

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RESGATE DA FUNÇÃO LUTEAL EM BOVINOS APÓS
DESAFIO COM CLOPROSTENOL SÓDICO**

EDUARDO TREVISOL

BOTUCATU – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RESGATE DA FUNÇÃO LUTEAL EM BOVINOS APÓS
DESAFIO COM CLOPROSTENOL SÓDICO**

EDUARDO TREVISOL

Dissertação apresentada junto ao
programa de pós-graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

BOTUCATU – SP

2011

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

Trevisol, Eduardo.

Resgate da função luteal em bovinos após desafio com cloprostenol sódico /
Eduardo Trevisol. – Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

Capes: 50504002

1. Reprodução animal. 2. Bovino. 3. Prostaglandina.

Palavras-chave: Bovinos; Corpo lúteo; Luteólise; Luteólise parcial;
Prostaglandina F2 α .

Nome do autor: Eduardo Trevisol

Título: Resgate da função luteal em bovinos após desafio com cloprostenol sódico

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
Presidente e orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dr. Roberto Sartori Filho
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr, Mario Binelli
Membro
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ – USP – Pirassununga

Data da Defesa: 17 de fevereiro de 2011.

DEDICATÓRIA

À DEUS que me deu saúde para completar essa etapa.

Aos meus Pais e minha irmã, pessoas simples que empenharam sua vida na minha formação e deram muita força, apoio e incentivo para realizar este projeto. As suas preocupações com meu experimento, com as aulas e apresentações.

À Camila uma pessoa especial que conheci durante o desenvolvimento do mestrado. Companheira que me trouxe muita paz e alegria durante esse período

Ao Jackson Barros do Amaral por ter acreditado em mim e se tornar um grande amigo.

Ao Prof. João Carlos Pinheiro Ferreira pela confiança depositada.

AGRADECIMENTO

Agradeço ao Prof. João e ao pesquisador Jackson que acreditaram no meu trabalho e depositaram toda confiança. Por toda a sabedoria, ensinamento e dedicação ao meu projeto.

A Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e em especial a CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa o qual cedeu os animais, funcionários e o laboratório de reprodução animal para a realização do experimento a campo.

Ao Prof. Roberto Sartori pela ajuda no delineamento experimental e nas dosagens de Progesterona, e também ao Marcos da ESALQ..

Aos amigos de Botucatu e republica André, Marcel e Rodrigo (Ruffles) e ao Leandro (Alemão) agregado, grandes companheiros de churrascos, conversas e troca de informações.

Aos colegas de experimento a campo Carol, Jair, Wolff, Aline e Gabriel pelo companheirismo nas intensas noites mal dormidas.

Aos colegas de departamento e pós-graduandos Marcel (Braxola), José Dell'aqua, Eduardo (Duroc), Aline, Renata (Alfafa), Ian, Cely, Luiz, Rosiara, Priscilla, Bethânia, Fernanda, Yeda, Bruna, Gustavo, Ana Augusta (Guta), Nina, Claudinha, Sabrina pelos momentos de descontração.

As professoras do Departamento de Reprodução Animal Eunice Oba, Maria Denise Lopes e Fernanda da Cruz Ladim Alvarenga e aos professores Sony Dimas Bicudo, Frederico Ozanan Papa, Nereu Carlos Preste e Marco Antonio Alvarenga pelos ensinamentos durante o mestrado.

Ao Prof. Cezinande de Meira por ceder o Ultrassom Doppler para realizar as coletas de dados.

Aos funcionários do departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desde projeto, meus agradecimentos...

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1: Número das vacas sincronizadas em cada módulo que responderam ao protocolo e foram utilizadas.....22
- TABELA 2: Valores médios e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) de vacas da raça Caracu após o tratamento no sexto dia do ciclo estral com solução salina (G1), duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com intervalo de 2 horas (G2) e 83,33 µg cloprostenol sódico (G3).....29
- TABELA 3: Valores médios e erro padrão da perfusão sanguínea luteal (%) de vacas da raça Caracu após o tratamento no sexto dia do ciclo estral com solução salina (G1), duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com intervalo de 2 horas (G2) e 83,33 µg cloprostenol sódico (G3).....29
- TABELA 4: Valores médios e erro padrão d volume luteal (cm³) de vacas da raça Caracu após o tratamento no sexto dia do ciclo estral com solução salina (G1), duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com intervalo de 2 horas (G2) e 83,33 µg cloprostenol sódico (G3).....30

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Valores médios (A) e individuais (B, C, D, E, F e G) da concentração plasmática de progesterona (ng/mL - \blacklozenge), volume (cm³- \blacksquare) e perfusão sanguínea luteais (% - \blacktriangle) de vacas Caracu nos diferentes momentos (horas) após injeção intramuscular de solução salina no D6 (Grupo controle – n=6).....31
- FIGURA 2: Valores médios (A e B – valores médios excluindo-se os dados do animal que não apresentou luteólise) e individuais (C, D, E, F, G e H) da concentração plasmática de progesterona (ng/mL - \blacklozenge), volume (cm³- \blacksquare) e perfusão sanguínea luteais (% - \blacktriangle) de vacas Caracu nos diferentes momentos (horas) após injeção intramuscular de duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico no D6 (Grupo Luteólise n=6) (* = p<0,05).....32
- FIGURA 3: Valores médios (A e B – valores médios excluindo-se os dados do animal que apresentou luteólise) e individuais (C, D, E, F, G, H e I) da concentração plasmática de progesterona (ng/mL - \blacklozenge), volume (cm³- \blacksquare) e perfusão sanguínea luteais (% - \blacktriangle) de vacas Caracu nos diferentes momentos (horas) após injeção intramuscular de 83,33 µg de cloprostenol sódico no D6(Grupo Luteólise parcial n=7) (* = p<0,05)..... 33

Sumário

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTO	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Corpo Lúteo	7
2.2 Hormônio Luteinizante	9
2.3 Prostaglandina F2 α	11
2.4 Fatores Angiogênicos	13
2.5 Fatores Vasoativos	15
3 OBJETIVO	19
3.1 Hipótese científica	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Animais e instalações experimentais	21
4.2 Módulo experimental	21
4.3 Sincronização da ovulação	22
4.4 Grupos experimentais	23
4.5 Avaliações ultrassonográficas	23
4.6 Colheita de sangue e determinação das concentrações plasmáticas de P4	24
4.7 Análise estatística	25
5 RESULTADOS	27
5.1 Sincronização de estro	27
5.2 Concentração plasmática de progesterona, perfusão sanguínea e volume luteal	27
6 DISCUSSÃO	35
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
8 CONCLUSÃO	41
9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
10 TRABALHO CIENTÍFICO	51

TREVISOL, E. Resgate da função luteal em bovinos após desafio com cloprostenol sódico. Botucatu, 2011. 81p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi estudar as alterações da concentração plasmática de progesterona (P4), perfusão sanguínea e volume luteais após administração de sub-dose de cloprostenol sódico (análogo da PGF2 α) no sexto dia do ciclo estral em bovinos. Foram utilizadas 18 vacas da raça Caracu adultas, e em todas foram inicialmente sincronizadas as ovulações antes de serem iniciados os três módulos experimentais. Em cada módulo as vacas foram divididas aleatoriamente entre os grupos 1 (desafiadas com 2 mL de solução fisiológica 0,9%; IM, n=6), 2 (duas doses de 500 μ g de cloprostenol sódico com intervalo de 2 horas, n=6) e 3 (83,33 μ g de cloprostenol sódico IM, n=7). As coletas de dados foram iniciadas com avaliações ultrassonográficas modo B e Power-Doppler, seguida de coleta de sangue para dosagem de P4, realizadas nos momentos 0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas após o tratamento. Os dados foram submetidos a análise de variância e para diferenças entre as médias foi aplicado o teste TUKEY com 5% de probabilidade. Os tratamentos influenciaram as concentrações plasmáticas de P4, perfusão sanguínea e volume luteal. No tratamento 1 não foi observado alterações na P4, perfusão sanguínea e volume luteal, porém no tratamento 2 a progesterona diminuiu no momento 16 e nos momentos seguintes foram semelhantes ao observado inicialmente. A perfusão sanguínea e volume luteal diminuíram 48 horas após o tratamento 2. No tratamento 3 a P4 diminuiu até a hora 16 e voltou a aumentar, igualando a valores iniciais. Porém a perfusão sanguínea e volume não alteraram. No grupo luteólise quando excluído um animal que não apresentou luteólise, a P4 manteve-se baixa a partir da hora 16, e no grupo luteólise parcial quando excluído o animal que apresentou luteólise total, a P4 48 horas após tratamento foi maior que na hora 16. Conclui-se que 83,33 μ g de cloprostenol sódico causa luteólise parcial, que é caracterizada pela diminuição na P4 a partir de 16h após o tratamento, entretanto, 48h após o desafio a P4 retorna a concentrações semelhantes às observadas inicialmente.

Palavras-chave: Luteólise, corpo lúteo, prostaglandina F2 α , bovinos.

TREVISOL, E. Rescue of luteal function in bovine after treatment with cloprostenol sodium. Botucatu, 2011. 81p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate progesterone plasmatic concentration, blood flow and luteal volume after cloprostenol (PGF 2α analogue) sub-doses on sixth day of bovine estrus cycles. Initially all animals has the ovulations synchronize to initiate every stage. In tree firsts stage on day 6 the animals receive treatment and in every stage it were randomly allocate between group 1 (2 mL Physiologic solution 0,9%; IM, n=6), 2 (two doses 500 μ g cloprostenol 2 hours interval, n=6) and 3 (83,33 μ g cloprostenol IM on D6, n=7). Data collection were initiate with mode Bultrasonography and Power-Doppler evaluations follow by blood collection for progesterone (P4) measure at moments 0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 hours after treatment. Data was submitted to variance analyze between mean the TUKEY test with 5% probability was applied. Treatments influenced P4 concentration, blood flow and luteal volume. On treatment 1 there was no P4, blood perfusion and luteal volume changes, but on treatment 2 P4 decrease on moment 16 the follow moments was similar to the initial. Blood flow and luteal volume decreased 48 hours after treatment 2. In treatment 3 was observed a decrease in P4 concentrations from moment 0 to 16 with a increase returning to initial values after this moment. Although this, blood flow and luteal volume did not change. On luteolysis group when excluded a animal that had partial luteolysis P4 concentrations remained low after hour 16. On partial luteolysis group when a animal that had luteolysis was excluded P4 at 48 hours after treatment was higher than 16 hour. Is possible to conclude that 83,33 μ g cloprostenol causes partial luteolysis and that is characterized by an initial P4 decrease 16 hours after treatment follow by luteal function rescue on the follow moments.

Key words: Luteolysis, corpus luteum, prostaglandin F 2α , cattle.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos bovinos do mundo, quase 200 milhões de cabeças e é o primeiro colocado em número de animais livres de febre aftosa, com 177,73 milhões de cabeças, seguido dos Estados Unidos com 94,5 milhões (Scot Consultoria, 2010). Fatores como estes fazem com que o país seja um dos principais exportadores de carne do mundo, gerando uma necessidade constante do aperfeiçoamento das técnicas aplicadas a campo, como melhoramento genético, nutricional, sanitário e reprodutivo.

Os bovinos têm o ciclo estral que dura em média 21 dias e esse ciclo é dividido em duas fases, uma marcada pela alta concentração de estrógeno (fase estrogênica) e outra pela progesterona (fase lútea). A fase lútea ocorre entre a ovulação e a luteólise, durando em média 17 dias. Na ausência de um embrião viável a $\text{PGF}_{2\alpha}$ naturalmente é secretada pelo endométrio e causa a regressão funcional e estrutural do corpo lúteo (CL). A luteólise funcional é caracterizada pelo rápido declínio das concentrações de P4 nas primeiras 8 a 12 horas após a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$. 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 compreensão da fisiologia do ciclo estral de fêmeas bovinas é de grande importância para melhorar a eficiência de fármacos nos protocolos de sincronização de estro. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ é um fármaco bastante utilizado na sincronização de cio por ser de fácil manipulação e baixo custo. Utilizada entre os dias 5 e 7 pós aplicação de GnRH, causa luteólise em 95% dos animais (BRIDGES et al., 2008)

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

Apesar do relato desse fenômeno, ainda não são conhecidos os mecanismos luteais que estão envolvidos nesse processo, denominado de lúteolise parcial, e do subsequente fenômeno de resgate da função luteal.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Corpo Lúteo

O CL participa da maioria dos processos reprodutivos. Ele é um órgão endócrino transitório formado pela ruptura do folículo ovulatório e sua função primária é a produção de P4, responsável pela preparação do endométrio para implantação e manutenção da gestação (WILTBANK, 1994; MILVAE et al., 1996; MILVAE, 2000).

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

Na maioria dos mamíferos as células luteais derivadas das células granulosas originam as grandes células luteais (LLC- Large Luteal Cells) e as da teca, as pequenas células luteais (SLC- Small Luteal Cells), ambas são células esteroideogênicas (ALILA E HANSEL, 1984).

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

As células luteínicas maiores produzem 80% da P4 basal, enquanto as menores apenas 20% e ocupam, respectivamente, 40 e 20% do volume luteal e 3 e 26% do total de células do CL bovino (ALILA E HANSEL, 1984).

No CL existem ainda células não esteroideogênicas, que compreendem diferentes tipos celulares, tais como as células endoteliais, os pericitos e os fibroblastos, que também desempenham importantes papéis na função do CL. Os fibroblastos classicamente estão associados aos componentes estruturais

dos tecidos e produzem glicosaminoglicanas, colágenos e algumas citocinas. Os macrófagos também têm importante participação fagocítica na resposta imune que envolve a regressão do CL. As células do sistema vascular representam cerca de 50% das células que constituem o CL e ocupam um volume de 14% (WEBER, et al., 1987).

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

O desenvolvimento normal do CL, sua capacidade de produzir a P4 e os fatores locais de crescimento são dependentes da vascularização lútea. Durante o desenvolvimento adiantado do CL, a própria P4, o hormônio de crescimento (GH), o LH, entre outros hormônios e fatores, afetam *in vivo* e *in vitro* a secreção de P4 pelo CL (ACOSTA E MIYAMOTO, 2004).

Durante a formação do CL há o desenvolvimento de uma rede de capilares responsável pela vascularização. Ao longo da fase lútea há o aumento dessa vascularização acompanhando a dinâmica da progesterona. Após a luteólise nota-se a diminuição da irrigação do CL e da síntese de progesterona (MIYAMOTO et al., 2005).

Através de exames ultrassonográficos em modo Doppler é possível observar alterações do fluxo sanguíneo em tempo real no momento da luteólise. Essas alterações são representadas por área colorida em imagem seccional no diâmetro máximo do CL e são avaliadas na forma de um índice quantitativo das alterações do fluxo sanguíneo (ACOSTA et al., 2002). No momento da luteólise induzida ocorre um breve aumento do fluxo sanguíneo seguido de um decréscimo; essa dinâmica é acompanhada pela progesterona (MIYAMOTO et al., 2005). Estudos têm demonstrado que o aumento no fluxo sanguíneo inicial é devido à ação da $PGF_{2\alpha}$, seja ela administrada de forma sistêmica ou intra-uterina (GINTHER et al., 2007).

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

As rápidas alterações observadas no padrão de secreção de P4 durante a luteólise não são acompanhadas de modificações estruturais do CL. Através de exames ultrassonográficos é possível observar alterações no diâmetro do CL apenas 12 horas após o início da liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004).

2.2 Hormônio Luteinizante

O LH, um membro da família dos hormônios glicoprotéicos, é constituído pelas sub-unidades α e β , sendo que primeira é comum e a segunda é a que confere especificidade de receptor. O LH é secretado pela hipófise anterior em diferentes formas moleculares e participa de vários eventos fisiológicos no ovário, como maturação folicular, ovulação, desenvolvimento e manutenção do CL (NISWENDER et al., 2000).

A P4 é a principal reguladora da secreção de GnRH durante a fase lútea (NISWENDER et al., 2000), estando diretamente ligada às alterações nas expressões gênicas relacionadas a produção das subunidades α e β do LH (COWLEY et al., 1998). Quando analisado a quantidade de isoformas de LH na glândula pituitária de bovinos, observou-se que novilhas ovariectomizadas suplementadas com P4 não alteraram a proporção relativa de isoformas, porém a ovariectomia sem suplementação resultou na redução de isoformas de LH relacionadas com a fase lútea e anestro, e aumentou as isoformas de LH relacionado com a fase folicular em comparação com o grupo de novilhas em diestro (PERERA-MARÍN, et al., 2008).

A frequência e amplitude do pulso de LH também são influenciadas pela P4, de forma que na fase luteal observa-se maior amplitude e menor frequência secretória enquanto que na fase de estro a amplitude menor e frequência maior (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009).

Entre os dias 1 e 5 após ovulação ocorre aumento nas concentrações de P4, enquanto que o LH tem sua concentração diminuída e não há aumento da

frequência. Entre os dias 7 e 10 ocorre um pequeno aumento adicional da P4 e também é observado o aumento da amplitude dos pulsos de LH. No final da fase lútea com a queda de P4 a frequência de pulsos de LH volta a aumentar e a amplitude diminui (HANNAN et al., 2010).

Assim como a progesterona altera a frequência dos pulsos de LH e o LH também altera os pulsos de P4 (FIKE et al., 2004). Um pulso de baixa frequência e alta amplitude ocorre a cada 4 horas na fase luteal média, e esse pulso é seguido de um aumento na P4. Sendo assim os pulsos de LH e P4 são sincronizados durante a fase luteal, o início do pulso de LH imediatamente inicia o pulso de P4 (CUPP et al., 1995).

A associação entre pulsos também é observada no período luteolítico inicial (primeiras 2-4 horas) quando observa-se que após cada elevação do LH plasmático a concentração de P4 apresenta aumentos transitórios, apesar de manter um comportamento geral de queda (GINTHER et al., 2010a). Esse comportamento acontecendo após o pulso luteolítico da $PGF_{2\alpha}$ indica que nesse momento as células luteínicas ainda possuíam capacidade de responder ao estímulo do LH.

O LH por sua vez influencia a secreção de P4 pelas das células luteais pequenas, que quando estimuladas *in vitro* com LH têm aumentada sua capacidade de secretar de P4 em mais de 5 vezes (NISWENDER et al., 2000). O LH quando se liga aos receptores nas células luteais, ativa a adenilato ciclase que aumenta as concentrações de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), responsável pela ativação da proteína kinase A e essa aumenta o colesterol no citoplasma das células (PKA; NISWENDER, 2002).

No dia 5 após ovulação o CL é capaz de responder ao estímulo esteroidogênico proveniente da gonadotrófica coriônica humana (hCG) um análogo de LH produzido durante a gestação em humanos. O efeito luteotrófico do tratamento com hCG pode ser atribuído ao aumento do tamanho das células luteais e do número de LLC, devido à diminuição do número das SLC. Essa modificação também resulta no aumento da área, volume e diâmetro do CL (RENSIS et al., 2010).

A aplicação de LH tem sido utilizada como estratégia para melhorar a taxa de prenhez em vacas, com o intuito de formar um CL acessório e

aumentar a secreção de P4. E essa técnica pode ser aplicada no sétimo dia pós-ovulação, pois nesse momento está presente no ovário um folículo dominante e responsivo ao LH (SIANANGAMA E RAJAMAHENDRAN, 1992).

ROBINSON et al., (2008) analisando as possíveis causas da perda embrionária, levantaram a hipótese que a inadequada função luteal estaria ligada a um apoio luteotrófico insuficiente relacionado ao número de pulsos de LH, concentração LH basal e amplitude dos pulsos insuficientes. A capacidade esteroidogênica também estaria envolvida neste processo, porém os autores não conseguiram relacionar esses achados com os principais fatores da inadequada função luteal.

Em bovinos o número de receptores de LH no CL aumenta ao longo da fase luteal e também no decorrer do desenvolvimento e manutenção da prenhez (KAWATE, 2004). O CL de porca apresenta receptores para LH ao longo da fase lútea, contudo quando analisado a expressão destes receptores após administrado $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 17 do ciclo notou-se uma queda de 55% na expressão mRNA de receptores para LH e 42% na expressão de proteínas de receptores para LH. Porém quando analisado no dia 9 do ciclo, não houve diferença significativa (DIAZ e WILTBANK, 2005).

2.3 Prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$

As prostaglandinas (PGs) são importantes mediadores de várias funções reprodutivas na fêmea incluindo luteólise, ovulação e reconhecimento materno da gestação. O endométrio bovino secreta PGEs e $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante todo o ciclo estral, mas o padrão de secreção modifica-se ao longo do mesmo. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ tem sido identificada como luteolítico natural em várias espécies de mamíferos (WAITE et al., 2005); produzida no endométrio, alcança a circulação venosa uterina e por meio de mecanismo contra-corrente (que envolve transporte ativo), passa ao sistema arterial ovariano, onde produz vasoconstrição e, conseqüentemente, luteólise (CUNNINGHAM, 2004).

Nos bovinos, entre os dias 15 e 17 do ciclo, período crítico do início da luteólise, ocorre importante aumento da secreção endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$ na ausência de um embrião viável (TANIKAWA et al., 2005). Contudo, quando

estabelecida a prenhez, as prostaglandinas E1 (padronizar sub escrito) e E2 desempenham importante função na manutenção do CL evitando a diminuição da P4. Em ovelhas, a PGE₁ aumenta os receptores de LH no tecido caruncular e luteal, prevenindo a conversão de PGE₂ em PGF_{2α} (WEEMS et al., 2010)

A luteólise é desencadeada pelo aumento da amplitude dos pulsos de PGF_{2α}. Inicialmente observa-se picos (2-3) de secreção que elevam a concentração plasmática de PGFM (metabólico da PGF_{2α}) a valores >100-125 pg/mL. Subsequentemente, há um grande aumento da magnitude do pulso e a PGFM alcança valores em torno de 550 pg/mL. Nesse momento o fluxo sanguíneo ovariano e a síntese de P4, que já se encontram em declínio, apresentam súbita elevação por duas horas e voltam a declinar progressivamente até a P4 alcançar valores menores que 1 ng/mL. Durante o período de declínio continuam acontecendo pulsos de secreção de PGF_{2α}, contudo a amplitude dos mesmos diminui progressivamente. Os pulsos sequenciais acontecem a cada 9-12 horas, duram em média 4 horas e o processo todo tem duração aproximada de 30 horas (MIYAMOTO et al., 2005; GINTHER et al., 2007; GINTHER et al., 2010b).

O CL dos bovinos possui receptores específicos para PGF_{2α}, contudo a afinidade desses receptores é maior entre o 13° ao 20°. A ligação da PGF_{2α} a seus receptores na membrana das células luteais esteroidogênicas a atividade da Proteína Kinase C, que interrompe a produção de P4 de diversas maneiras: diminuindo a captação e o transporte de colesterol para o citoplasma e para a mitocôndria, promovendo retroalimentação negativa dos receptores de LH e, possivelmente, aumentando a expressão e ativação das proteínas envolvidas nos processos de apoptose (revisado por BERTAN et al., 2006).

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

Uma única dose luteolítica administrada via intramuscular, intravulvar ou intraluteal de PGF_{2α}, causa inicialmente um aumento da P4. É o que tem demonstrado em alguns estudos, onde nos primeiros 5 minutos após a

administração nota-se um aumento, porém com 36 horas as concentrações de P4 voltam a diminuir chegando a menos de 1,0 ng/ml. O aumento da P4 no início da luteólise não é detectado quando simulado pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (infusões intrauterina de 0,5 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante 2 horas), e múltiplos pulsos são necessários para obter completa luteólise (GINTHER et al., 2009; MIYAMOTO, et al., 2009).

Uma retomada nas concentrações de P4 também é notado entre 2 ou 3 horas após tratamento com única administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou análogos, isso quando utilizado sub-dose (0,25 ou 1,0 mg) induzindo a luteólise parcial. A resposta de retomada é observado na dose de 4,0 mg, porém a P4 se mantém alta por apenas 1 hora e em seguida volta a declinar e a luteólise se completa (SHRESTHA et al., 2010).

O fator de necrose tumoral ($\text{TNF}\alpha$) tem efeitos estimulatórios na liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ na fase lútea tardia do ciclo e interfere na produção *in vitro* de P4 por células luteínicas bovinas. A exposição endometrial simultaneamente ao $\text{TNF}\alpha$ e OT apresenta efeito estimulatório sobre a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (MILVAE, 2000). Outra citocina a estimular a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é a interleucina-1 β (IL-1 β), porém a P4 em alta concentração inibe esse efeito (NOTHNICK E PATE, 1990).

Outra substância que tem participação no processo de regressão do CL é a proteína quimiotática para monócito-1(MCP-1); presente nas células endoteliais de corpo lúteo bovino, a qual é responsável pela migração de células imune (monócitos, macrófagos e linfócitos T) do sangue. O aumento desta proteína ocorre no momento da luteólise influenciado pelo $\text{TNF}\alpha$ e IFN- γ e não pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ (CAVICCHIO et al., 2002).

2.4 Fatores Angiogênicos

O CL é um órgão altamente vascularizado e que produz vários fatores angiogênicos. A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos através da migração e proliferação de células endoteliais oriundas

de vasos pré-existentes, e também está relacionada com o fluxo sanguíneo e produção hormonal (ROBINSON et al., 2009).

O VEGF é um importante fator de regulação da angiogênese sendo um potente mitogênico para as células endoteliais, induzindo à migração, diferenciação e proliferação destas, participando também na maturação, estabilização e permeabilidade dos vasos sanguíneos (FERRARA E DAVIS-SMYTH, 1997; NEUFELD, et al., 2000).

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

Vários FGF estão presente no CL bovino. Baseado nos padrões de expressão de seus receptores (FGFR), concluiu-se que estes provavelmente não estão envolvidos somente na angiogênese luteal, que ocorre principalmente no início do ciclo estral, mas também afetam a produção de P4 e inibem a morte de vários tipos de células (REYNOLDS et al., 2000).

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

A expressão para FGF-2 pode ser estimulada pela angiotensina II *in vitro* (STIRLING et al., 1991), que por sua vez regula positivamente a produção de angiotensina II e estimula a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas células luteais bovina na fase lútea inicial *in vitro* (KOBAYASHI et al., 2001).

A ANPT-1 é necessária para manter e estabilizar os vasos sanguíneos, enquanto a ANPT-2 age como um antagonista para ANPT-1. A baixa relação ANPT-1/ANPT-2 induz a desestabilização de vasos sanguíneos, sendo esta um pré-requisito para a angiogênese, no início da fase luteal, e regressão do CL (SCHAMS E BERISHA, 2004).

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

As proteínas IGFBP regulam a concentração livre de IGF, influenciam a interação entre IGF e seus receptores e, conseqüentemente, podem estimular ou inibir a ação do IGF assim como o seu armazenamento. Todos os tipos de IGFBP (1-6) foram encontrados no CL de bovinos. As IGFBP-3,-4 e -5 têm suas expressões aumentadas durante a fase lútea inicial, com tendência a diminuir em seguida (SCHAMS et al., 1999). As IGFBP-1,-2 e -3 inibem o efeito estimulatório do IGF-1 sobre a produção de progesterona *in vitro*, provavelmente por inibirem a interação deste com o IGFR-1 (SAYRE, et al., 2000; BROWN E BRADEN, 2001).

IGF-1 é encontrado em células luteais grandes e pequenas e em quantidade limitada nas células endoteliais; o IGF-2 não é observado nas células luteais, mas é encontrado em periócitos de capilares e em fibroblastos perivasculares de grandes vasos sanguíneos (AMSELGRUBER et al., 1994). No tecido luteal a IGF-1 e -2 têm efeitos estimulatórios sobre a secreção de progesterona e ocitocina em vacas (SAUERWEIN et al., 1992).

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

2.5 Fatores Vasoativos

Os fatores vaso ativos apresentam funções no CL bovino, tanto na sua formação quanto na regressão. A Endotelina-1 (EDN1) é um potente vasoconstritor produzidos pelas células endoteliais. Este peptídeo liga-se a dois subtipos distintos de receptores acoplados a proteína G: receptor de endotelina tipo A (ETR-A) e receptor de endotelina tipo B (ETR-B; MIYAMTO et al., 2009).

A luteólise pode ser mediada pela ação dos receptores tipo B, por promoverem apoptose, já receptores tipo A têm função antiapoptótica (FILIPPATOS et al., 2001).

A EDN1 pode inibir a secreção de P4 em bovinos e ovinos, e essa inibição pode ser bloqueada por um antagonista de ETR-A (ATR-A). A administração intraluteal deste antagonista durante a fase lútea média, interrompe o efeito luteolítico da $PGF_{2\alpha}$ (HINCKLEY E MILVAE 2001). Isto sugere que a $PGF_{2\alpha}$ estimula a biosíntese de EDN1 em células endoteliais luteais assim como em sistema de microdiálise em CL *in vitro* e *in viv*. Por sua vez a EDN1 aumenta a secreção de $PGF_{2\alpha}$ em células luteais (SHIRASUNA et al., 2004).

Hayashi e Miyamoto (1999) constataram *in vitro* que na fase luteal média a Ang II diminui a secreção luteínica de P4, principalmente se associada a infusão prévia ou concomitante de $PGF_{2\alpha}$. O efeito inibitório da Ang II sobre a P4, combinado ou não com a $PGF_{2\alpha}$, foi bloqueado pela infusão de receptores antagonistas de Ang II.

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

Ao contrário de alguns fatores vasoativos o óxido nítrico (NO) é um potente vaso dilatador, tendo origem da L-arginina pela ação do óxido nítrico sintetase (NOS). No CL bovino existem dois tipos de NOS: endotelial NO (eNOS) e induzível NO (iNOS; MONCADA et al., 1991).

No CL bovino a NOS é expressa em maior quantidade durante a fase luteal final, o que está relacionado com o aumento do fluxo sanguíneo. O NO pode ser um importante mediador da luteólise em vaca, por inibir diretamente a secreção de P4 e induzir a apoptose em células luteais bovinas (SKARZYNSHI et al., 2003). O CL na fase média, final e de regressão também apresenta várias áreas positiva para eNOS (SHIRASUNA et al., 2010a).

Durante a fase luteal media, a $PGF_{2\alpha}$ estimula a expressão mRNA para eNOS e iNOS na área periférica do CL, enquanto que na área central esse

efeito não é observado; esse fenômeno indica que as diferentes ações agudas da $\text{PGF}_{2\alpha}$ não dependem somente da fase lútea, mas também da região do CL (SHIRASUNA et al., 2008; SHIRASUNA et al., 2010b).

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

O NO regula ainda a concentração da enzima antioxidante superóxido desmutase (SOD) nas células endoteliais luteal, dependendo do tempo de exposição. Inicialmente observa-se a elevação da SOD; este aumento provavelmente representar uma resposta celular de proteção do CL contra o estresse oxidativo induzido pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante a luteólise funcional. Contudo, mais tarde o NO induz a redução de SOD, que por sua vez resulta no aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), fenômeno este importante para a luteólise estrutural (LEE et al., 2010).

OBJETIVO

3 OBJETIVO

Estudar as alterações da concentração plasmática de progesterona, perfusão sanguínea e volume luteais após administração de sub-dose de cloprostenol sódico (análogo da $\text{PGF}_{2\alpha}$) no sexto dia do ciclo estral em bovinos da raça Caracu.

3.1 Hipótese científica

A administração de 83,33 μg (1/6 da dose recomendada) de cloprostenol sódico IM no D6 do ciclo estral causa luteólise parcial.

MATERIAL E MÉTODOS

4 Material e métodos

Este trabalho foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu, no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, em parceria com o Laboratório de Reprodução Animal do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa no período de junho de 2010 a janeiro de 2011.

4.1 Animais e instalações experimentais

Foram utilizadas 18 vacas da raça Caracu adultas com atividade cíclica regular e escore corporal entre 3 e 4 pontos (escala de 0 a 5, HOUGHTON et al., 1990). Durante o experimento os animais permaneceram em piquetes com capim Braquiária (*Brachiaria decubens*), suplementadas com silagem de milho e com sal mineral e água *ad libitum*, seguindo o manejo do Instituto de Zootecnia.

4.2 Módulo experimental

As coletas de dados foram realizadas em três módulos, e cada um representa 48 horas de coleta. Das 18 vacas, sete foram submetidas a sincronização de estro para o primeiro módulo e oito para o segundo. Para compor o terceiro módulo foram utilizadas as três vacas restantes e mais quatro que já tinham sido utilizadas no primeiro módulo (tabela 1).

O início de cada módulo foi marcado pela sincronização da ovulação e as vacas foram consideradas aprovadas quando responderam à sincronização e ovularam entre 24 e 36 horas após a última aplicação de Lecirelina (tabela 1).

Um animal do módulo 1 foi descartado por apresentar comportamento mais agressivo do que os demais, dificultando o manejo e coleta de dados e outro do módulo 3 por apresentar ovulação dupla.

TABELA 1: Número das vacas sincronizadas em cada módulo que responderam ao protocolo e foram utilizadas.

	Sincronizadas*	Aprovadas**	Utilizadas***
Módulo 1	7	7	6
Módulo 2	8	7	7
Módulo 3	8	8	7

*Sincronizadas: animais submetidos ao protocolo de sincronização; **Aprovadas: animais que ovularam entre 24 e 36 horas após a última aplicação de Lecirelina; ***Utilizadas: animais submetidos aos tratamentos.

4.3 Sincronização da ovulação

A cada módulo, os animais selecionados foram submetidos à sincronização do ciclo estral através do seguinte protocolo: Dia -9 (D-9 - início do protocolo): aplicação de 50 µg de Lecirelina (Gestran plus^{®1}; IM) e colocação de dispositivo intravaginal de P4 (DIB^{®2}); D-2,5: aplicação de 500 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio^{®3}, IM); D-2: aplicação de 250 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio[®], IM) e retirada do dispositivo intravaginal de P4; e D0: administração de 50 µg de Lecirelina (Gestran plus[®], IM). Posteriormente a administração da última dose de Lecirelina os ovários de todas as vacas foram examinadas a cada 6 horas até a detecção da ovulação, através de ultrassonografia transretal (Mindray DP 3300 Vet^{®4}) com transdutor de 7,5 MHz (dia da ovulação = dia 1 do ciclo estral).

¹ Gestran Plus[®] – Tecnopec - São Paulo – Brasil

² DIB[®] - Syntex - Argentina

³ Sincrocio: Ouro Fino – São Paulo – Brasil

⁴ Mindray DP 3300 Vet[®] - Shenzhen Mindray Bio – Medical electronics CO Ltd, Keji, China

4.4 Grupos experimentais

Nos três módulos as vacas receberam tratamento no D6 do ciclo estral e dentro de cada módulo foram divididas aleatoriamente entre os tratamentos 1, 2 e 3:

Grupo 1 – Controle D6 (n=6): 2 mL de solução fisiológica (0,9%) IM.

Grupo 2 – Duas doses convencionais no D6 (n=6): 2 doses de 500 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, IM) aplicadas com intervalo de 2 horas.

Grupo 3 – 1/6 da dose convencional no D6 (n=7): 83,33 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, IM).

Devido o pequeno volume da dose a ser administrado no grupo 3 (0,33 mL) está foi diluída em 1,0 mL de solução fisiológica (0,9%).

A determinação do dia do ciclo e a dose de cloprostenol empregados no projeto foram determinadas a partir de estudos anteriores não publicados que testaram as doses de ¼, 1/6 e 1/8 da dose recomendada de cloprostenol pelo fabricante para a indução da luteólise em bovinos. A dose de 1/6 e a sua administração no sexto dia do ciclo estral foram escolhidos por serem a combinação que mais consistentemente desencadeou a diminuição inicial e a posterior recuperação da concentração plasmática da progesterona nos animais tratados.

4.5 Avaliações ultrassonográficas

Imediatamente antes do tratamento (momento 0) e posteriormente a cada 8 horas por 48 horas (momento 48) os animais foram submetidos a avaliações ultrassonográficas transretais nos modos B (usando transdutor multi-frequencial - 5 a 9 Mhz) e Power Doppler (transdutor linear endocavitário de banda larga LV5-9CDn, 60 mm - SONOACE PICO®⁵). O exame ultrassonográfico em modo-B do CL baseou-se nos princípios, técnicas e interpretação descrito por Ginther (1998). Nesse exame realizou-se a avaliação do aspecto geral do corpo lúteo e foi determinado o seu volume empregando-

⁵ SONOACE PICO® - Medison do Brasil Ltda – Brasil

se recurso do próprio equipamento que realiza esse cálculo a partir de três medidas do diâmetro (vertical, horizontal e oblíqua) realizadas na seção de maior tamanho.

A ultrassonografia modo-Power Doppler foi utilizada para avaliar a perfusão sanguínea do CL, de acordo com o descrito por Ginther (2007). Para permitir a comparação dos resultados, o ajuste do equipamento não foi alterado durante todos os módulos experimentais. A perfusão sanguínea do CL foi avaliada de forma subjetiva, levando em consideração a porcentagem (0 a 100%) de tecido luteal com pontos coloridos. No caso de CLs cavitários, o coágulo central não foi levado em consideração durante a avaliação. Os exames ultrassonográficos foram gravados em computador portátil (Acer) por meio da placa de captura de vídeo USB (Pinnacle®⁶) para posterior conferência dos dados obtidos.

4.6 Colheita de sangue e determinação das concentrações plasmáticas de P4.

Após cada exame ultrassonográfico amostras de sangue foram colhidas por punção dos vasos coccígeos utilizando agulha (BD Vacutainer®⁷ 25x8 mm) e tubo de 10 mL heparinizados (BD Vacutainer®), acondicionadas em caixa térmica com gelo, transportadas para o laboratório e imediatamente centrifugadas a 2500 X g por 15 minutos. O plasma obtido foi acondicionado em criotubos de 1,5 mL identificados e armazenado em freezer a -20°C.

As amostras foram quantificadas quanto as concentrações de progesterona pelo método enzimático de imunoquimioluminescência utilizando o *kit* específico (Immulite Progesterone®⁸) para o aparelho Immulite®⁹ 1000 com sensibilidade de 0,2 ng/ml. O coeficiente de variação inter e intra-ensaio foram de 8,1 e 6,8%, respectivamente. As dosagens foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da ESALQ Piracicaba.

⁶ Pinnacle® - Pinnacle Data System, Inc - EUA

⁷ Vacutainer - BD Diagnostics - Preanalytical Systems – São Paulo - Brasil

⁸ Immulite Progesterone®⁸ - DPC – EUA

⁹ Immulite® 1000 – Immunoassay System – Siemens Healthcare Diagnostics Inc - EUA

4.7 Análise estatística

Para análise de dados foram usadas 119 amostras para P4 e perfusão sanguínea, e 116 para volume luteal. Os dados foram submetidos a análise de variância tendo como causa de variação momento e tratamento, conforme procedimento descrito no programa GLM do PASW Statistics® 18. Para diferenças entre as médias foi aplicado o teste TUKEY com 5% de probabilidade.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Sincronização de estro

Das 23 sincronizações de estro realizadas, em 22 (95,65%) foi observada ovulação entre 24 e 30 horas após aplicação da segunda dose de Lecirelina e sendo que em uma delas (1 vaca do módulo 3) ocorreu ovulação dupla

5.2 Concentração plasmática de progesterona, perfusão sanguínea e volume luteal

Os resultados da concentração plasmática de P4, perfusão sanguínea e volume luteais dos grupos experimentais, estão representados na forma de média e erro padrão, respectivamente, nas tabelas 2, 3 e 4 e na forma de média e valores individuais na figuras 1 (Grupo controle – salina), 2 (Grupo luteólise – 2 doses de 500 µg de cloprostenol sódico) e 3 (Grupo luteólise parcial – 83,33 µg de cloprostenol sódico).

Os tratamentos influenciaram as concentrações plasmáticas de P4 (tabela 2) que variou de modo diferente nos três grupos experimentais ($p < 0,001$). Nos animais que receberam injeções intramusculares de solução salina (G1), as concentrações de P4 não se alteraram ao longo do período de observação.

As concentrações de P4 foram influenciadas nos animais que receberam o tratamento 2 (duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico $p < 0,001$); cinco, das seis vacas tratadas, apresentaram a partir de 16h após a administração valores iguais ou menores que a metade dos observados no momento 0 e mantiveram o padrão de diminuição até 48h, quando todas apresentavam P4 abaixo de 1,0 ng/mL. Em uma vaca a P4 diminuiu até 16h e voltou a aumentar ao longo das observações (figura 2). A falha na luteólise observada nesse animal alterou os resultados do grupo que teve ao final do período experimental P4 média de 0,88 ng/mL, que não diferiu da observada no momento 0 ($p > 0,05$). Quando os dados foram analisados excluindo-se esse animal esse efeito

desapareceu e os valores médios da P4 ao final do período experimental, que foram de 0,51ng/mL, foram inferiores dos observados na hora 0.($p<0,05$)

Nos animais que receberam injeções intramusculares de 83,33 µg de cloprostenol sódico, as concentrações de P4 também foram influenciadas pelo tratamento ($p<0,001$); das sete vacas desafiadas, seis apresentaram, 16h após a administração, valores menores que os inicialmente observados. Contudo, a partir desse momento as concentrações voltaram a aumentar alcançando valores semelhantes ou maiores que os inicialmente observados (figura 3). No animal remanescente as concentrações plasmáticas de P4 continuaram a decrescer e no momento 48 encontraram-se abaixo de 1,0 ng/mL. A luteólise total observada nesse animal influenciou os resultados do grupo que teve ao final do período experimental P4 média de 1,80 ng/mL, que não diferia da observada no momento 16 ($p>0,05$), momento em que foram observadas as menores concentrações médias de P4. Quando os dados foram analisados excluindo-se esse animal esse efeito desapareceu e os valores médios da P4 no final do período experimental, que foram de 2,03 ng/mL, foram superiores dos observados na hora 16.($p<0,013$)

Quando analisado perfusão sanguínea luteal, foi observada diferença entre os tratamentos; 1 e 2 ($p<0,001$), e 2 e 3 ($p<0,002$), contudo, entre 1 e 3 não houve diferença (tabela 3). No tratamento 1 e 3 não foram observadas diferenças na perfusão sanguínea entre as horas. No tratamento 2 a perfusão sanguínea diminuiu apenas no momento 48.

O volume luteal foi influenciado apenas pelo tratamento 2 ($p<0,02$); e os valores médios observados nesse grupo no momento 48, foram menores que os inicialmente observados ($p=0,019$). Nos demais grupos o volume luteal manteve-se inalterado ao longo do período experimental ($p>0,05$).

TABELA 2: Valores médios e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) de vacas da raça Caracu após o tratamento no sexto dia do ciclo estral com solução salina (G1), duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com intervalo de 2 horas (G2) e 83,33 µg cloprostenol sódico (G3).

Horas	Grupos				
	G1 ^A	G2 ^{C*}	G2 ^C	G3 ^{B**}	G3 ^B
0	2,47±0,42 ^a	1,57±0,25 ^a	1,72±0,26 ^a	1,97±0,21 ^a	1,98±0,19 ^a
8	2,68±0,49 ^a	0,95±0,16 ^{ab}	1,05±0,17 ^{ab}	1,45±0,12 ^{ab}	1,48±0,10 ^{ab}
16	2,58±0,28 ^a	0,59±0,13 ^b	0,65±0,12 ^b	1,24±0,10 ^b	1,20±0,10 ^b
24	3,30±0,56 ^a	0,57±0,12 ^b	0,73±0,18 ^{ab}	1,73±0,15 ^{ab}	1,64±0,18 ^{ab}
32	3,45±0,35 ^a	0,48±0,08 ^b	0,67±0,21 ^{ab}	1,84±0,16 ^{ab}	1,77±0,19 ^{ab}
40	3,28±0,46 ^a	0,58±0,05 ^b	0,83±0,25 ^{ab}	1,79±0,12 ^{ab}	1,72±0,14 ^{ab}
48	3,59±0,55 ^a	0,51±0,11 ^b	0,88±0,38 ^{ab}	2,03±0,05 ^a	1,80±0,27 ^{ab}

Letras minúsculas na mesma coluna representam diferenças entre momentos ($p < 0,05$) e letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha representam diferenças entre tratamentos ($p < 0,05$). * valores médios e erro padrão excluindo-se os dados de um animal do grupo que não apresentou luteólise. **valores médios e erro padrão excluindo-se os dados de um animal do grupo que apresentou luteólise.

TABELA 3: Valores médios e erro padrão da perfusão sanguínea luteal (%) de vacas da raça Caracu após o tratamento no sexto dia do ciclo estral com solução salina (G1), duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com intervalo de 2 horas (G2) e 83,33 µg cloprostenol sódico (G3).

Horas	Grupos				
	G1 ^A	G2 ^{B*}	G2 ^B	G3 ^{A**}	G3 ^A
0	39,2±5,97 ^a	32,0±3,74 ^a	34,17±3,75 ^a	35,8±5,39 ^a	36,43±2,81 ^a
8	37,5±4,03 ^a	33,0±5,61 ^a	35,00±5,00 ^{ab}	34,2±3,00 ^a	35,00±3,00 ^a
16	35,8±3,00 ^a	27,0±4,06 ^{ab}	29,17±3,96 ^{ab}	30,8±2,39 ^a	32,14±2,39 ^a
24	35,0±4,08 ^a	24,0±2,92 ^{ab}	23,33±2,47 ^{ab}	26,7±5,11 ^a	27,86±4,08 ^a
32	40,0±4,28 ^a	21,0±4,0 ^{ab}	20,00±3,42 ^{ab}	32,5±3,82 ^a	30,71±3,33 ^a
40	37,5±4,41 ^a	15,0±3,16 ^{ab}	16,67±3,07 ^{ab}	33,3±3,57 ^a	33,57±3,35 ^a
48	33,33±4,41 ^a	14,0±3,32 ^b	14,17±2,71 ^b	32,5±4,61 ^a	32,14±3,96 ^a

Letras minúsculas na mesma coluna representam diferenças entre momentos ($p < 0,05$) e letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha representam diferenças entre tratamentos ($p < 0,05$). * valores médios e erro padrão excluindo-se os dados de um animal do grupo que não apresentou luteólise. **valores médios e erro padrão excluindo-se os dados de um animal do grupo que apresentou luteólise.

TABELA 4: Valores médios e erro padrão d volume luteal (cm³) de vacas da raça Caracu após o tratamento no sexto dia do ciclo estral com solução salina (G1), duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico com intervalo de 2 horas (G2) e 83,33 µg cloprostenol sódico (G3).

Horas	Grupos				
	G1 ^A	G2 ^{B*}	G2 ^B	G3 ^{B**}	G3 ^B
0	2,24±0,31 ^a	3,33±0,72 ^a	3,46±0,6 ^a	2,54±0,61 ^a	2,55±0,56 ^a
8	2,78±0,34 ^a	2,12±2,12 ^{ab}	2,28±0,34 ^{ab}	2,12±0,46 ^a	2,09±0,42 ^a
16	2,86±0,40 ^a	1,90±0,10 ^{ab}	1,90±0,10 ^{ab}	1,92±0,23 ^a	1,87±0,21 ^a
24	2,55±0,28 ^a	1,62±0,29 ^{ab}	1,89±0,36 ^{ab}	1,49±0,32 ^a	1,49±0,31 ^a
32	2,83±0,32 ^a	1,5±0,39 ^{ab}	1,75±0,40 ^{ab}	2,23±0,57 ^a	2,30±0,52 ^a
40	3,12±0,32 ^a	1,59±0,50 ^{ab}	1,63±0,39 ^{ab}	2,06±0,31 ^a	2,07±0,22 ^a
48	2,95±0,22 ^a	1,22±0,35 ^b	1,37±0,32 ^b	2,20±0,46 ^a	2,24±0,44 ^a

Letras minúsculas na mesma coluna representam diferenças entre momentos ($p < 0,05$) e letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha representam diferenças entre tratamentos ($p < 0,05$). * valores médios e erro padrão excluindo-se os dados de um animal do grupo que não apresentou luteólise. **valores médios e erro padrão excluindo-se os dados de um animal do grupo que apresentou luteólise.

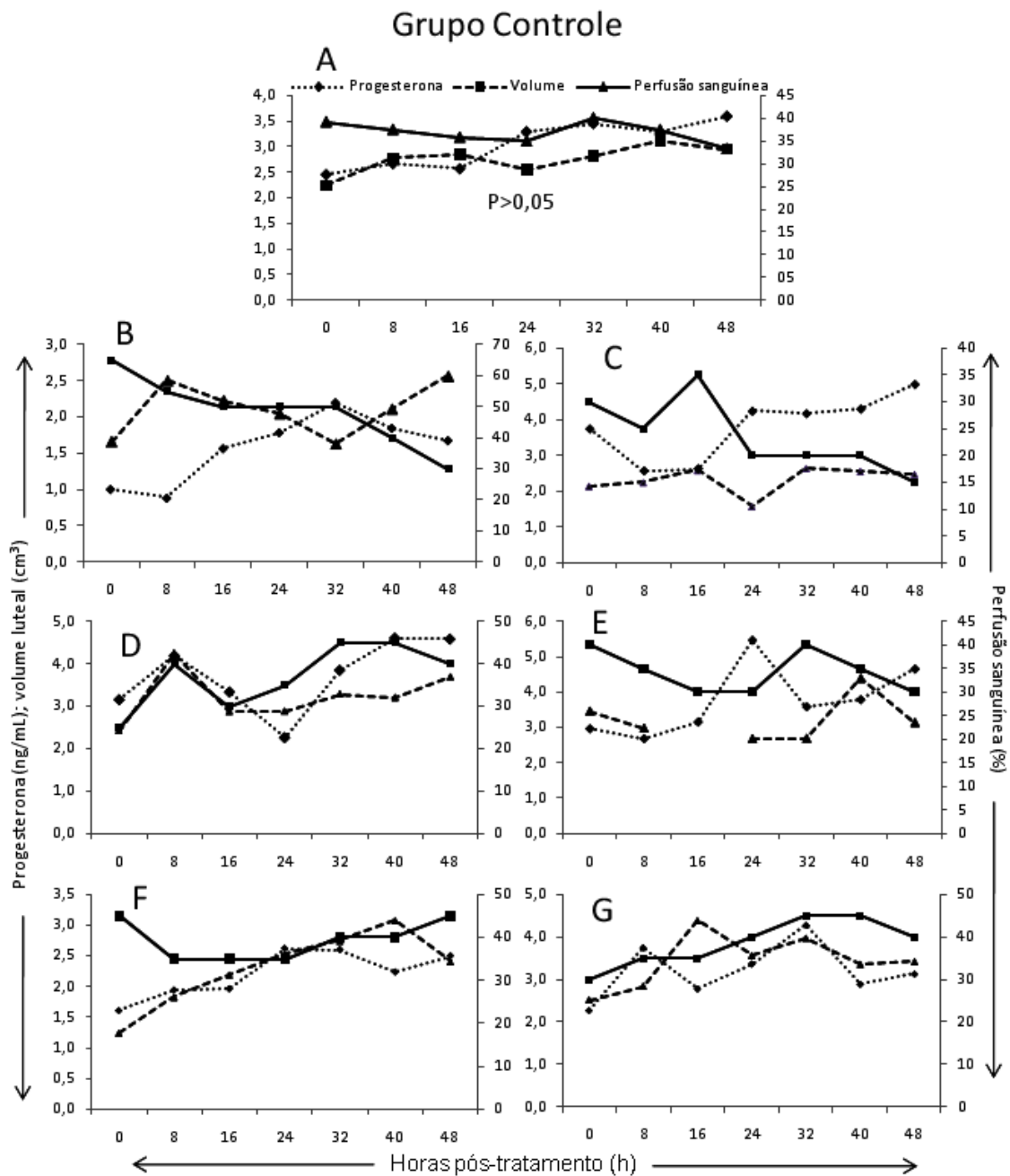


FIGURA 1: Valores médios (A) e individuais (B, C, D, E, F e G) da concentração plasmática de progesterona (ng/mL - ◆·····), volume (cm³- -■- -) e perfusão sanguínea luteais (% - —▲—) de vacas da raça Caracu nos diferentes momentos (horas) após injeção intramuscular de solução salina no D6 (Grupo controle – n=6) .

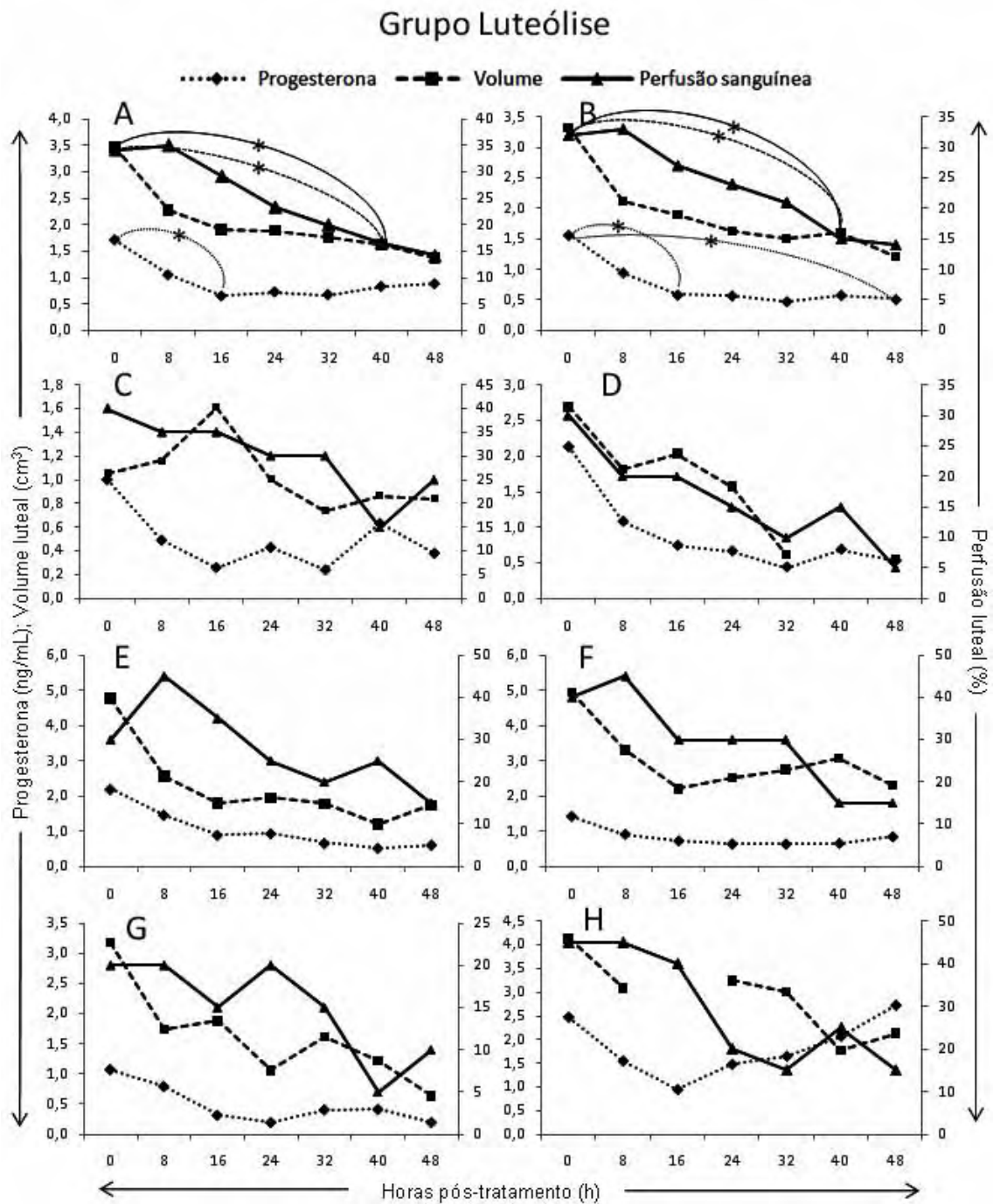


FIGURA 2: Valores médios (A e B – valores médios excluindo-se os dados do animal que não apresentou luteólise) e individuais (C, D, E, F, G e H) da concentração plasmática de progesterona (ng/mL -◆.....), volume (cm³ - -■-) e perfusão sanguínea luteais (% - —▲—) de vacas da raça Caracu nos diferentes momentos (horas) após injeção intramuscular de duas doses de 500 µg de cloprostenol sódico no D6 (Grupo Luteólise n=6) (* = p<0,05).

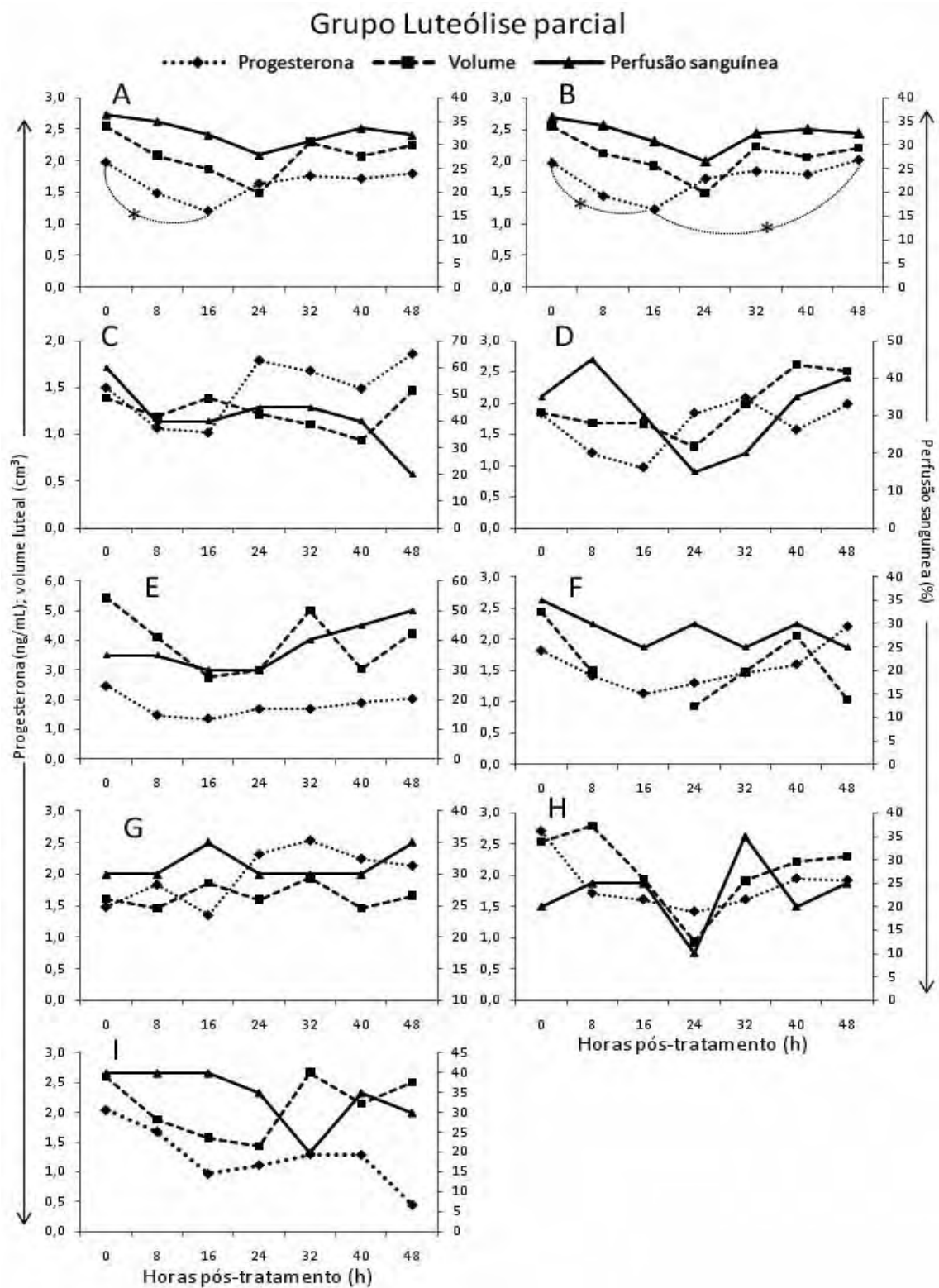


FIGURA 3: Valores médios (A e B – valores médios excluindo-se os dados do animal que apresentou luteólise) e individuais (C, D, E, F, G, H e I) da concentração plasmática de progesterona (ng/mL -◆.....), volume (cm³- --■--) e perfusão sanguínea luteais (% - —▲—) de vacas da raça Caracu nos diferentes momentos (horas) após injeção intramuscular de 83,33 µg de cloprostenol sódico no D6 (Grupo luteólise parcial n=7) (* = p<0,05).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os resultados observados quanto a sincronização da ovulação demonstraram que o protocolo adotado foi eficiente para animais da raça Caracu, sendo que 95,45% dos animais ovularam entre 24 e 30 horas após a indução da ovulação pela administração de Lecirelina. Fricke et al. (1998) observaram uma taxa de ovulação de 83,1 % após a última administração de 50 µg de GnRH, utilizando protocolo "OVSYNCH".

A resposta ao tratamento 2 foi como o esperado; na maioria dos animais (5/6) observou-se a diminuição da P4, perfusão sanguínea e volume luteal ao longo do período experimental. A diminuição da produção de P4 após a administração de PGF2 α ou de seus análogos é explicada pela diminuição da expressão da StAR, da 3 β -HSD e de IGF-1 e IGF-2 (MYAMOTO et al., 2009). A diminuição da vascularização relaciona-se ao aumento da expressão de fatores vasoativos, tais com END1 e ANG II (HAYASHI et al., 1999), e a diminuição do volume luteal é causada pela morte celular, apoptose e degeneração de tecido luteal (NISWENDER et al., 2000; NISHIMURA et al., 2008).

Entretanto, alguns animais individualmente apresentaram respostas inesperadas aos tratamentos experimentais, tais como uma vaca (16,66%) do Grupo 2 (2 doses de 500 µg de cloprostenol sódico) que não apresentou luteólise; apesar da diminuição inicial, a P4 voltou a aumentar alcançando ao final do período experimental concentração plasmática de 2,72 ng/mL.

Resultados semelhantes ao do presente estudo relacionados a ausência de luteólise em fêmeas bovinas submetidas ao tratamento com duas doses de PGF2 α no D5 (95% de luteólise em vacas Angus x Simental ; Bridges et al., 2008) ou uma dose no D7 (75% em novilhas de Holandesas; Pursley et al., 1995) ou no D9 (86,9% em vacas Nelore; Meira et al., 2006) são descritos na literatura científica.

As diferentes respostas luteolíticas observadas no presente estudo podem estar relacionadas a dois fatores; a imaturidade luteínica, e a consequente

insensibilidade às prostaglandinas, ou a sensibilidade individual dos animais a este hormônio.

Wiltbank et al. (1995) observaram que a falta de responsividade do CL inicial (3 – 4 dias pós-ovulação) à PGF 2α , não relaciona-se à deficiência de afinidade dos seus receptores. Outros fatores estão envolvidos na sensibilidade do CL, tais como a expressão intraluteal de ET-1, ETA, StAR, P450scc e COX-2. As expressões desses fatores e enzimas aumentam ao longo da fase luteal. Contudo, a administração de PGF 2α em animais a partir do quinto dia do ciclo estral desencadeia a diminuição da expressão da StAR e P450scc e o aumento da expressão de ET-1, ETA e COX-2. Essas alterações estão, respectivamente, relacionadas com a luteólise funcional e estrutural (MIYAMOTO et al., 2009). Levy et al. (2000) e Chouldhary et al. (2004) em estudo realizados, respectivamente, *in vitro* e *in vivo* confirmaram o achado de Wiltbank et al. (1995) ao observarem que 4 e 24 horas após aplicação de PGF 2α no D4, a expressão desses fatores não diferiu do controle, ao contrário do observado quando aplicada no D10. Levy et al. (2000) ainda constatou que células luteais obtidas de CL inicial incubadas com LH, PGF 2α ou ambos, aumentaram a síntese de P4 após 5 horas. Miyamoto et al. (2009) também relatam que na fase inicial o CL imaturo responde ao desafio com PGF 2α aumentando a sua secreção de P4.

Esses achados sugerem que a falha de luteólise observada neste estudo não relacionou-se a imaturidade luteínica, posto que no animal do grupo 2 que não apresentou luteólise observou-se comportamento oposto, pois a P4 diminuiu inicialmente e posteriormente voltou a aumentar, da maneira característica a observada nos casos de luteólise parcial (figura 2).

A segunda hipótese, a da sensibilidade individual é reforçada pelo comportamento apresentado pela vaca submetida ao tratamento 3 (83,33 μ g de cloprostenol sódico) que apresentou luteólise, ainda que os valores de P4 tenham se tornado menores que 1,0 ng/mL apenas 48 horas após o tratamento. A variabilidade individual foi também observada por Meira et al. (2006) que observou taxas de luteólise de 69,6%, 20,8% e 4% em vacas Nelore no D9 empregando, respectivamente, metade, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{10}$ da dose de luprostiol (Prosolvín®) recomendada pelo fabricante (15 mg)

Semelhante ao observado no grupo Luteólise as concentrações plasmáticas de P4 no grupo Luteólise parcial diminuíram até 16h, quanto atingiram valores próximo a 1 ng/ml; a partir desse momento aconteceu o resgate da função luteínica evidenciado pelo retorno da P4 a valores semelhantes aos observados inicialmente (0h). A recuperação da função secretória do CL é descrita na literatura.

Meira et al., (2006) aplicando $\frac{1}{4}$ da dose convencional de PGF2 α no D9 observaram o mesmo fenômeno em vacas Nelore. Shrestha et al. (2010) também documentaram o fenômeno da recuperação lútea em novilhas holandesas desafiadas no D10 com infusões intra-uterinas contínuas de 0,5 mg de PGF2 α (dinoprost) por 2 h e verificaram que apesar da diminuição da P4 ter inicialmente o mesmo comportamento observado nos animais que tiveram luteólise, com 48 h os valores eram similares aos observados antes do desafio.

Apesar do resgate da função luteal no grupo Luteólise parcial, as concentrações plasmáticas de P4 deste grupo não alcançou valores semelhantes as observadas no grupo Controle 48 horas após tratamento. Esse resultado demonstrou que a recuperação luteínica da capacidade secretória de P4 não foi total até 48 h após o desafio e que o tratamento prejudicou o desenvolvimento normal do CL. Contudo, dos animais desafiados com subdose de PGF2 α , 57,14% (4/7) apresentaram a diminuição inicial e posterior aumento da P4 que atingiu concentrações superiores as inicialmente observadas. Esse padrão de aumento individual da concentração desse hormônio observado durante o período experimental sinaliza a possibilidade que recuperação total do potencial secretório de P4 ocorra após um tempo maior.

As variações médias da perfusão sanguínea e o volume do CL no grupo Luteólise acompanharam as variações observadas na P4 quando os dados foram analisados excluindo-se do grupo o animal que apresentou a recuperação da função luteínica (aumento da P4). Esse acompanhamento contudo foi assíncrono, visto que a P4 apresentou-se diminuída a partir de 16 horas e a perfusão só diminuiu 48 horas após o desafio. De modo semelhante ao observado neste estudo, Ginther (2007) descreveu que animais submetidos a injeções sistêmicas e intra-uterinas de PGF2 α apresentam diminuição da

concentração plasmática P4 24 horas antes de serem observadas variações na perfusão e volume luteais.

O comportamento assíncrono entre P4 e perfusão sanguínea pode também ser observado de modo individual em quatro (80%) animais do grupo 2 que apresentaram luteólise. Em apenas uma (20%) vaca que apresentou luteólise, observou-se sincronia nas alterações observadas entre P4, perfusão sanguínea e volume luteal.

Os valores médios da P4 no grupo luteólise parcial apresentou o menor valor na hora 16, quando a concentração de P4 estava reduzida em 39,4% em relação aos valores iniciais ($p=0,025$). Para os valores médios relacionados à perfusão sanguínea e volume luteal observaram-se os menores valores na hora 24, quando apresentaram redução de 25,41% e 41%, respectivamente; Contudo, essas reduções não foram estatisticamente significativas ($p=0,643$ e $p=0,437$, respectivamente). Ao final do período experimental o valor da P4 foi de 103,4% acima do inicial (tabela 2).

Shrestha et al. (2010) observaram uma redução de quase 50% da P4 24 horas após tratamento com infusão contínua de 0,5 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$, e um aumento de 25% 24 horas após os valores terem alcançado o ponto mínimo.

Analisando individualmente os dados do grupo luteólise parcial foi observado sincronia nas modificações relacionadas a perfusão sanguínea e volume luteal em apenas 2 de 7 animais.

De forma geral os tratamentos influenciaram os grupos, visto a que a P4 foi diferente em todos os tratamentos, contudo, a perfusão sanguínea foi igual entre os grupos luteólise parcial e controle. A permanência inalterada da perfusão sanguínea e volume luteais pode ser um sinal importante de que a luteólise não se completará e que a função lútea será recuperada, pois não foram desencadeados os processos relacionados a luteólise estrutural, que ocorre depois da funcional (GINTHER et al., 2007; MIYAMOTO et al., 2009).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A administração de 1/6 da dose de cloprostenol desencadeou o fenômeno da luteólise parcial em vacas Caracu no D6 do ciclo estral. De maneira geral observou-se nesses animais a diminuição e posterior recuperação da capacidade secretória de P4.

Apesar das alterações iniciais da P4 observadas no grupo luteólise parcial terem sido semelhantes às observadas no grupo luteólise, elas foram reversíveis e, portanto, sinalizam que as modificações luteínicas pós-exposição a PGF não foram completas ou irreversíveis.

A rápida recuperação luteínica (primeiras 32 horas após o tratamento) sugere que o desafio com sub-doses de cloprostenol promoveu de modo temporário e reversível a modificação dos fatores relacionados a diminuição da esteroidogênese luteínica (BERISHA et al., 2010). Contudo, as alterações observadas não devem ter promovido modificações importantes na expressão dos fatores angiogênicos relacionados ao desencadeamento do processo de luteólise estrutural, tais como a diminuição da expressão do VEGF, FGF2, aumento da relação ANPT2/ANPT1 e diminuição do IGF-1, -2 (SHIRASUNA et al., 2010)

Portanto, para a ocorrência do fenômeno da luteólise parcial, e do consequente resgate da função luteal, é importante que as reações intraluteais desencadeadoras do processo luteolítico sejam incompletas.

A produção intraluteal de $PGF2\alpha$ é um importante fator luteolítico, pois retroalimenta as alterações dos fatores vaso ativos, angiogênicos e depressores da esteroidogênese, que por sua vez aumentam ainda mais a produção de $PGF2\alpha$ e assim subsequentemente, até um ponto irreversível a partir do qual CL é funcional e morfológicamente destruído (Acosta e Miyamoto, 2004).

Provavelmente na luteólise parcial a cascata luteolítica é interrompida antes que ocorra uma produção importante de $PGF2\alpha$ intra-luteal.

No período luteolítico observa-se que após aos pulsos de LH acontece uma recuperação transitória da concentração de P4 (GINTHER et al., 2010a). Contudo, a medida que as reações luteolíticas intra-luteais se desenvolvem

essa resposta é progressivamente menor. Essa resposta provavelmente relaciona-se às células luteais pequenas que respondem ativamente a estimulação pelo LH secretando P4 (REKAWIECKI et al., 2005).

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

A dose de 83,33 μg de cloprostenol sódico aplicado no sexto dia do ciclo estral causa luteólise parcial em bovinos da raça Caracu.

A luteólise parcial é caracterizada pela diminuição nas concentrações de P4 nas primeiras 16 horas, seguida do resgate da função luteal nos momentos seguintes; quarenta e oito horas após o desafio com 83,33 μg de cloprostenol sódico a concentração plasmática de P4 retorna a valores semelhantes aos observados inicialmente.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.127-140, 2004.

ACOSTA, T.J.; YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F2a injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v.66, p.651–658, 2002.

ALILA, H.W.; HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. **Biology of Reproduction**, v.31, p.1015-1025, 1984.

AMSELGRUBER, W.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D.; SKOTTNER, A. Immunohistochemical aspects of insulin-like growth factors I and II in the bovine corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.445-451, 1994.

BERISHA, B.; MEYER, H.H.D.; SCHAMS, D. Effect of Prostaglandin F2 Alpha on Local Luteotropic and Angiogenic Factors During Induced Functional Luteolysis in the Bovine Corpus Luteum. **Biology of Reproduction**, v.82, p.940-947, 2010.

BERTAN, C.M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, Ed H; TRALDI, A.S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação de corpo lúteo e na luteólise – revisão de literatura. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.43, n.6, p.824-840, 2006.

BRIDGES, G.A.; HELSER, L.A.; GRUM, D.E.; MUSSARD, M.L.; GESSER, C.L.; DAY, M.L. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v.69, p.843-851, 2008.

BROWN T.A.; BRADEN, T.D. Expression of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 and the effects of IGFBP-2 and -3 in bovine corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**, v.20, p.203-216, 2001.

CAVICCHIO, V.A.; PRU, J.K.; DAVIS, B.S.; DAVIS, J.S.; RUEDA, BO, R; TOWNSON, D.H. Secretion of monocyte chemoattractant protein-1 by

endothelial cells of the bovine corpus luteum: regulation by cytokines but not prostaglandin F2 α . **Endocrinology**, v.143, p.3582-3589, 2002.

CHOUDHARY, E.; COSTINE, B.A.; WILSON, M.E.; INSKEEP, E.K.; FLORES, J.A. Prostaglandin F2 α (PGF2 α) independent and dependent regulation of the bovine luteal endothelin system. **Domestic Animal Endocrinology**, v.27, p.63-79, 2004.

COWLEY, M.A.; RAO, A.; WRIGHT, P.J.; LING, N; MILLAR, R.P.; CLARKE, I.J. Evidence for differential regulation of multiple transcripts of the gonadotropin releasing hormone receptor in the ovine pituitary gland; effect of estrogen. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.146, p.141–149, 1998.

CUNNINGHAM, J.G. 3^aed. Tratado de fisiologia Veterinária. **Editora Guanabara Koogan S.A.** Rio de Janeiro, RJ, 2004.

CUPP, A.S.; STUMPF, T. T.; KOJIMA, F. N.; WERTH, L. A.; WOLFE, M. W.; ROBERSON, M. S.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Secretion of gonadotrophins change during the luteal phase of the bovine oestrous cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or 17 β -oestradiol. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.109-119, 1995.

DIAZ, F.L.; WILTBANK, M.C. Acquisition of luteolytic capacity involves differential regulation by prostaglandin F2 α of genes involved in progesterone biosynthesis in the porcine corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**, v.28 p.172–189, 2005.

FARIN, C.E.; MOELLER, C.L.; MAYAN, H.; GAMBONI, F.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. Effects of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on cell populations in the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.38, p.413-421, 1988.

FERRARA, N., DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial grow factor. **Endocr Rev**; 18; 4-25; 1997.

FIKE, K.E.; KOJIMA, F.N.; LINDSEY, B.R.; BERFELD, E.G.M.; QUINTAL-FRANCO, J.A.; MELVIN, E.J.; ZANELLA, E.L.; WEHRMAN, M.E.; KINDER, J.E. Regulation of frequency of luteinizing hormone pulses by magnitude of acute change in circulating concentration of progesterone of female cattle. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.279–291, 2004.

- FILIPPATOS, G.S.; GANGOPADHYAY, N.; LALUDE, O.; PARAMESWARAN, N.; SAID, S.I.; SPIELMAN, W.; UHAL, B.D. Regulation of apoptosis by vasoactive peptides. **Am J. Physiol Lung. Cell. Mol. Physiol**, v.281, p.749-761, 2001.
- FRICKE, P.M.; GUENTHER, J.N.; WILTBANK, M.C. Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.50, p.1274-1284, 1998.
- GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging and animal reproduction: Cattle, Ed. OJ Ginther. Cross Plains: **Equiservices Publishing**, 1998.
- GINTHER, O.J. Producing color-flow images. In Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography, Ed. OJ Ginther. Cross Plains: **Equiservices Publishing**, 2007.
- GINTHER, O.J.; SILVA, L.A.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Temporal Associations among Pulses of 13,14-Dihydro-15-keto-PGF₂^{alpha}, Luteal Blood Flow, and Luteolysis in Cattle. **Biology of Reproduction**, v.76, p.506–513, 2007.
- GINTHER, O.J.; SILVA, L.A.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Necessity of sequential pulses of prostaglandin F₂^α for complete physiologic luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, p.641-648, 2009.
- GINTHER, O.J.; FUENZALIDA, M.J.; SHREATHA, H.K.; BEG, M.A. Concomitance of luteinizing hormone and progesterone oscillations during the transition from preluteolysis to luteolysis in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, 2010a.
- GINTHER, O.J. SHREATHA, H.K.; BEG, M.A. Circulating hormone concentration within a pulses of a metabolite of prostaglandin F₂^α during preluteolysis and early luteolysis in heifer. *Animal Reproduction Science*, v.122, p.253-258, 2010b.
- HANNAN, M.A. FUENZALIDA, M.J.; SIDDIQUI, M.A.R.; SHAMSUDDIN, M.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Diurnal variation in LH and temporal relationships between oscillations in LH and progesterone during the luteal phase in heifers. **Theriogenology**, v.74, p.1491–1498, 2010.
- HANSEL, W.; DOWD, J.P. New concepts of the control of corpus luteum function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.78, p. 755-768, 1986.

- HAYASHI, K.; MIYAMOTO, A. Angiotensin II interacts prostaglandins F2 α and endothelin-1 as a local luteolytic factor in the bovine corpus luteum *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.60, p.1104-1109, 1999.
- HAYASHI, K. MIYAMOTO, A.; BERISHA, B.; KOSMANN, M.R.; OKUDA, K.; SCHAMS, D. Regulation of angiotensin II proction and angiotensin receptor in microvascular endothelial cells from bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.62, p.162-167, 1999.
- HINCKLEY, S.T.; MILVAE, R.A.; Endothelin-1 mediates prostaglandin F2 α -induced luteal regression in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1619-1623, 2001.
- HOUGHTON, P. L.; LEMENAGER, R. P.; MOSS, G. E.; AND HENDRIX, K. S. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1428-1427, 1990.
- JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; HOU, X.; DAVIS, J.S.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, p.1272–1281, 2009.
- KAWATE, N. Studs on the regulation of expression of luteinizing hormone receptor in ovary and the mechanism of follicular cyst formation in ruminants. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, p.1-8, 2004.
- KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W.M.; SCHAMS, D. Production and localisation of angitensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with a luteal angiogenic factors and prostaglandins F2 α . **Journal of Endocrinology**, v.170, p.369-380, 2001.
- LEE, S.; ACOSTA, T.J.; NAKAGAWA, Y.; OKUDA, K. Role of nitric oxide in the regulation of superoxide dismutase and prostaglandin F2 α production in bovine luteal endothelial cells. **Journal of Reproduction and Development**, v.56, p.454-459, 2010.
- LEVY, N.; KOBAYASHI, S.; WOLFENSON, D.; MIYAMOTO, A.; MEIDAN, R.; Adminstration of Prostaglandin F2 α during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and of its type A receptor: a possible

- cause for corpus luteum refractoriness. **Biology of Reproduction**, v.63, p.377-382, 2000.
- MARTIN, I.; FERREIRA, J.C.P. Fisiologia da ovulação e formação do corpo lúteo bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, p.270-279, 2009.
- MEIRA, C.; PESSOA, V.M.; FERREIRA, J.C.P.; ARAUJO, G.H.; GIOSO, M.M.; BICUDO, S.D.; OBA, E.; ORLAND, C. Alternative low doses and routes of administering a prostaglandin F₂ α analogue to induce luteolysis in Nelore cows. **Journal of Veterinary Science**, v.7, p.387-390, 2006.
- MILVAE, R.A.; HINCHLEY, S.T.; CARLSON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v.45, p.1327-1349, 1996.
- MILVAE, R. Inter-relationship between endothelin and prostaglandin F₂ α in corpus luteum function. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.1-5, 2000.
- MIYAMOTO, A. SHIRASUNA, K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B.; WATANABE, S.; HAYASHI, M.; YAMAMOTO, D.; MATSUI, M.; ACOSTA, T.J. Blood flow: a key regulatory components of corpus luteum function in cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p.329-339, 2005.
- MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; SASAHARA, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: impact of angiogênico and vasoactive factor. **Domestic Animal Endocrinology**, v.37, p.159-169, 2009.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Review**, v.43, p.109-142, 1991.
- NEUFELD, G.; COHEN, T.; GENGRINOVITCH, S.; PLTORAK, Z. Vascular endothelial growth factor and its receptor. **The FASEB Journal**, v.13, p.9-22, 2000.
- NEUVIANS, T.P.; PFAFFL, M.W.; BERISHA, B.; SCHAMS, D.; The mRNA expression of the members of the IGF-system in bovine corpus luteum during induced luteolysis. **Domestic Animal Endocrinology**, v.25, p.359-372, 2003
- NEUVIANS, T.P.; SCHAMS, D.; BERISHA, B.; PFAFFL, M.W. Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F₂ α -induced luteolysis in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.70, p.473-480, 2004.

- NISHIMURA, R.; KOMIYAMA, J.; TASAKI, Y.; ACOSTA, T.J.; OKUDA, K. Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum, **Biology of Reproduction**, v.78, p.529-536, 2008.
- NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYSON, M.K.; McINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v.80, p.1-29, 2000.
- NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. Review. **Reproduction**, v.123, p.333-9, 2002.
- NOTHNICK, W.B.; PATE, J.L. Interleukin-1 β is a potent stimulator of Prostaglandin synthesis in bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**, v.43, p.898-903, 1990.
- PERERA-MARÍN, G.; GUTIÉRREZ, C.G.; MURCIA, C.; GONZÁLEZ-PADILLA, G. Progesterone and the distribution of pituitary gonadotropin isoforms in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.164–176, 2008.
- PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2α and GnRH. **Theriogenology**, v.44, p.915-932, 1995.
- REKAWIECKI, R. NOWIK, M.; KOTWICA, J. Stimulatory effect of LH, PGE 2 and progesterone on Star protein, cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3 β hydroxysteroid dehydrogenase gene expression in bovine luteal cells. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v.78, p.169-184, 2005.
- RENSIS, F. DE.; LÓPES-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; TECHAKUMPU, M. Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: An update. **Theriogenology**, v.73, p.1001–1008, 2010.
- REYNOLDS, LP.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D. Angiogenesis in the corpus luteum, **Endocrine**, v.12, p.1-9, 2000.
- ROBINSON, R.S.; HAMMOND, A.J.; WATHES, D.C.; HUNTER, M.G.; MANN, G.E. Corpus luteum–endometrium–embryo interactions in the dairy cow: Underlying mechanisms and clinical relevance. **Reproduction in Domestic Animal**, v.43, p.104–112, 2008.
- ROBINSON, R.S.; WOAD, K.J.; HAMMOND, A.J.; LAIRD, M.; HUNTER, M.G.; MANN, G.E. Angiogenesis and vascular function in the ovary. **Reproduction**, v.138, p.869-881, 2009.

SAUERWEIN, H.; MIYAMOTO, A.; GUNTHER, J.; MEYER, H.H.D.; SCHAMS, D. Binding and action of insulin-like growth factors and insulin in bovine luteal tissue during the oestrus cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.96, p.103-115, 1992.

SAYRE, B.L.; TAFT, R.; INSKEEP, E.K.; KILLEFER, J. Increased expression of insulin-like growth factors binding protein-1 during induced regression of bovine corpora lutea. **Biology of Reproduction**, v.63, p.21-29, 2000.

SCHAMS, D.; BERISHA, B.; KOSMANN, M.; EINSPANIER, R.; AMSELGRUBER, W.M. Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.17, p.279-285, 1999.

SCHAMS, D.; BERISHA, B.; Regulation of corpus luteum function in cattle-an overview. **Reproduction Domestic Animals**, v.39, p.241-251, 2004.

SCOT CONSULTORIA. www.scotconsultoria.com.br/noticia. acesso: 20 de dezembro de 2010.

SHIRASUNA, K.; ASAOKA, H.; ACOSTA, T.J.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B.; AHTANI, M.; HAYASHI, M.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Real-time relationship in intraluteal release among prostaglandin F₂ α , endothelin-1, and angiotensin II during spontaneous luteolysis in the cow. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1706-1711, 2004.

SHIRASUNA, K.; WATANABE, S.; ASAHI, T.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B.; SASAHARA, K.; JIANG, C.; MATSUI, M.; SASAKI, M.; SHIMIZU, T.; DAVIS, J.; MIYAMOTO, A. Prostaglandin F₂ α increase endothelial nitric oxide synthase in the periphery of the bovine corpus luteum: the possible regulation of blood flow at an early stage of luteolysis. **Reproduction**, v.135, p.527-539, 2008.

SHIRASUNA, K.; SASAHARA, K.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A. Prostaglandin F₂ α differentially affects mRNA expression relating to angiogenesis, vasoactivation and prostaglandins in the early and mid corpus luteum in the cow. **Journal of Reproduction and Development**, v.56, p.428-436, 2010a.

SHIRASUNA, K.; ASAHI, T.; SASAKI, M.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A. Distribution of arteriovenous vessels, capillaries and eNOS expression in the

- bovine corpus luteum during the estrous cycles: a possible implication of different sensitivity by luteal phase to PGF₂ α in the increase of luteal blood flow. **Journal of Reproduction and Development**, v.56, p.124-130, 2010b.
- SHRESTHA, H.K.; BEG, M.A.; SIDDIQUI, M.A.R.; GINTHER, O.J. Dynamic progesterone responses to simulation of a natural pulses of a metabolite of prostaglandin F₂ α in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.118-123, 2010.
- SIANANGAMA, P.C.; RAJAMAHENDRAN, R. Effect of human chorionic gonadotropin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. **Theriogenology**, v.38, p.85-96, 1992.
- SKARZYNSKI, D.J.; JAROSZEWSKI, J.; BAH, M.M.; DEPTULA, K.M.; BARSZCZEWSKA, B.; GAWRONSKA, B.; HANSEL, W. Administration of a oxide nitric synthase inhibitor counteracts prostaglandins F₂-induced luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1674-1681, 2003.
- STIRLING, D.; WATERMAN, M.R.; SIMPSON, E.R. Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.91, p.1-8, 1991.
- TANAKA, J.; ACOSTA, T.J.; BERISHA, B.; TETSUKA, M.; MATSUI, M.; KOBAYASHI, S.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Relative change in mRNA expression of angiopoietins and receptors Tie in bovine corpus luteum during estrus cycle and prostaglandin F₂ α -induced luteolysis: A possible mechanism for the initiation of the luteal regression. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, p.619-626, 2004
- TANIKAWA, M.; ACOSTA, T.J.; FUKUI, T.; MURAKAMI, S.; KORZEKWA, A.; SKARZYNSKI, D.J.; PIOTROWSKA, K.K.; PARK, C.K.; OKUDA, K Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin - 1 α in bovine endometrium during estrous cycle. **Prostaglandins & Other Lipid Mediator.**, v.78, p.279-290, 2005.
- WAITE, A.L.; HOLTEN, D.W.; STORMSHAK, F. Changes in bovine luteal progesterone metabolism in response to exogenous prostaglandin F₂ α . **Domestic Animal Endocrinology.**, v.28, p.162-171. 2005.
- WEBER, D.M.; FIELDS, P.A.; ROMRELL, L.J.; TUMWASORN, S.; BALL, B.A.; DROST, M.; FIELDS, M. Functional differences between small and large luteal

cells of the late-pregnant vs. Nonpregnant cow. **Biology of Reproduction**, v.37, p.685-697, 1987.

WEEMS, Y.S.; NETT, T.M.; RISPOLI, L.A.; DAVIS, T.L.; JOHNSON, D.L.; UCHIMA, T.; RANEY, A.; LENNON, E.; PANG, J.; HARBERT, T.; BOWERS, G.; GOTO, K.; ONG, A.; TSUTAHARA, N.; RANSEL, R.D.; WEEMS, C.W. Prostaglandin E1 (PGE₁), but not prostaglandin E2 (PGE₂), alters luteal and endometrial luteinizing hormone (LH) occupied and unoccupied LH receptors and mRNA for LH receptors in ovine luteal tissue to prevent luteolysis. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v.91, p.42-50, 2010

WILTBANK, M.C. Cell type and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. **Journal of Animal Science**. v.71, p.1873-1883, 1994.

WILTBANK, M.C.; SHIAO, T.F.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Prostaglandin F₂α receptor early bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.52, p.74-78, 1995.

10 TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho enviado para o periódico “**Ciência rural**”

Normas para publicação disponível em :

<http://www.ufsm.br/ccr/revista/normas.htm>.

Luteólise em bovinos**Luteolysis in cattle****Eduardo Trevisol^{10*} João Carlos Pinheiro Ferreira¹ Camila Louise Ackermann¹ Flavia Caroline****Destro¹ Jackson Barros do Amaral¹¹****-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-****RESUMO**

A cascata luteolítica inicia-se com o aumento da expressão de receptores endometriais de ocitocina pelo estradiol folicular. Nos animais não gestantes a ligação e estimulação desses receptores pela ocitocina hipofisária e luteal desencadeia a secreção endometrial de $PGF2\alpha$. A mesma alcança a circulação ovariana e no corpo lúteo modifica a expressão de fatores angiogênicos (VEGF, FGF, ANPT-1 e 2, IGF e IGFBP) e vasoativos (EDN1, Ang e NO). Esses fatores inicialmente interagem com a $PGF2\alpha$ para diminuir a capacidade do CL de secretar progesterona (lúteolise funcional) e posteriormente causar uma séria de alterações locais que resultam em apoptose e destruição do tecido luteal (luteólise estrutural).

Palavras-chaves: luteólise, fatores angiogênicos, vasoativos, bovinos.

ABSTRACT

The luteolysis began with ocitocin endometrial receptors expression increase by follicular estradiol. In non pregnant females the receptors binding and stimulation by hypophyseal and luteal ocitocin are responsible for the initial $PGF2\alpha$ endometrial secretion. This hormone goes to

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Distrito Rubião Jr, s/n, - 18.618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil. Email: duveio@yahoo.com.br. *Autor de correspondência.

¹¹ Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal, Instituto de Zootecnia. Rua Heitor Penteado, 56 -13460-000, Nova Odessa, São Paulo, Brasil. Email: jackson@iz.sp.gov.br.

the ovarian circulation and modifies the angiogenic (VEGF, FGF, ANPT-1 e 2, IGF e IGFBP) and vasoactive (EDN1, Ang e NO) factors expression in corpus luteum. These factors initially interact with PGF2 α for decrease the CL capacity of progesterone secretion (functional luteolysis) and posteriorly cause local modifications resulting luteal tissue destruction and apoptosis (structural luteolysis).

Key words: luteolysis, angiogenic factors, vasoactive cattle.

INTRODUÇÃO

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina temporária que tem como principal função a secreção de progesterona, responsável pela preparação do útero para o início e manutenção da gestação (SIQUEIRA et al., 2008). Existem dois tipos de células que compõem o CL, as células esteroidogênicas e as células não esteroidogênicas, que são os fibroblastos, células do sistema imune, endotélio e músculos lisos (O'SHEA et al. 1989).

Nos bovinos o CL sofre regressão morfológica e funcional entre 15 a 17 dias após a ovulação devido a secreção endometrial de PGF2 α (THATCHER et al., 1986). A luteólise funcional é caracterizada pelo rápido declínio nas concentrações plasmáticas de progesterona nas primeiras 8 a 12 horas após a secreção de PGF2 α (GINTHER et al., 2010a). A luteólise estrutural relaciona-se com a diminuição de tamanho e perda de peso do CL em consequência da apoptose das suas células (NEUVIANS et al., 2003, TANIKAWA et al., 2005).

O CL bovino produz vários fatores angiogênicos, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), angiopoetina (ANPT-1 e -2) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), responsáveis pela formação de novos vasos sanguíneos; também possui fatores vasoativos como endotelina-1 (EDN1), angiotensina II (Ang II) e o óxido nítrico (NO), responsáveis pelo fluxo sanguíneo. Estes fatores participam da

regressão luteal promovendo aumento de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou diminuição de P4 (MIYAMOTO et al., 2005).

O objetivo deste trabalho é revisar o envolvimento dos fatores angiogênicos e vasoativo no processo de luteólise em bovinos.

PROSTAGLANDINA

As prostaglandinas (PGs) são importantes mediadores de várias funções reprodutivas na fêmea incluindo luteólise, ovulação e reconhecimento materno da gestação. O endométrio bovino secreta PGEs e $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante todo o ciclo estral, mas o padrão de secreção modifica-se ao longo desse. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ tem sido identificada como luteolítico natural em várias espécies de mamíferos (WAITE et al., 2005). Produzida no endométrio, alcança a circulação venosa uterina e por meio de mecanismo contra-corrente (que envolve transporte ativo), passa ao sistema arterial ovariano, onde produz vasoconstrição e, conseqüentemente, luteólise (CUNNINGHAM, 2004).

Nos bovinos, entre os dias 15 e 17 do ciclo, período crítico de iniciação da luteólise, ocorre importante aumento da secreção endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$ na ausência de um embrião viável (TANIKAWA et al., 2005). Contudo, quando estabelecida a prenhez, as prostaglandinas E1 e E2 desempenham importante função de manutenção do corpo lúteo evitando a queda de P4. Em ovelhas o PGE_1 aumenta os receptores de LH no tecido caruncular e luteal, prevenindo a conversão de PGE_2 em $\text{PGF}_{2\alpha}$ (WEEMS et al., 2010)

A luteólise é desencadeada pelo aumento da amplitude dos pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Inicialmente observam-se picos (2-3) de secreção que elevam a concentração plasmática de PGFM a valores $>100-125$ pg/mL. Subseqüentemente, observa-se grande aumento da magnitude do pulso e a PGFM alcança valores em torno de 550 pg/mL. Nesse momento o fluxo sanguíneos ovariano e a síntese de P4, que já se encontram em declínio, apresentam súbita elevação por duas horas e voltam a declinar progressivamente até a P4 alcançar valores menores

que 1 ng/mL. Durante o período de declínio continuam acontecendo picos de secreção de PGF 2α , contudo a amplitude dos mesmos diminui progressivamente. Os pulsos sequenciais acontecem a cada 9-12 horas, duram em média 4 horas e o processo todo tem duração aproximada de 30 horas (MIYAMOTO et al., 2005; GINTHER et al., 2007; GINTHER et al., 2010b).

As rápidas alterações observadas no padrão de secreção de P4 durante a luteólise não são acompanhadas de modificações do CL que somente após 12 horas tem seu volume reduzido pela metade (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004).

O corpo lúteo dos bovinos possui receptores específicos para PGF 2α , contudo a afinidade desses receptores é maior entre o 13° ao 20°. A administração de PGF 2α em ovelhas e novilhas na fase média do ciclo estral causa, de 4 a 12 horas após sua administração, diminuição significativa no mRNA luteínico da proteína reguladora aguda da esteroidogênica (StAR), responsável pelo transporte de colesterol citoplasmático para o interior da mitocôndria (WAITE et al., 2005).

A ligação da PGF 2α a seus receptores na membrana das células luteais esteroidogênicas também estimula a atividade da Proteína Kinase C, que interrompe a produção de P4 de diversas maneiras: diminuindo a captação e o transporte de colesterol para o citoplasma e para a mitocôndria, promovendo retroalimentação negativa dos receptores de LH e, possivelmente, aumentando a expressão e ativação das proteínas envolvidas nos processos de apoptose (revisado por BERTAN et al., 2006).

O fator de necrose tumoral (TNF α) tem efeitos estimulatórios na liberação de PGF 2α na fase lútea tardia do ciclo e interfere na produção *in vitro* de progesterona por células luteínicas bovinas. A exposição endometrial simultaneamente ao TNF α e OT apresenta efeito estimulatório sobre a liberação de PGF 2α (MIYAMOTO et al. 2000). Outra citocina a estimular a produção de PGF α é a interleucina-1 β (IL-1 β), porém a progesterona em alta concentração inibe esse efeito (NOTHNICK & PATE, 1990).

Outra substância que tem participação no processo de regressão do CL é a proteína quimiotática para monócito-1(MCP-1); presente nas células endoteliais de corpo lúteo bovino, é responsável pela migração de células imune (monócitos, macrófagos e linfócitos T) do sangue. O aumento desta proteína ocorre no momento da luteólise influenciado pelo TNF α e IFN- γ e não pela PGF2 α (CAVICCHIO et al., 2002).

OCITOCINA

Em vacas a aplicação de ocitocina (OT) exógena causa a liberação de PGF2 α e a regressão prematura do CL. Contudo, isso só ocorre a partir do dia 15 do ciclo estral, época esperada da luteólise, devido à expressão dos receptores endometriais de ocitocina (ROBINSON et al., 2001).

Há relatos de quantidades relativamente grandes de ocitocina no CL de vacas. A administração de diversos análogos de PGF2 α causa elevação de ocitocina plasmática que atinge pico em 15-20 mim. A partir de estudos realizados em ovinos, hipotetizou-se a elevação de ocitocina tinha origem na secreção do CL. Estudos posteriores realizados em ovelhas e vacas mostraram que o gene para ocitocina era totalmente expresso no CL em desenvolvimento logo após ovulação, confirmando assim que a síntese de ocitocina ocorria no CL de ruminantes (revisado por McCracken, 1999).

Assim, a PGF2 α estimula a secreção de ocitocina pelo CL e a ocitocina, por sua vez, estimula a secreção de PGF2 α no útero. Esses dois hormônios compreendem um mecanismo de retroalimentação positiva que atua entre o útero e o CL para reforçar a regressão luteal. Contudo, existem evidências de que, no início da fase lútea, a ocitocina pode ser um importante fator luteotrópico (SHIRASUNA et al., 2007).

O mecanismo responsável pela produção de PGF2 α é consequente à ligação da OT com seus receptores específicos no útero, que ativa a fosfolipase C e a liberação de inositol fosfatase (IP) e diacilglicerol (DAG), fazendo com que ocorra uma mobilização intracelular de Ca²⁺, acompanhada pelo aumento da secreção de PGF2 α (DURAS et al., 2005).

Entre os dias 17-20 do ciclo encontra-se pequena quantidade de OT no CL em relação a outros dias do ciclo, porém neste mesmo período há uma maior expressão de mRNA para receptor de OT (OTR; REKAWIECKI et al., 2010) As concentrações de OT no CL têm a queda acentuada (cerca de 90%) em 0,5 e 2 horas após a aplicação de PGF2 α , enquanto a expressão mRNA para recetores OTR, tem a queda 2 horas após (BERISHA et al., 2010).

ESTRADIOL

A participação do estradiol na luteólise ocorre por duas maneiras. A primeira através de estímulo hipotálmico, que irá aumentar a frequência de pulsos de OT. O segundo é através de estímulos endometriais fazendo com que aumentem a expressão de receptores para OT no mesmo (McCRACKEN et al., 1999). Estudos demonstraram que baixas concentrações de estradiol estimulam o desenvolvimento de receptores para OT, já altas concentrações não apresentam o mesmo efeito (LAMMING & MANN, 1995).

Os dois tipos de receptores de estrógenos, ER α e ER β , são expressos no CL. Os ER α estão presentes em elevadas concentrações durante toda a fase lútea, exceto no momento da luteólise, quando seus níveis apresentam-se reduzidos. Os ER β apresentam comportamento semelhante, contudo, seus níveis de expressão continuam elevados no momento da luteólise. Esta queda na expressão de ER α no momento da regressão pode estar envolvida na progressão da luteólise estrutural (MARTIN, 2009; SHIBAYA et al., 2007).

FATORES ANGIOGÊNICOS

O CL é um órgão altamente vascularizado e que produz vários fatores angiogênicos. A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos através da migração e proliferação de células endoteliais oriundas de vasos pré-existentes, e também está relacionada com o fluxo sanguíneo e produção hormonal (REBINSON et al., 2009).

O VEGF é um importante fator de regulação da angiogênese sendo um potente mitogênico para as células endoteliais, induzindo à migração, diferenciação e proliferação

destas, participando também na maturação, estabilização e permeabilidade dos vasos sanguíneos (FERRARA & DAVIS-SMYTH, 1997; NEUFELD, et al., 2000).

No CL bovino são encontrados todos os componentes do sistema VEGF, tanto durante o ciclo estral quanto na prenhez. A concentração deste fator de crescimento é significativamente mais alta durante a fase lútea inicial, decrescendo durante a fase final apresentando queda acentuada na fase de luteólise. A proteína VEGF é predominantemente encontrada nas células luteínicas e seus receptores (VEGF-1 e VEGF-2) são encontrados nas células endoteliais, indicando que o VEGF deve agir na quimiotaxia das células endoteliais para a formação de novos vasos sanguíneos (SCHAMS & BERISHA 2004; YAMASHITA et al., 2008).

Quando a expressão de VEGF, VEGF-R1 e VEGF-R2 foi analisada durante a luteólise induzida na fase luteal média (dia 8-10), notou-se declínio progressivo 12 horas após a aplicação de PGF2 α , demonstrando que o sistema VEGF tem participação na regressão estrutural do CL (NEUVIANS, et al., 2004).

O FGF também é um importante fator angiogênico e atua na transformação, diferenciação e proliferação celular, mediadas pela sua alta afinidade com receptores tirosina Kinase codificados por 5 genes distintos (FGFR-1 a FGFR-5; SLEEMAN et al., 2001; MIYAMOTO et al., 2009).

Vários FGF estão presente no CL bovino. Baseado nos padrões de expressão de seus receptores (FGFR), concluiu-se que estes provavelmente não estão envolvidos somente na angiogênese luteal, que ocorre principalmente no início do ciclo estral, mas também afetam a produção de progesterona e inibem a morte de vários tipos de células (REYNOLDS et al., 2000).

O FGF-2, que apresenta-se em maior quantidade nas células endoteliais na fase inicial do desenvolvimento luteínico e exclusivamente nas células luteais na fase intermediária (REYNOLDS & REDMER 1998), parece ser um importante regulador parácrino/autócrino, pois quando infundido no CL bovino influencia a secreção de progesterona e OT (MIYAMOTO et al., 1992)

Neuvians et al. (2004) estudando a expressão de FGF no momento da luteólise induzida em bovino na fase luteal média (dia 8-10) verificaram que após a aplicação de PGF2 α ocorreu um aumento progressivo de FGF-1 e -2 até 12 h; a partir desse momento houve diminuição das concentrações que retornaram aos valores iniciais. Contudo, nos microvasos luteais de maiores diâmetros os FGFRs são mantidos durante a regressão lútea (REYNOLDS et al., 2000).

A expressão para FGF-2 pode ser estimulada pela angiotensina II *in vitro* (STIRLING et al., 1991), que por sua vez regula positivamente a produção de angiotensina II e estimula a secreção de PGF2 α nas células luteais bovina na fase inicial *in vitro* (KOBAYASHI et al., 2001).

As angiopoetinas (ANPT-1 e ANPT-2) e seus respectivos receptores tirosina quinase (Tie1 e Tie2) também apresentam funções importantes na angiogênese, modulando e estabilizando os vasos sanguíneos. A expressão para ANPT-1 é baixa no começo da fase luteal, aumenta nas fases média e final, voltando a diminuir na luteólise. Ao contrário a ANPT-2 mantém-se constante ao longo de toda fase luteínica, elevando a relação ANPT-2/ANPT-1 no momento da regressão do CL. A expressão de Tie2 decresce significativamente durante a luteólise e a Tie1 se mantém alta. Esses resultados sugerem que o sistema ANPT-Tie é um importante regulador dos mecanismo de regulação da angiogênese e regressão do CL bovino (TANAKA, et al., 2004).

A ANPT-1 é necessária para manter e estabilizar os vasos sanguíneos, enquanto a ANPT-2 age como um antagonista para ANPT-1. A baixa relação ANPT-1/ANPT-2 induz a desestabilização de vasos sanguíneos, sendo esta um pré-requisito para a angiogênese, no início da fase luteal, e regressão do CL (SCHAMS & BERISHA, 2004).

A administração de PGF2 α estimula a expressão mRNA de ANPT-2, e diminui de mRNA de ANPT-1. A consequente elevação da ANPT-2 inibe a secreção luteínica de P4 e desestabiliza os vasos sanguíneos. O ambiente de baixa relação ANPT-1/ ANPT-2 promove a instabilidade dos microvasos e favorece a regressão do CL (TANAKA et al., 2004).

Os componentes do sistema IGF têm participação importante no desenvolvimento folicular e luteínico. Este sistema é composto por dois tipos de peptídeos (IGF-1 e IGF-2), um receptor (IGFR-1), seis proteínas de ligação (IGFBP-1 a 6) e uma enzima de degradação (SPINCER & ECHTERNKAMP, 1995; NEUVIANS et al., 2003).

IGF-1 é encontrado em células luteais grandes e pequenas e em quantidade limitada nas células endoteliais; o IGF-2 não é observado nas células luteais, mas é encontrado em periócitos de capilares e em fibroblastos perivasculares de grandes vasos sanguíneos (AMSELGRUBER et al., 1994). No tecido luteal a IGF-1 e -2 têm efeitos estimulatórios sobre a secreção de progesterona e ocitocina em vacas (SAUERWEIN et al., 1992).

As proteínas IGFBP regulam a concentração livre de IGF, influenciam a interação entre IGF e seus receptores e, conseqüentemente, podem estimular ou inibir a ação do IGF assim como o seu armazenamento. Todos os tipos de IGFBP (1-6) foram encontrados no CL de bovinos. As IGFBP-3,-4 e -5 têm suas expressões aumentadas durante a fase lútea inicial, com tendência a diminuir em seguida (SCHAMS et al.,1999). As IGFBP-1,-2 e -3 inibem o efeito estimulatório do IGF-1 sobre a produção de progesterona *in vitro*, provavelmente por inibirem a interação deste com o IGFR-1 (SAYRE, et al., 2000; BROWN & BRADEN, 2001).

Este parece ser um importante mecanimo regulador da lúteólise pois o IGF-1 luteínico diminui meia hora após a administração intra uterina de PGF2 α mantendo-se em baixas concentrações até 64 horas. Ao mesmo tempo a expressão mRNA para IGFBP-1 aumenta após 2 horas e se mantém alta até 24 horas após a PGF2 α (BERISHA et al., 2010).

FATORES VASOATIVOS

Os fatores vaso ativos apresentam funções no CL bovino, tanto na sua formação quanto na regressão. A Endotelina-1 (EDN1) é um potente vasoconstritor produzidos pelas células endoteliais. Este peptídeo liga-se a dois subtipos distintos de receptores acoplados a proteína G: receptor de endotelina tipo A (ETR-A) e receptor de endotelina tipo B (ETR-B; MIYAMTO et al., 2009).

Durante o ciclo estral a expressão da EDN1 é alta após a ovulação, decresce durante as fases luteais média e final e aumenta novamente após a regressão do CL. A expressão para ETR-B aumenta durante a fase luteal final e após a regressão. Em contraste a ETR-A mantém-se constante em todas as fases do ciclo (BERISHA et al., 2002). A luteólise pode ser mediada pela ação dos receptores tipo B, por promoverem apoptose, já receptores tipo A têm função antiapoptótica (FILIPPATOS et al., 2001).

A EDN1 pode inibir a secreção de P4 em bovinos e ovinos, e essa inibição pode ser bloqueada por um antagonista de ETR-A (ATR-A). A administração intraluteal deste antagonista durante a fase lutea média, interrompe o efeito luteolítico da PGF2 α (HINCKLEY & MILVAE 2001). Isto sugere que a PGF2 α estimula a biosíntese de EDN1 em células endoteliais luteais assim como em sistema de microdiálise em CL *in vitro* e *in vivo*. Por sua vez a EDN1 aumenta a secreção de PGF2 α em células luteais (SHIRASUNA et al., 2004).

Assim como a EDN1 a angiotensina II (Ang II) também é um potente vasoconstritor, sendo a mesma convertida para angiotensina I pela enzima conversora de angiotensina (ACE) nas células endoteliais de CL bovino (MIYAMOTO, et al., 2005). Dois tipos de receptores para angiotensina têm sido designado como receptor para angiotensina tipo 1 e 2 (AT1R e AT2R) (MIYAMOTO et al., 2009).

Receptores de Ang II foram localizados nas células endoteliais aórtica de bovinos, indicando que as células endoteliais são o principal local de produção e ação da Ang II. Contudo tem sido demonstrado que a Ang II atua como estimulante para a expressão de mRNA de fatores angiogênicos, como bFGF, sugerindo que esta pode também regular a angiogênese no CL bovino (HAYASHI, et al., 2000).

As concentrações intraluteais de Ang II são mais elevadas durante a fase luteínica inicial coincidindo com o momento de alta atividade angiogênica do CL. Além da angiogênese a Ang II também participa da esteroidogênese no CL (HAYASHI et al., 2000).

Na fase luteal inicial a Ang II atua de forma positiva quando interage com os fatores angiogênicos, P4 e PGF2 α . Foi o que constataram Kobayashi et al. (2001) *in vitro*, ao

verificarem que a infusão de bFGF e VEGF estimulou a secreção de P4, PGF2 α e Ang II, e a infusão de Ang II após a de PGF2 α também apresentou efeito estimulatório sobre a P4.

Entretanto, Hayashi & Miyamoto, (1999) constataram *in vitro* que na fase luteal média a Ang II diminui a secreção luteínica de P4, principalmente se associada a infusão prévia ou concomitante de PGF2 α . O efeito inibitório da Ang II sobre a P4, combinado ou não com a PGF2 α , foi bloqueado pela infusão de receptores antagonistas de Ang II.

Existe também uma relação entre a liberação de PGF2 α , Ang II e EDN1 durante a luteólise em bovinos. Estas substâncias vasoativas parecem interagir umas com as outras em retroalimentação positiva local, para gerar mais secreções de si mesmo e agir na regressão do CL, acelerando a luteólise (SHIRASUNA et al., 2004).

Ao contrário de alguns fatores vasoativos o óxido nítrico (NO) é um potente vaso dilatador, tendo origem da L-arginina pela ação do óxido nítrico sintetase (NOS). No CL bovino existem dois tipos de NOS: endotelial NO (eNO) e induzível NO (iNO; MONCADA et al., 1991).

No CL bovino a NOS é expressa em maior quantidade durante a fase luteal final, o que está relacionado com o aumento do fluxo sanguíneo. O NO pode ser um importante mediador da luteólise em vaca, por inibir diretamente a secreção de P4 e induzir a apoptose em células luteais bovinas (SKARZYNSHI et al., 2003). O CL na fase média, final e de regressão também apresenta várias áreas positiva para eNOS (SHIRASUNA et al., 2010a).

Durante a fase luteal media, a PGF2 α estimula a expressão mRNA para eNOS e iNOS na área periférica do CL, enquanto que na área central esse efeito não é observado; esse fenômeno indica que as diferentes da ações agudas da PGF2 α não dependem somente da fase luteal, mas também da região do CL (SHIRASUNA et al., 2008; SHIRASUNA et al., 2010b).

O aumento do fluxo sanguíneo periférico é um dos primeiros indicadores fisiológicos da ação do NO em resposta a PGF2 α . Contudo, o NO não atua somente na luteólise funcional, mas também participa da regressão estrutural do CL, modificando a expressão de proteínas envolvidas com a apoptose (SHIRASUNA et al., 2010a; SHIRASUNA et al., 2010b).

O NO regula ainda a concentração da enzima antioxidante superóxido desmutase (SOD) nas células endoteliais luteal, dependendo do tempo de exposição. Inicialmente observa-se a elevação da SOD; este aumento provavelmente representar uma resposta celular de proteção do CL contra o estresse oxidativo induzido pela $PGF2\alpha$ durante a luteólise funcional. Contudo, mais tarde o NO induz a redução de SOD, que por sua vez resulta no aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), fenômeno este importante para a luteólise estrutural (LEE et al., 2010).

A administração de um Inibidor de NOS (L-NAME) nos dias 11 ou 12 do ciclo estral resulta no aumento da produção de P4. Quando a administração acontece nos dias 18-19, além da elevação da P4 observa-se também, em alguns animais, o aumento do tempo de vida do CL (JAROSZEWSKI & HANSEL, 2000).

CONCLUSÃO

A luteólise é bastante complexa e envolve vários processos desencadeados a partir do não reconhecimento da gestação e liberação de $PGF2\alpha$. Os principais agentes responsáveis por esses fenômenos são os fatores angiogênicos e vasoativos, que direta ou indiretamente influenciam a função luteínica e a secreção de $PGF2\alpha$ e P4.

Nas primeiras 12 horas após a ligação da $PGF2\alpha$ aos receptores luteais ocorre a luteólise funcional, caracterizada pela diminuição na expressão de StAR e consequente queda da P4. Concomitantemente ocorre aumento do NO, $TNF\alpha$, IL-1 e $INF\gamma$, os quais influenciam o aumento de Ang II, EDN-1, ETRA e ETRB, fatores angiogênicos como FGF-1e 2, FGFR. O resultado final dessa cascata é o maior aumento da expressão de NO e $PGF2\alpha$ intraluteal. No final dessa etapa ocorre a desestabilização dos vasos sanguíneos pela alta relação entre ANPT-2/ANPT-1 e a diminuição local de VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, FGF-1,-2. Essas modificações, que acontecem por volta de 12 horas após o pico de $PGF2\alpha$, caracterizam o início luteólise estrutural, resultante da intensa desorganização da estrutura vascular do CL, e profunda inibição

da expressão de StAR, do IGF-2, IGF-R1, IGFBP-3,-4 que resulta no desencadeamento da apoptose e inibição final secreção da progesterona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum, formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.127-140, 2004.

AMSELGRUBER, W. et al. Immunohistochemical aspects of insulin-like growth factors I and II in the bovine corpus luteum. **Journal Reproduction Fertility**, v.101, p.445-451, 1994.

BERISHA, B. et al. The expression of angiotensin and endothelin system members in bovine corpus luteum during estrus cycle and pregnancy. **Endocrine**, v.19, p.305-312, 2002.

BERISHA, B. et al. Effect of Prostaglandin F2 Alpha on Local Luteotropic and Angiogenic Factors During Induced Functional Luteolysis in the Bovine Corpus Luteum. **Biology of Reproduction**, v.82, p.940-947, 2010. Doi 10.1095/biolreprod.109.076752.

BERTAN, C.M. et al. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação de corpo lúteo e na luteólise – revisão de literatura. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.43, n.6, p.824-840, 2006.

BROWN T.A.; BRADEN, T.D. Expression of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 and the effects of IGFBP-2 and -3 in bovine corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**, v.20, p.203-216, 2001.

CAVICCHIO, V.A. et al. Secretion of monocyte chemoattractant protein-1 by endothelial cells of the bovine corpus luteum: regulation by cytokines but not prostaglandin F2 α . **Endocrinology**, v.143, p.3582-3589, 2002.

CUNNINGHAM, J.G. 3^{ed}. Tratato de fisiologia Veterinária. **Editora Guanabara Koogan S.A.** Rio de Janeiro, RJ, 2004.

DURAS, .M. et al. Non-genomic effect of steroids on ocitocin-stimulated intracellular mobilization of calcium and on prostaglandin F2 α and E2 secretion from bovine endometrium cells. **Prostaglandins & other Lipidis Mediators.**, v.76, p.105-116, 2005. Doi:10.1016/j.prostaglandins.2005.02.001.

FERRARA, N., DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial grow factor. **Ender Rev**; 18; 4-25; 1997.

FILIPPATOS, G.S. et al. Regulation of apoptosis by vasoactive peptides. **Am J. Physiol Lung. Cell. Mol. Physiol**, v.281, p.749-761, 2001.

GINTHER, O.J. et al. Temporal associations among pulses fo 13, 14-Dihydro-15-keto-PGF2 α , luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v.76, p.506-513, 2007. Doi: 10.1095/biolreprod.106.057653.

GINTHER, O.J. et al. Circulating hormone concentration within a pulse of a metabolite of prostaglendin F2 α during preluteolysis and early luteolysis in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.253-258, 2010a. Doi:10.1016/j.anireprosci.2010.08.019.

GINTHER, O.J. et al. Characteristics of Pulses of 13,14-Dihydro-15-Keto-Prostaglandin F2 α Before, During, and after Spontaneous Luteolysis and Temporal Intrapulse Relationships with Progesterone Concentrations in Cattle. **Biology of Reproduction**, v.82, p.1049-1056, 2010b. Doi:10.1095/biolreprod.109.081976.

HAYASHI, K.; MIYAMOTO, A. Angiotensin II interacts prostaglandins F2 α and endothelin-1 as a local luteolytic factor in the bovina corpus luteum *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.60, p.1104-1109, 1999.

HAYASHI, K. et al. Regulation of angiotensin II proction and angiotensin receptor in microvascular endothelial cells from bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.62, p.162-167, 2000.

HINCKLEY, S.T.; MILVAE, R.A.; Endothelin-1 mediates prostaglandin F2 α -induced luteal regression in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1619-1623, 2001.

JAROSZEWSKI, J.J.; HANSEL, W. Intraluteal administration of a nitric oxide synthase blocker stimulate progesterone and oxytocin secretion and prolongs the life span of the bovine corpus luteum. **Proc Society for Experimental Biology and Medicine**, v.224, p.50-55, 2000.

KOBAYASHI, S. et al. Production and vascularization of angitensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with a luteal angiogenic factors and prostaglandins F2 α . **Journal of Endocrinology**, v.170, p.369-380, 2001.

LAMMING, G.E.; MANN, G.E. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F2 α production in cow by progesterone and oestradiol. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.103, p.69-73, 1995.

LEE, S. et al. Role of nitric oxide in the regulation of superoxide dismutase and prostaglandin F2 α production in bovine luteal endothelial cells. **Journal of Reproduction and Development**, v.56, p.454-459, 2010.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrus cycle in the cow. **Animals Reproduction Science**, v.64, p.171-180, 2000.

MARTIN, I. **Avaliação imuno-istoquímica dos receptores de progesterone (isoformas A e B), estrógeno α e β , hormônio luteinizante e das enzimas aromatase citocromo P450 e caspase-3 no corpo lúteo de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*)**

durante o ciclo estral. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, p.1-117, 2009.

McCRACKEN, J.A. et al. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews.**, v.79, n.2, p.264-323, 1999.

MIYAMOTO, A. et al. Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- β and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, v.135, p.103-114, 1992.

MIYAMOTO, A. et al. Is tumor necrosis factor α a trigger for the initiation of endometrial prostaglandin F 2α release at luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction.**, v.62, p.1109-1115, 2000.

MIYAMOTO, A. et al. ACOSTA, T.J. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in cow. **Domestic Animal Endocrinology.**, v.29, p.329-339, 2005. Doi:10.1016/j.domaniend.2005.03.011

MIYAMOTO, A. et al. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: impact of angiogenic and vasoactive factor. **Domestic Animal Endocrinology**, v.37, p.159-169, 2009. Doi:10.1016/j.domaniend.2009.04.005

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Review**, v.43, p.109-142, 1991.

NEUFELD, G. et al. Vascular endothelial growth factor and its receptor. **The FASEB Journal**, Israel, v.13, p.9-22, 2000.

NEUVIANS, T.P. et al. The mRNA expression of the members of the IGF-system in bovine corpus luteum during induced luteolysis. **Domestic Animal Endocrinology.**, v.25, p.359-372, 2003. Doi:10.1016/j.domaniend.2003.08.002

NEUVIANS, T.P. et al. Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F 2α -induced

luteolysis in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction.**, v.70, p.473-480, 2004.

Doi: 10.1095/biolreprod.103.016154

NOTHNICK, W.B.; PATE, J.L. Interleukin-1 β is a potent stimulator of Prostaglandin synthesis in bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**, v.43, p.898-903, 1990.

O'SHEA, J.D. et al. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **J. Reprod. Fertil.**, v.85, n.2, p.483-487, 1989.

REKAWIECKI R. et al. Relationship between concentrations of progesterone, oxytocin, noradrenaline, gene expression and protein level for their receptors in corpus luteum during estrous cycle in the cow. **Prostaglandins and Other Lipids Mediators**, v.92, p.13-18, 2010. doi:10.1016/j.prostaglandins.2010.01.002

REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Expression of angiogenic factors, basic fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factor in the ovary, **Journal of Animal Scienci**, v.76, p.1671-1681, 1998.

REYNOLDS, LP. et al. Angiogenesis in the corpus luteum, **Endocrine**, v.12, p.1-9, 2000.

ROBINSON, R.S. et al. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptor in uterine biopsy samples throughout the oestrus cycle and early pregnancy in cow. **Reproduction**, v.122, p.965-979, 2001.

ROBINSON, R.S. et al. Angiogenesis and vascular function in the ovary. **Reproduction**, v.138, p.869-881, 2009.

SAUERWEIN, H. et al. Binding and action of insulin-like growth factor and insulin in bovine luteal tissue during oestrus cycle. **Journal of Reproduction Fertility**, v.96, p.103-115, 1992.

SAYRE, B.L. et al. Increased expression of insulin-like growth factors binding protein-1 during induced regression of bovine corpus lutea. **Biology of Reproduction**, v.63, p.21-29, 2000.

SCHAMS, D. et al. Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.17, p.279-285, 1999.

SCHAMS, D.; BERISHA, B.; Regulation of corpus luteum function in cattle-an overview. **Reproduction Domestic Animals**, v.39, p.241-251, 2004.

SHIBAYA, M. et al. Expression of estrogen receptor in the bovine corpus luteum: Cyclic changes and effects of prostaglandins F₂ α and Cytokines. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, p.1059-1068, 2007.

SHIRASUNA, K. et al. A. Real-time relationship in intraluteal release among prostaglandin F₂ α , endothelin-1, and angiotensin II during spontaneous luteolysis in the cow. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1706-1711, 2004. Doi: 10.1095/biolreprod.104.030270

SHIRASUNA, K. et al. Positive association, in local release, of luteal oxytocin with endothelin 1 and prostaglandin F₂ α during spontaneous luteolysis in the cow: A possible intermediary role for luteolytic cascade within the corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 965-970, 2007.

SHIRASUNA, K. et al. Prostaglandin F₂ α increase endothelial nitric oxide synthase in the periphery of the bovine corpus luteum: the possible regulation of blood flow at an early stage of luteolysis. **Reproduction**, v.135, p.527-539, 2008. Doi: 10.1530/REP-07-0496

SHIRASUNA, K. et al. Prostaglandin F₂ α differentially affects mRNA expression relating to angiogenesis, vasoactivation and prostaglandins in the early and mid corpus

luteum in the cow. **Journal of Reproduction and Development**, v.56, p.428-436, 2010a.

SHIRASUNA, K. et al. Distribution of arteriovenous vessels, capillaries and eNOS expression in the bovine corpus luteum during the estrous cycles: a possible implication of different sensitivity by luteal phase to PGF 2α in the increase of luteal blood flow. **Journal of Reproduction and Development**, v.56, p.124-130, 2010b.

SKARZYNSHI, D.J. et al. Administration of a oxide nitric synthase inhibitor counteracts prostaglandins F 2 -induced luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1674-1681, 2003. Doi: 10.1095/biolreprod.102.008573

SIQUEIRA, L.G.B. et al. Interrelationships among morfology, echotexture, and funcion of the bovine corpus luteum during the estrus cicle. **Animal Reproduction Science**. 2008.

SLEEMAN, M. et al. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR-5. **Gene**, v.271, p.171-182, 2001.

SPINCER, L.J.; ECHTERNKAMP S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, p.223-245, 1995.

STIRLING, D. et al., Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.91, p.1-8, 1991.

TANAKA, J. et al. Relative change in mRNA expression of angiopoietins and receptors Tie in bovine corpus luteum during estrus cycle and prostaglandin F 2α -induced luteolysis: A possible mechanism for the initiation of the luteal regression. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, p.619-626, 2004.

TANIKAWA, M. et al. Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin - 1 α in bovine endometrium during estrous cycle. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v.78, p.279-290, 2005. doi:10.1016/j.prostaglandins.2005.09.003

THATCHER, W.W. et al. Interrelationships between uterus and conceptus to maintain corpus luteum function in early pregnancy: sheep, cattle, pig and horses. **Journal of Animal Science**, v.62, p.25-46, 1986.

YAMASHITA, H. et al. Effect of local neutralization of basic fibroblast growth factor or vascular endothelial growth factor by a specific antibody on the development of the corpus luteum in the cow. **Molecular Reproduction Development**, v.75, p.1449-1459, 2008. Doi: 10.1002/mrd.20878

WAITE, A.L. et al. Changes in bovine luteal progesterone metabolism in response to exogenous prostaglandin F₂ α . **Domestic Animal Endocrinology**, v.28, p.162-171. 2005.

WEEMS, Y.S. et al. Prostaglandin E1 (PGE₁), but not prostaglandin E2 (PGE₂), alters luteal and endometrial luteinizing hormone (LH) occupied and unoccupied LH receptors and mRNA for LH receptors in ovine luteal tissue to prevent luteolysis. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v.91, p.42-50, 2010. Doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.12.005.