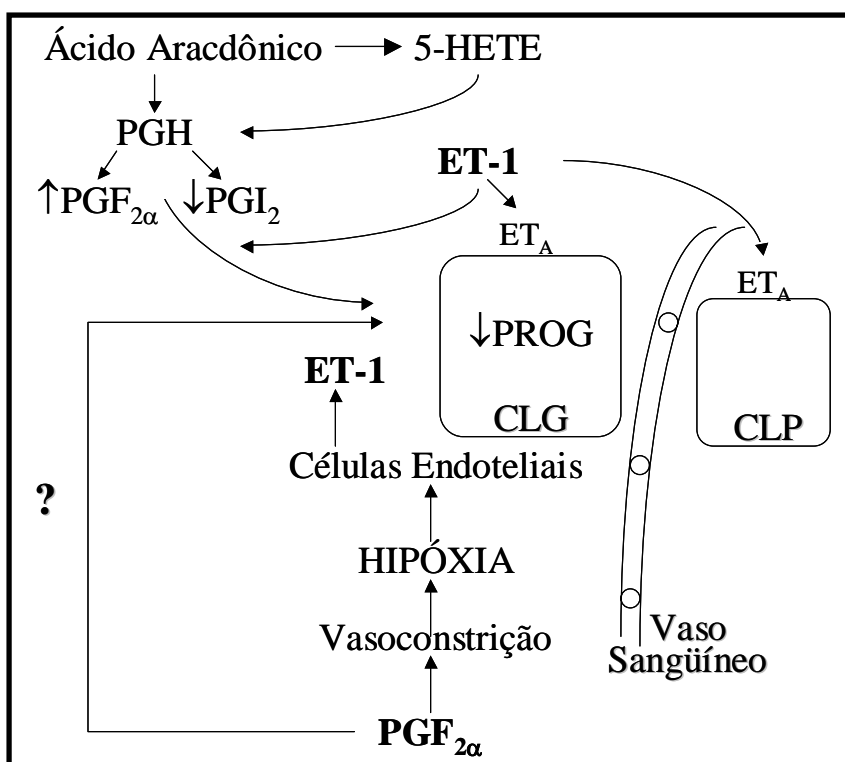


Figura 01: Representação esquemática das interações entre as células endoteliais e células luteais em um corpo lúteo bovino. $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina liberada, induz a vasoconstrição da vasculatura luteal resultando na hipóxia e liberação de endotelina-1 (ET-1) presentes nas células epiteliais. ET-1 inibe a biossíntese basal de progesterona das células LH-estimuladas (CLP) e das CLG diretamente via ação da endotelina -1 nos receptores ET_A adicionalmente, ET-1 altera o metabolismo do ácido aracádônico resultando em uma rede aumentada de produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e redução de luteotropinas, PGI_2 , pelas células bovinas luteais. Fonte: modificado de Milvae et al. (1996).

A função dos macrófagos durante a regressão, parece ser primariamente a fagocitose de células luteais degeneradas e a degradação da matriz extracelular. Porém, os macrófagos perfazem três funções durante os estágios iniciais da luteólise: além da fagocitose de células degenerativas luteais; trabalham na inibição citocina-mediada da esteroidogênese e estimulação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo CL. Resumidamente, células imunológicas e citocinas também parecem desempenhar um papel na luteólise regulando a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, esteroidogênese e fagocitose (NISWENDER et al., 2000).

Além destas mudanças estruturais relatadas acima, no CL em regressão, há aumento dramático de metaloproteinases-1 e 2, que estão envolvidas no remodelamento dos tecidos e neste caso, podem envolver a morte ordenada do CL (FIELDS & FIELDS, 1996).

Ainda, componentes oxigênio-reativos são integralmente envolvidos na luteólise e apoptose, onde os radicais ânion superóxido, hidroxil e peróxido de hidrogênio são as primeiras espécies reativas geradas nas células esteroidogênicas (HORNSBY & CRIVELLO, 1983). Os efeitos potencialmente tóxicos destas substâncias são atenuados pelas vitaminas antioxidantes (RUEDA et al., 1995).

Em resumo, a $PGF_{2\alpha}$ causa diminuição do fluxo sanguíneo ao ovário e também há a queda na produção de progesterona. Parece que o processo de luteólise pode ser primeiramente iniciado pela interação da $PGF_{2\alpha}$ com receptores específicos localizados na membrana plasmática das grandes células (via proteína kinase C/segundo mensageiro que diminuirá a esteroidogênese). Adicionalmente, as ações combinadas da $PGF_{2\alpha}$, a liberação de ocitocina local bem como a ET-1 podem levar a vasoconstrição, isquemia, hipóxia, quimiotaxia de células imunológicas e a seguir, a redução dos níveis de progesterona. Esta hipóxia e isquemia levariam não somente a diminuição da secreção de progesterona, mas também a apoptose das células não luteais, primeiramente em células endoteliais, depois parenquimais e por último nos fibroblastos (PATE, 1996).

Niswender et al. (1990) estudando luteólise em ovelhas concluíram que 1) luteólise é iniciada por uma ação direta da $PGF_{2\alpha}$ nas grandes células luteais; 2) a diminuição dos níveis circulantes de progesterona reflete uma combinação da redução da esteroidogênese e do fluxo sanguíneo luteal; 3) o estímulo primário para a apoptose nas células parênquimais, fibroblastos e células endoteliais é a hipóxia, devido a isquemia provocada por uma vasoconstrição e oclusão vascular, seguido de liberação de células endoteliais para o interior do lúmen dos pequenos vasos sanguíneos.

2.4. Relação LH e PGF

É vastamente conhecido que a $PGF_{2\alpha}$ liberada no útero é proveniente da ativação da ocitocina luteal via fosfolipase C, PLC, (BURNS et al., 1997). Porém,

outra linha de pesquisadores cita que as gonadotrofinas participam ativamente no desencadeamento da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio. Isto porque receptores para gonadotrofinas têm sido encontrados por toda a extensão do trato reprodutivo, como no endométrio, sendo que as maiores concentrações destes receptores foram mensuradas durante a fase luteal (SHEMESH, 2001).

Evidenciou-se, então, em 2001, o papel do LH sobre o mecanismo da luteólise de suínos e bovinos. Um trabalho demonstrou a relação direta entre os níveis de LH plasmático e o metabólito da prostaglandina 13,14-dihidro-15-ceto $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PGFM), em porcas. Assim que se observava um pico no LH plasmático também se observava um aumento plasmático de PGFM, mais evidente em marrãs, e observou o efeito da aplicação de gonadotrofina coriônica humana (hCG) aumentando a PGFM plasmática no fim do diestro (ZIECIK & KOTWICA, 2001). Em vacas mostrou-se um aumento 2,5 vezes superior de PGFM nos animais tratados com hCG que os do grupo controle. Esse mesmo trabalho indicou a ação direta do hCG sobre o AMPc e o inositol fosfato total nas células do endométrio, estimulando uma maior produção de prostaglandina H sintetase 2 (PGH-2), assim como ocorre na estimulação ovariana pelo LH (SHEMESH et al., 2001).

Desta maneira, o LH (não relacionado ao pico pré-ovulatório) alcança os receptores endometriais, induzindo um aumento da produção de AMPc e inositol fosfato. Esta elevação da concentração de segundo mensageiro (AMPc), desencadeia o aumento das concentrações de cicloxigenase endometrial (COX-2) e seu metabólito ($\text{PGF}_{2\alpha}$, Figura 02). Além destas informações, Stepien et al. (1999) comentam que há uma relação temporal entre o aumento das concentrações de receptores de LH, indução da COX-2 e produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas células endometriais em suínos.

Em éguas, foi demonstrado o efeito luteolítico induzido pela aplicação sistemática de hCG, que inclui a utilização dessa droga até para indução de abortamento, antes da formação dos cálices endometriais e produção de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG), originalmente esse evento foi relacionado ao aumento dos níveis plasmáticos de estradiol estimulados pelo hCG (GINTHER, 1992).

Muitos trabalhos conflitantes são encontrados na literatura sobre a manutenção da vida do CL, evitando a luteólise, através da aplicação de hCG dos dias 11 ao 16 do ciclo estral (dia 0 = ovulação), ou EPE dos dias 9 ao 17. Observou-se inicialmente no grupo do hCG um atraso na luteólise (dia 17 vs dia 13 do controle), e no grupo do EPE não se observou a luteólise. Experimentos subsequentes usando os mesmos esquemas não obtiveram os mesmos resultados evidenciando-se uma inconsistência de resposta dessas drogas para a finalidade proposta (GINTHER, 1992). A mesma inconstância de resultados foi obtida quando realizados experimentos *in vitro*, em que se propunha estimular a produção de P4 pelas células luteais administrando LH purificado eqüino (eLH) ou hCG (CONDON et al., 1979; KELLY et al., 1988; WATSON & SERTICH, 1990).

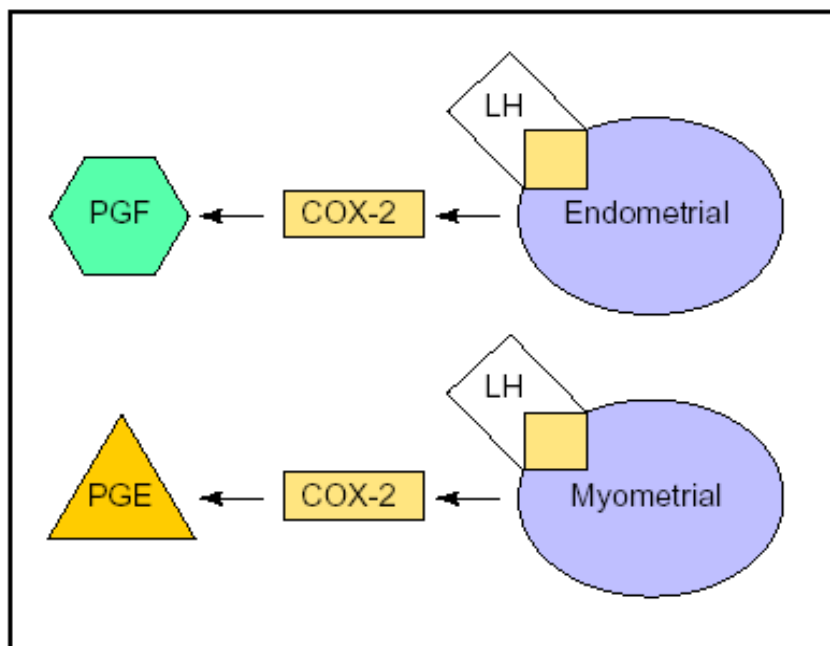


Figura 02: Apresentação esquemática da função do LH na estimulação da ciclo-oxigenase (COX-2) uterina e seus produtos, PGE e PGF, durante a fase luteal. Sob estimulação do LH, o principal produto da COX-2 é a PGF no endométrio e PGE no miométrio. Este esquema é representativo primeiramente para bovinos, embora parece ser válido também para suínos. Fonte: modificado de Shemesh (2001).

OBJETIVO

3. OBJETIVO

A análise de níveis plasmáticos do hormônio luteinizante (LH), em conjunto com os de progesterona (P4), durante o início do tratamento superovulatório com extrato de pituitária eqüina (EPE), em doses constantes ou decrescentes, ou hormônio folículo estimulante purificado eqüino (eFSH) permite investigar se a concentração do LH plasmático influencia de alguma forma a luteólise induzida com dinoprost trometamina em éguas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado junto ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ - UNESP, Botucatu-SP.

4.1. Preparação do EPE

As pituitárias foram adquiridas no abatedouro de eqüinos Pomar Ltda., localizado na cidade de Araguari-MG. Sua remoção se deu por um corte oblíquo caudo-cranial na região caudal ao pavilhão auricular e mandíbula. Esse procedimento permitiu a remoção do encéfalo e visualização da pituitária alojada na fossa hipofisária, da qual foi removida com auxílio de uma espátula.

As pituitárias extraídas foram lavadas com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e armazenadas por conjuntos diários em pacotes plásticos a uma temperatura conservante de - 20°C por duas semanas, quando foram transportadas, em caixas térmicas com gelo seco, para o laboratório de endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ – UNESP de Botucatu, onde foram processadas.

O extrato bruto foi preparado seguindo metodologia de Guillou & Combarous (1983), modificada (CARMO, 2003). Que, após a descongelação, incluiu a lavagem em água destilada/deionizada, seguida pela trituração em liquidificador doméstico com uma solução a 40% de etanol e 6% de acetato de amônia. A fração ativa foi precipitada e ressuspensa em etanol 80%, filtrada em membrana de diálise, liofilizada e conservada a -20°C até sua diluição em solução fisiológica (10 mg/mL) para aplicação nas éguas dos grupos experimentais, qualquer excedente da solução final diluída foi armazenado, para reutilização, por no máximo sete dias em refrigerador (5°C).

Parte da porção liofilizada foi enviada para a Universidade da Califórnia em Davis, EUA, onde foi realizada a dosagem de LH e FSH presente na partida usando a técnica de radioimunoensaio (RIA), devidamente padronizada para a espécie eqüina.

4.2. Animais

Utilizaram-se 7 éguas mestiças, saudáveis, com idade variando de 4 a 16 anos, peso variando de 400 a 500 kg e com históricos reprodutivos normais, em duas estações distintas. Nessas duas estações reprodutivas as éguas ficaram alojadas nas dependências do Centro de Reprodução Eqüina da Fazenda Lageado - UNESP, localizado no município de Botucatu (LAT. 22°S e LONG. 48°W), no estado de São Paulo. As éguas foram mantidas em piquete com acesso livre ao bebedouro coletivo e suplementação mineral. Foi fornecida ração balanceada enriquecida com vitaminas no cocho duas vezes ao dia e o feno de coast-cross (*Cynodon dactylon*) duas vezes ao dia.

4.3. Grupos Experimentais

As 7 éguas foram distribuídas entre os grupos, sendo tratadas uma vez em cada grupo, minimizando o efeito individual de cada tratamento, sendo divididas da seguinte forma:

4.3.1. Grupo 01: Controle (n=6 éguas)

As éguas desse grupo foram tratadas para a indução da luteólise com 5 mg de dinoprost trometamina(IM) às 18:00 horas do 7º dias após a ovulação detectada por ultra-sonografia (dia 0) e às 7:00 horas do 8º dia (com confirmação da presença do CL no dia 0 em todos os grupos).

4.3.2. Grupo 02: EPE Doses Constantes (n=7 éguas)

As éguas deste grupo tiveram a luteólise induzida com uma aplicação de 5 mg de dinoprost trometamina às 18:00 horas do 7º dias após a ovulação detectada por ultra-sonografia (dia 0) com aplicação simultânea de EPE em doses constantes de 25 mg (IM), e uma segunda aplicação às 7:00 horas do dia seguinte de ambos medicamentos, dando continuidade, então, somente ao tratamento com EPE em doses constante.

4.3.3. Grupo 03: EPE Doses Decrescentes (n=7 éguas)

As éguas deste grupo tiveram a luteólise induzida com uma aplicação de 5 mg de dinoprost trometamina às 18:00 horas do 7º dias após a ovulação detectada

por ultra-sonografia (dia 0) com aplicação simultânea de EPE com 40 mg (IM), e uma segunda aplicação às 7:00 horas do dia seguinte de ambos medicamentos (EPE de 35 mg/IM), dando continuidade, então, somente ao tratamento com EPE em doses decrescentes.

4.3.4 Grupo 04: FSH Equino Purificado (n=5 éguas)

As éguas deste grupo tiveram a luteólise induzida com uma aplicação de 5 mg de dinoprost às 18:00 horas do 7º dias após a ovulação detectada por ultra-sonografia (dia 0) com aplicação simultânea de eFSH¹ em doses de 12,5 mg (IM), e uma segunda aplicação às 7:00 horas do dia seguinte de ambos medicamentos, dando continuidade, então, somente ao tratamento com eFSH.

4.4. Protocolos Superovulatórios

Os tratamentos superovulatórios (grupos 2 a 4) sempre foram realizados no período da tarde assim como as coletas de sangue para as dosagens hormonais de todos os grupos. Iniciaram-se os tratamentos no 7º dia após a ovulação (dia 0), todos os tratamentos foram acompanhados por duas injeções intramusculares de dinoprost (5 mg), aplicadas 18:00 horas no dia 0 e às 7:00 horas do dia 1 (8º dia após a ovulação). O grupo 1 foi o controle experimental, no qual apenas foram aplicadas as duas doses do luteolítico; o grupo 2 (EPE - doses constantes) recebeu no dia 0 25mg/IM/b.i.d. do EPE todos os dias de tratamento; o grupo 3 (EPE - doses decrescentes) recebeu 40 mg/IM às 18:00 horas do EPE no dia 0, 35 mg/IM/b.i.d. do EPE no dia 1, 30 mg/IM/b.i.d do EPE no dia 2; e, no dia 3, 25 mg/IM/b.i.d.; o grupo 4 (eFSH - Bioniche[®]) recebeu 12,5 mg/IM/b.i.d. do eFSH durante todos os dias tratados.

4.5. Coletas de Sangue e Ensaio Hormonais

Para realizar as dosagens hormonais cumpriu-se uma rotina de coletas de sangue que se iniciaram um dia antes do início do tratamento superovulatório e prosseguiram por cinco dias (dia -1 até 3), sempre no período da tarde (18:00

¹ Bioniche Animal Health Inc., Canadá.

horas), que no Dia 0 ocorreu após os tratamentos. O sangue coletado foi centrifugado a 3.000rpm e o plasma armazenado a -18°C, e este transportado em caixas refrigeradas até a Universidade de Davis, EUA, onde as dosagens de progesterona plasmática e LH foram realizadas por radioimunoensaios devidamente padronizados para a espécie eqüina no Laboratório de Endocrinologia sob responsabilidade da Dra. Jannet Roser.

4.6. Análise Estatística

Para comparar as dosagens hormonais diárias de LH e P4 foi aplicada análise de variância (ANOVA), após os dados terem passado pelo teste de normalidade, assim que se evidenciou diferença estatística, a 0,05 de significância, foi aplicado o teste de Tukey para demonstrar quais grupos eram diferentes entre si no mesmo dia e diferenças no mesmo grupo ao longo dos dias. O decréscimo nas concentrações de progesterona ao longo dos dias foi avaliado pelo teste t. Para realizar as correlações entre os hormônios foi utilizado o teste de correlação de Pearson.

5. RESULTADOS

As concentrações de gonadotrofinas presentes na partida utilizada do EPE, dosados por RIA, foram de 493µg de LH para 331µg de FSH. Os níveis de LH no eFSH, produzido comercialmente pela Bioniche Animal Health®, não foram dosados nesse experimento e a empresa não cita essa relação no produto comercial.

Os resultados das dosagens plasmáticas de progesterona mostraram que não houve diferença quanto ao dia de luteólise ($P4 < 1$ ng/mL) entre os grupos. Havendo diferenças diárias entre os níveis de P4 a partir de 48 horas (dia 2) da aplicação do agente luteolítico (Tabela 01). Não houve diferença entre os percentuais de decréscimo de progesterona que foram de 97,55% para o controle, 98,48% para o grupo tratado com EPE em doses constantes, 97,57% para o grupo tratado com EPE em doses decrescentes e de 96,81% para o grupo tratado com o eFSH.

Tabela 01: Média \pm desvio padrão da progesterona plasmática (ng/mL) dos diferentes grupos nos dias analisados.

	Controle	EPE constante	EPE decrescente	eFSH
Dia -1	13,89 \pm 5,56 ^{Aa}	11,88 \pm 3,41 ^{Aa}	9,89 \pm 2,94 ^{Aa}	10,04 \pm 6,91 ^{Aa}
Dia 0	8,29 \pm 4,22 ^{Ba}	8,93 \pm 5,33 ^{Aa}	8,58 \pm 2,42 ^{Aa}	9,24 \pm 7,77 ^{ABa}
Dia 1	1,66 \pm 1,32 ^{Ca}	1,42 \pm 0,47 ^{Ba}	1,40 \pm 0,99 ^{Ba}	0,76 \pm 0,66 ^{BCa}
Dia 2	0,61 \pm 0,10 ^{Ca}	0,28 \pm 0,09 ^{Cb}	0,25 \pm 0,23 ^{Cb}	0,45 \pm 0,42 ^{Cab}
Dia 3	0,34 \pm 0,12 ^{Ca}	0,18 \pm 0,07 ^{Db}	0,24 \pm 0,35 ^{Cb}	0,32 \pm 0,24 ^{Cab}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna (A; B; C; D) indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$);
Letras minúsculas diferentes na mesma linha (a, b) indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$);

A progesterona plasmática atingiu um valor menor que 1 ng/mL 48 horas após a aplicação do luteolítico em todos os grupos, exceto o grupo tratado com eFSH, no qual ocorreu com 24h, tendo um índice de correlação com o valor de LH de -0,374 quando analisados todos dados em conjunto. Esse índice indica uma correlação fortemente negativa entre os valores de P4 e LH, quanto maior o valor plasmático de LH menor era o valor da P4 (Gráfico 01).

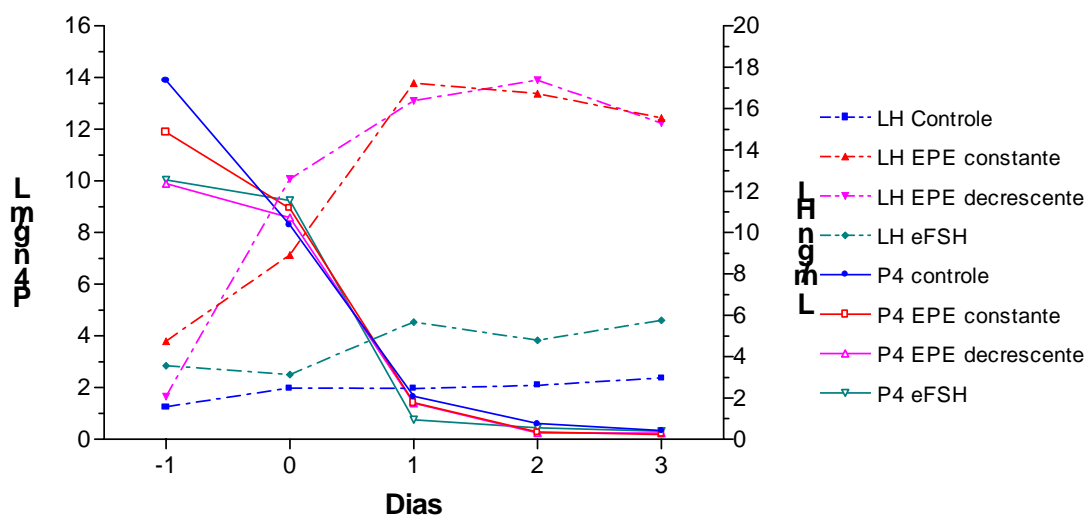


Gráfico 01: Representação dos valores hormonais de LH e P4 médios durante os dias analisados.

Os níveis plasmáticos de LH tiveram uma relação direta ao tipo do tratamento superovulatório empregado, como mostra a Tabela 02. Sendo que os grupos com aplicação dos medicamentos com maior contaminação por LH (EPE) tiveram valores superiores desse hormônio, que após o Dia 1 mantiveram um platô até o último dia analisado (dia 3), tendo a diferença entre grupos como principal achado (Gráfico 02).

Tabela 02: Média \pm desvio padrão do LH plasmático (ng/mL) dos diferentes grupos nos dias analisados.

	Controle	EPE constante	EPE decrescente	eFSH
Dia -1	1,57 \pm 0,72 ^{Aa}	4,75 \pm 2,98 ^{Ba}	2,07 \pm 1,30 ^{Ca}	3,55 \pm 2,03 ^{Ba}
Dia 0	2,48 \pm 1,97 ^{Ab}	8,92 \pm 4,0 ^{Ba}	12,59 \pm 2,47 ^{Ba}	3,13 \pm 1,46 ^{Bb}
Dia 1	2,45 \pm 1,65 ^{Ac}	17,23 \pm 5,36 ^{Aa}	16,37 \pm 3,16 ^{Aa}	5,67 \pm 1,54 ^{Ab}
Dia 2	2,61 \pm 1,36 ^{Ac}	16,72 \pm 2,57 ^{Aa}	17,37 \pm 3,99 ^{Aa}	4,79 \pm 1,26 ^{Ab}
Dia 3	2,96 \pm 1,59 ^{Ac}	15,55 \pm 3,0 ^{Aa}	15,30 \pm 2,88 ^{ABa}	5,75 \pm 1,89 ^{Ab}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna (A; B; C; D) indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$);
Letras minúsculas diferentes na mesma linha (a, b) indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$);

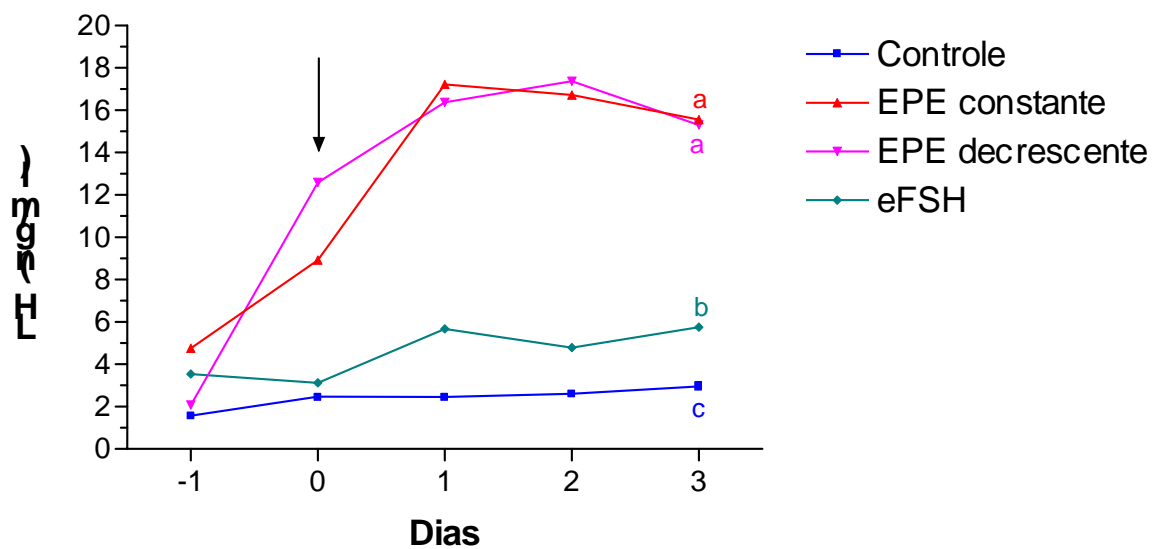


Gráfico 02: Representação dos valores médios de LH do dia -1 ao 3 dos tratamentos superovulatórios (a seta indica o início dos tratamentos), destacando somente as diferenças presentes no dia 3.

6. DISCUSSÃO

As concentrações de LH e FSH presentes no preparado do EPE estão condizentes com os altos níveis de contaminação com LH de tais produtos utilizados para superovulação na espécie eqüina (CARMO, 2003; MACHADO, 2004; ROCHA FILHO, 2005; THARASANIT et al., 2006). A contaminação por LH no preparado purificado comercial da Bioniche Animal Health[®], apesar de não dosado e não informado pela empresa, é presente, mas em níveis muito inferiores aos do EPE, evidenciado pelos valores plasmáticos de LH nos ciclos tratados. Ainda assim são estatisticamente maiores que dos animais não tratados a partir do dia 1 do tratamento, ou seja, após 3 aplicações de 12,5 mg, IM, do eFSH.

Outro ponto importante de ser salientado, já descrito na metodologia, é que as coletas de sangue para dosagens hormonais foram feitas somente no período da tarde, portanto, no momento das coletas de todos grupos no dia 0 os animais já tinham sido tratados com dinoprost (todos grupos), EPE (G2 e G3) e eFSH (G4). Motivo pelo qual já se observa uma leve queda no nível plasmático de P4 neste momento ($p > 0,05$, somente no grupo controle), de acordo com observações temporais de resposta à $PGF_{2\alpha}$ realizadas por Stabenfelt et al. (1981), e um sensível aumento nos valores plasmáticos de LH ($p < 0,05$), sendo essa diferença no LH intimamente ligada à dosagem e à droga utilizada, assim, os grupos tratados com EPE, apresentaram as concentrações mais altas de LH.

No dia -1 não foi observada qualquer diferença entre os grupos experimentais, tanto nos valores de P4 quanto nos de LH, indicando portanto que as condições fisiológicas eram semelhantes entre os grupos antes do início do tratamento e condizentes com valores encontrados na literatura para o sexto dia após a ovulação (GINTHER, 1992).

A luteólise foi alcançada em todos os grupos dentro de 48 horas da segunda aplicação do luteolítico, essa aplicação dupla teve como objetivo impossibilitar qualquer tipo de resposta anômala do CL com possível retomada dos valores de P4 plasmática. Mesma técnica foi utilizada com sucesso (dinoprost 10 mg/égua), recentemente, para indução da luteólise no terceiro dia pós-ovulação em éguas (BERGFELT et al., 2006).

A partir do momento em que se tem a luteólise, observou-se uma diferença entre os grupos quanto aos valores de P4, na qual evidenciou-se um valor maior deste hormônio no grupo controle, que nesse mesmo momento (dia 2) apresentava um valor mais baixo de LH, correlacionados negativamente durante todos os dias analisados. Essas diferenças nas concentrações de P4 ficaram ainda mais claras no dia 2 ($p < 0,001$), quando ficou evidente a inferioridade das concentrações nos grupos tratados com EPE sobre o grupo tratado com eFSH e ambos em relação ao grupo controle, seguindo a mesma linha inversa quanto às concentrações de LH. Demonstrando uma ligação íntima entre os altos valores de LH com os mais baixos valores de P4. O que mostra, indiretamente, uma ligação entre o LH plasmático e a luteólise, corroborando os dados de PGFM estimulados por hCG relatados por Shemesh et al. (2001) em bovinos e Ziecik & Kotwica (2001) em suínos. Fields & Shemesh (2004), relatam ainda a ativação de receptores uterinos de LH ao redor do dia 15 do ciclo estral de bovinos, suínos e ovinos associado ao aumento da produção de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio, evento também acompanhado em primatas e humanos, havendo uma lacuna deste conhecimento para a espécie eqüina.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Os modelos experimentais de ambientes com diferentes concentrações de LH induzidas por tratamentos superovulatórios distintos em éguas foram eficazes na demonstração dos efeitos deste hormônio sobre as concentrações plasmáticas de P4 e, conseqüentemente, correlato sobre a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio. Demonstrando indiretamente uma provável função desta gonadotrofina no processo da luteólise na espécie eqüina, já descrita em outras espécies, mas, não podendo portanto ser concluído de forma incisiva, sua real participação no evento da luteólise. Apesar disso, essas concentrações elevadas de LH não influenciaram de nenhuma forma o momento da luteólise em si.

Como o delineamento experimental não teve como objetivo básico o estudo da luteólise, espera-se que mais estudos específicos sobre a presença de receptores para LH ou seu RNAm no útero, tubas uterinas e cérvix, avaliando conjuntamente o efeito de sua estimulação com LH ou hCG sobre a produção da PGFM, precisam ser conduzidos para termos respostas mais concretas sobre a real participação do LH no processo luteínico da égua.

8. REFERÊNCIAS*

ALEXANDER, S.L.; IRVINE, C.H.G. FSH and LH. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p.45-56.

ANDERSON, L.E.; WU, Y.; TSAI, S.; WILTBANK, M.C. Prostaglandin F_{2α} receptor in the Corpus Luteum: recent information on the gene, messenger ribonucleic acid, and protein. **Biol. Reprod.**, v. 64, p. 1041-1047, 2001.

BAIRD, D.T. Luteotropic control of the corpus luteum. **Anim Reprod Sci**, v.28, p. 95-102, 1992.

BARKAN, D.; HURGIN, V.; DEKEL, N.; AMSTERDAM, A.; RUBINSTEIN, M. Leptin induces ovulation in GnRH-deficient mice. **FASEB J.**, v.19, n.1, p.133-135, 2005.

BERGFELT, D.R.; GASTAL, E.L.; GINTHER, O.J. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. **Biol. Reprod.**, v.65, p.426-432, 2001.

BERGFELT, D.R.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Regression and resurge of the CL following PGF(2α) treatment 3 days after ovulation in mares. **Theriogenology**, v.65, n.8, p.1605-1619, 2006.

BETTERIDGE, K.J.; RENARD, A.; GOFF, A.K. Uterine prostaglandin release relative to embryo collection, transfer procedure and maintenance of the corpus luteum. **Equine Vet. J.**, v.3, p.25-33, 1985.

BRASELTON, W.E.; MCSHAN, W.H. Purification and properties of follicle-stimulating and luteinizing hormone from horse pituitary glands. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.139, p.45-58, 1970.

BURNS, P.D., GRAF, G.A., HAYES, S.H, SILVIA, W.J. Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine PGF_{2α} synthesis in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A₂. **Domest Anim Endocrinol**, v. 14, p. 181-191, 1997.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

CARLSON J.A, BUHR, M., WENTWORTH, R., HANSEL, W. Evidence of membrane changes during regression in the bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v.110, p.1472-1476, 1982

CARMO, M.T. **Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária eqüina na indução de superovulação em éguas**. 2003. 156p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CHAND, H.S.; CHAUDHARY, R.; MURALIDHAR, K. A reference preparation of buffalo pituitary follicle stimulating hormone using lectin affinity chromatography. **Prep Biochem Biotechnol.**, v.35, n.4, p.331-345, 2005.

CONDON, W.A.; GANJAM, V.K.; KENNEY, R.M. Catecholamines and equine luteal progestagens. **J. Reprod. Fertil., Suppl.** v.27, p.199-203, 1979.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.Y.; SU, Y.Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Mol. Endocrinol.**, v.20, n.4, p.715-723, 2006.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Textbook of veterinary anatomy**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. 663p.

EVANS, M.J.; LOY, R.G.; TAYLOR, T.B.; BARROWS, S.P. Effects of exogenous steroids on serum FSH and LH and on follicular development in cyclic mares. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.32, p.205-212, 1982.

FERREIRA, S.A.; VANE, J.R. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. **Nature**, v.216, p.868-873, 1967.

FIELDS, M.J.; FIELDS, P.A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous and pregnancy **Theriogenology**, v.45, p.1295-1325, 1996.

FIELDS, M.J.; SHEMESH, M. Extragonadal luteinizing hormone receptors in the reproductive tract of domestic animals. **Biol. Reprod.**, v.71, n.5, p.1412-1418, 2004.

GAINER, H.; RUSSEL, J.T.; LOH, Y.P. The enzymatology and intracellular organization of peptide precursor processing: The secretory vesicle hypothesis. **Neuroendocrinology**, v.40, p.171-184, 1985.

GASTAL, E.L.; BERGFELT, D.R.; NOGUEIRA, G.P.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Role of luteinizing hormone in follicle deviation based on manipulating progesterone concentrations in mares. **Biol. Reprod.**, v.61, p.1492-1498, 1999.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. **Reproduction**, v.131, n.4, p.699-709, 2006.

GINTHER, O.J. Local versus systemic uterovarian relationship in farm animals. **Acta Vet. Scand. Suppl.**, v.77, p.103-115, 1981.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare**. 2. ed. Cross Plains: Equiservices, 1992. 642p.

GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biol. Reprod.**, v.64, p.197-205, 2001.

GOFF, S.A.; BASU, S.; KINDAHL, H. Measurements of 11-ketotethanon PGF metabolites: An approach for monitoring prostaglandin-F_{2α} release in the mare. **Theriogenology**, v.21, p.887-896, 1984.

GRANSTRÖM, E.; KINDAHL, H. Species differences in circulating prostaglandin metabolites. Relevance for the assay of prostaglandin release. **Biochim. Biophys. Acta**, v.713, n.3, p.555-569, 1982.

GUILLAUME, D.; BRUNEAU, B.; BRIANT, C. Comparison of the effects of two GnRH antagonists on LH and FSH secretion, follicular growth and ovulation in the mare. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.42, n.3, p.251-264, 2002.

GUILLOU, F.; COMBARNOUS, Y. Purifications of equine gonadotrophins and comparative use of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. **Biochem. Biophys. Acta**, v.775, p.229-236, 1983.

HANDLER, J.; WÜSTENHAGEN, A.; SCHAMS, D.; KINDAHL, H.; AURICH, C. Estrous cycle characteristics, luteal function, secretion oxytocin (OT) and plasma concentrations of 15-keto-13,14-dihydro-PGF_{2α} after administration of low doses of prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) in pony mares. **Theriogenology**, v.61, p.1573-1582, 2004.

HANSEL, W.; BLAIR, R.M. The role of lipoxygenase products of arachidonic acid metabolism in bovine corpus luteum function. **Reprod. Domest. Anim.**, v.31, p.427-429, 1996.

HIYAMA, J.; SURUS, A.; RENWICK, A.G. Purification of human pituitary LH and thyrotrophin by hydrophobic chromatography. **J. Endocrinol.**, v.125, n.3, p.493-500, 1990.

HORNSBY, P.J., CRIVELLO, J.F. The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. I A background review. **Mol. Cell Endocrinol.**, v.30, p.1, 1983.

JUENGEL, J.L.; MEBERG, B.M.; MCINTUSH, E.W.; SMITH, M.F.; NISWENDER, G.D. Hormonal regulation of mRNA encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. **Endocrinology**, v.136, p.5423-5429, 1995.

KAINER, R.A. Reproductive organs of the mare. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p.5-19.

KELLY, C.M.; HOYER, P.B.; WISE, M.E. In-vitro and in-vivo responsiveness of the corpus luteum of the mare to gonadotrophin stimulation. **J. Reprod. Fertil.**, v.84, p.593-600, 1988.

KO, C.; GIESKE, M.C.; AL-ALEM, L.; HAHN, Y.; GONG, M.C.; IGLARZ, M.; KOO, Y. Endothelin-2 in ovarian follicle rupture. **Endocrinology**, v.147, n.4, p.1770-1779, 2006.

KOTWICA, J.; BOGACKI, M.; REKAWIECKI, R. Neural regulation of the bovine corpus luteum. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.5341, p.1-10, 2002.

LEVY, N.; KOBAYASHI, S.; ROTH, Z.; WOLFENSON, D.; MIYAMOTO, A.; MEIDAN, R. Administration of prostaglandinF2 α during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. **Biol. Reprod.**, v.63, p.377-382, 2000.

MACHADO, M.S. **Avaliação da dinâmica folicular em éguas superovuladas com extrato de pituitária eqüina e FSH purificado**. 2004. 121p. Dissertação

(Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MEIDAN, R.; LEVY, N. Endothelin-1 receptors and biosynthesis in the corpus luteum: molecular and physiological implications. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.23, p.287-298, 2002.

MILVAE, R.A.; HINCKLEY, S.T.; CARLON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v.45, p.1327-1349, 1996.

MILVAE, R.A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandinF_{2α} in corpus luteum function. **Rev. Reprod.**, v.5, p.1-5, 2000.

MIYAMOTO, A. Intraluteal mechanisms involved in prostaglandinF_{2α}-induced luteolysis in Ewes. **J. Reprod. Dev.**, v.42, p.61-63, 1996.

MONTOVAN, S.M.; DAELS, P.P.; RIVIER, J.; HUGHES, J.P.; STABENFELDT, G.H.; LASLEY, B.L. The effect of a potent GnRH agonist on gonadal and sexual activity in the horse. **Theriogenology**, v.33, p.1305-1321, 1990.

NISWENDER, K.D.; BRADEN T.D.; NISWENDER, G.D. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF_{2α}. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.7, n.2, p.229-238, 1990.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYNSON, M.K.; MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiol. Rev.**, v.80, n.1, p.1-29, 2000.

NISWENDER, K.D.; MCCUE, P.M.; AQUIRES, E.L. Effect of purified equine follicle-stimulating hormone on follicular development and ovulation in transitional mares. **J. Equine Vet. Sci.**, v.24, p.37-39, 2004.

OHTANI, M.; KOBAYASHI, S.; MIYAMOTO, A.; HAYASHI, K., FUKUI, Y. Real-time relationships between intraluteal and plasma concentrations of endothelin, oxytocin, and progesterone during prostaglandinF_{2α}- induced luteolysis in the cow. **Biol. Reprod.**, v.58, p.103-108, 1998.

PACCAMONTI, D.L.; PYCOCK, J.F.; TAVERNE, M.A.M.; BEVERS, M.; GUTJAHR, S. PGFM response to exogenous oxytocin and determination of the half-life of oxytocin in non pregnant mares. **Equine Vet. J.**, v.31, p. 285-288, 1999.

PATE, J.L. Cellular components involved in luteolysis. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.1884-1890, 1994.

PATE, J.L. Intercellular communication in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v.45, p.1381-1397, 1996.

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

PENNY, L.A. Monocyte chemoattractant protein 1 in luteolysis. **Rev. Reprod.**, v.5, p.63-66, 2000.

PERES, K.R. **Avaliação do uso do Hormônio Folículo Estimulante eqüino (eFSH) visando a antecipação da estação reprodutiva e a superovulação de éguas na fase de transição de primavera.** 2004. 122p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PIERCE, J.C.; PARSONS, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. **Annu. Rev. Biochem.**, v.50, p.465-495, 1981.

ROCHA FILHO, A.N. **Efeito do tratamento com baixa dose de extrato de pituitária eqüina ou FSH purificado eqüino no crescimento folicular, taxa de ovulação e recuperação embrionária em éguas.** 2005. 70p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ROSAS, C.A.; ALBERIO, R.H.; BARANÃO, J.L.; AGUERO, A.; CHAVES, M.G. Evaluation of two treatments in superovulation of mares. **Theriogenology**, v.49, p.1257-1264, 1998.

RUEDA, B.K.; TILLY, K.I.; HANSEN, T.R.; HOYER, P.B.; TILLY, J.L. Expression of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the bovine corpus

luteum: evidence supporting a role for oxidative stress in luteolysis. **Endocrine**, v.3, p.227-232, 1995.

SCANES, C.G.; JEFTINIJA, S.; GLASVASKI-JOKSIMOVIC, A.; PROUDMAN, J.; ARAMBURO, C.; ANDERSON, L.L. The anterior pituitary gland: lessons from livestock. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.29, n.1, p.23-33, 2005.

SHEMESH, M. Actions of gonadotropins on the uterus. **Reproduction**, v.121, p. 835-842, 2001.

SHEMESH, M.; MIZRACHI, D.; GUREVICH, M.; SHORE, L.S.; REED, J.; CHANG, S.M.; TATCHER, W.W.; FIELDS, M.J. Expression of functional luteinizing hormone (LH) receptor and its messenger ribonucleic acid in bovine endometrium: LH augmentation of camp and inositol phosphate in vitro and human chorionic gonadotropin (hCG) augmentation of peripheral prostaglandin in vivo. **Reprod. Biol.**, v.1, n.2, p.13-32, 2001.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 545p.

STABENFELDT, G.H.; KINDHAL, H.; HUNGHEES, J.P.; NELLY, D.P.; LIU, I.; PASCOE, D. Control of luteolysis in the mare. **Acta Vet Scand Suppl.**, v.77, p.159-170, 1981.

STEPIEN, A.; SHEMESH, M.; ZIECIK, A.J. Luteinizing hormone receptor kinetic and LH induced prostaglandin production throughout the oestrous cycle in porcine endometrium. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 39, p.663-674, 1999.

STOUT, T.A.; LAMMING, G.E.; ALLEN, W.R. Oxytocin administration prolongs luteal function in cyclic mares. **J. Reprod. Fertil.**, v.116, n.2, p.315-320, 2000.

THARASANIT, T.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M.; STOUT, T.A. Effects of recombinant human follicle stimulating hormone on follicle development and ovulation in the mare. **Theriogenology**, v.65, n.6, p.1071-1081, 2006.

TSAI, S.; WILTBANK, M.C. ProstaglandinF2 α induces expression of prostaglandin G/H Synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biol. Reprod.**, v.57, p.1016-1022, 1997.

VANDERWALL, D.K.; BETSCHART, R.W.; SQUIRES, E.L. Effect of PGF₂alpha and 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂alpha (PGFM) on corpora luteal function in nonpregnant mares. **Theriogenology**, v.53, n.6, p.1263-1271, 2000.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Regressão luteal e dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida por cloprostenol em vacas da raça Gir. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 51, n.3, p. 257-262, 1999.

WATSON, E.D.; SERTICH, P.L. Secretion of prostaglandins and progesterone by cells from corpora lutea of mares. **J. Reprod. Fertil.**, v.88, p.223-229, 1990.

WATSON, E.D.; PEDERSEN, H.G.; THOMSON S.R.; FRASER H.M. Control of follicular development and luteal function in the mare: effects of a GnRH antagonist. **Theriogenology**, v.54, n.4, p.599-609, 2000.

WOODS, G.L.; GINTHER, O.J. Recent studies relating the collection of multiple embryos in mares. **Theriogenology**, v.19, p. 101-108, 1983.

ZIECIK, A.J.; KOTWICA, G. Involvement of gonadotropins in induction of luteolyses in pigs. **Reprod. Biol.**, v.1, n.2, p.33-50, 2001.