UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU-SP

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA DESLORELINA POR 70 DIAS NA FORMA DE IMPLANTE NA DINÂMICA FOLICULAR, PERFIL ENDÓCRINO E EXPRESSÃO DE RECEPTORES ENDOMETRIAIS DE ESTRÓGENO, PROGESTERONA E OCITOCINA DE VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*)

WOLFF CAMARGO MARQUES FILHO

AGOSTO, 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU-SP

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DESLORELINA POR 70 DIAS NA FORMA DE IMPLANTE NA DINÂMICA FOLICULAR, PERFIL ENDÓCRINO E EXPRESSÃO DE RECEPTORES ENDOMETRIAIS DE ESTRÓGENO, PROGESTERONA E OCITOCINA DE VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*)

WOLFF CAMARGO MARQUES FILHO

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

Orientador: Prof. Dr. Adj. João Carlos Pinheiro Ferreira

Agosto, 2011

COMPOSIÇÂO DA BANCA EXAMINADORA

Autor: Wolff Camargo Marques Filho

Titulo: Efeito da administração de Deslorelina por 70 dias na forma de implante na dinâmica folicular, perfil endócrino e expressão de receptores endometriais de estrógeno, progesterona e ocitocina de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*)

Data: 22/08/2011

Nome	Assinatura
Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira	_____
Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes	_____
Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo	_____
Prof^{a}. Dr^{a}. Ines Cristina Giometti	_____
Prof^{a}. Dr^{a}. Jeanne Broch Siqueira	_____

DEDICATÓRIA

Em especial, aos meus pais, Wolff e Olinda, por todo suporte emocional e educacional, por todo apoio, dedicação, confiança, incentivo, cuidado e paciência.

As minhas irmãs, Rafaella e Marcella e, seus namorados David e Rodrigo pela amizade, carinho, torcida e preocupação.

À minha companheira e namorada, Letícia Ferrari Crocomo, pelo amor, apoio, cumplicidade, paciência e confiança, e aos seus familiares, que considero como meus, por todo apoio, carinho e cuidado.

A todos meus familiares.

E a todos meus professores pelos ensinamentos, paciência e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À minha querida família, que amo tanto e, minha eterna companheira de todos os momentos, Letícia e seus familiares, Wilson, Antonieta, Leandro e Luciana que foram, são e sempre serão essenciais e especiais em minha vida.

A todos os meus professores, pelos ensinamentos e convívio diário. Em especial ao meu amigo e orientador Professor Doutor João Carlos Pinheiro Ferreira, pela oportunidade, ensinamentos e apoio.

Aos professores colaboradores deste projeto: Alexandre Secorun Borges, Cezinande de Meira, Eunice Oba, Giovana Wingeter Di Santis, Guilherme de Paula Nogueira, Miriam Harumi Tsunemi, Renée Laufer Amorim e Roberto Sartori Filho.

À equipe de pesquisa coordenada pelo Professor João, aos demais pós-graduandos colaboradores, José Paes de Oliveira Filho e Ian Martin e, em especial à Caroline Junko Fujihara.

Aos meus amigos, colegas de trabalho, funcionários e amigos da Biblioteca, FMVZ e UNESP e, estagiários, pela amizade, apoio, paciência e auxílio durante toda Pós-graduação e contribuição para execução desta pesquisa.

À FUNDUNESP, pelo auxílio pesquisa concedido, que permitiu a confecção do trabalho.

À FAPESP, pela bolsa e auxílio pesquisa concedidos, que possibilitaram a realização do doutorado.

À Peptech Animal Health pela concessão dos implantes subcutâneos da Deslorelina (Suprelorin®).

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP-Botucatu, pela formação pessoal e profissional.

Ao Curso de Pós-graduação, pelo aprimoramento científico.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento e formação pessoal, intelectual e profissional e que, por falha de minha memória, não tenham sido mencionados.

LISTA DE TABELAS

		Pág
Capítulo 2	.....	**44**
Tabela 1.	Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	**57**
Tabela 2.	Concentração plasmática de P_4 (média ± desvio padrão) (ng/mL) de vacas Nelore (*Bos tuaurs indicus*) durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina -Suprelorin®) por 70 dias. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes.....	**65**

LISTA DE FIGURAS

		Pág
Capítulo 2	.....	**44**
Figura 1.	Protocolo de sincronização da ovulação de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). BE (Estrogin®, Farmavet Ltda, Brasil); P_4 (DIB®, Intervet Schering-Plough, Brasil); $PGF_{2\alpha}$ (Dinoprost trometamina, Lutalyse®, Pfizer Saúde Animal, Brasil); D-1 e D0: exame ultra-sonográfico transretal a cada 12 horas para determinação da ovulação.....	**50**
Figura 2.	Número médio de folículos classe I (< 0,4 cm), II (0,4-0,6 cm) e III (>0,6 cm) em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. Barras com letras diferem significativamente.....	**61**
Figura 3.	Dinâmica folicular da vaca A durante os primeiros 35 durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. Folículos dominantes (FD) e folículos subordinados (FS).....	**62**
Figura 4.	Dinâmica folicular da vaca I durante os primeiros 35 dias durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. Folículos dominantes (FD) e folículos subordinados (FS).....	**63**
Figura 5.	Dinâmica folicular da vaca A durante os últimos 20 dias durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. Folículos dominantes (FD) e folículos subordinados (FS).....	**64**
Figura 6.	Média e desvio padrão da concentração plasmática de LH (ng/mL) em vacas Nelore (n=7) nos D4, 20, 27, 42 e 61 durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias.....	**66**

Figura 7. Concentração plasmática de LH (ng/mL) mensurada a cada quinze minutos por seis horas das vacas B, G, H e I no D20 durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. Cada círculo representa um pico de LH..... **67**

Figura 8. Concentração plasmática de LH (ng/mL) mensurada a cada quinze minutos por seis horas das vacas A, B, C, I no D62 durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. Cada círculo representa um pico de LH..... **68**

Figura 9. Média e desvio padrão da concentração plasmática de FSH (ng/mL) em vacas Nelore (n=7) nos D4, 20, 27, 37 e 61 durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias..... **69**

Figura 10. Porcentagem de núcleos positivos do receptor de estrógeno *alfa* (E*α*R) no estroma uterino e no epitélio glandular endometrial, de estrógeno *beta* (E*β*R) no estroma uterino e no epitélio glandular endometrial, de progesterona *isoforma* AB (PABR) no estroma uterino e no epitélio glandular endometrial, de progesterona *isoforma* B (PBR) no estroma uterino e no epitélio glandular endometrial de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) nos dias 0, 4, 20 e 27 durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. Barras com letras diferem significativamente..... **71**

Figura 11. Percentual de intensidade de imunomarcação fraca, moderada e forte dos receptores endometriais de estrógeno *alfa* (E*α*R) e *beta* (E*β*R), de progesterona *isoforma* AB (PABR) e B (PBR) de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias..... **72**

Figura 12. Expressão relativa média do RNAm (X fold) dos receptores endometriais de estrógeno *alfa* (E*α*R) e *beta* (E*β*R), de progesterona *isoforma* AB (PABR) e de ocitocina (OTR) de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias..... **74**

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc = segundo mensageiro

BE = benzoato de estradiol

BMP-15 = proteína morfogenética óssea-15

BST = somatotropina bovina

CL = corpo lúteo

Ckit = receptor do kit ligante

E_2 = estradiol

ECC = escore de condição corporal

EGF = fator de crescimento epidermal

ER = receptor de estrógeno

E*α*R = receptor de estrógeno *α*

E*β*R = receptor de estrógeno *β*

FLk1/KDR ou VEGF/R1 = receptores tirosina kinase do fator de crescimento endotelial vascular tipo 1

FLt1/KDR ou VEGF/R2 = receptores tirosina kinase do fator de crescimento endotelial vascular tipo 2

FD = folículo dominante

FGF = fator de crescimento fibroblástico

FS = folículo subordinado

FSH = hormônio folículo estimulante

FSHR = receptor do hormônio folículo estimulante

GDF-9 = fator de crescimento diferencial 9

GnRH = hormônio liberador de gonadotrofinas

GnRHa = agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas

GnRHR = receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas

IATF = inseminação artificial em tempo fixo

IGF = fator de crescimento semelhante a insulina

IGF-I = fator de crescimento semelhante a insulina tipo I

IGFBP-2 = proteínas ligantes a IGF tipo 2

IGFBP-3 = proteínas ligantes a IGF tipo 3

IL = interleucina

i.m = injeção intramuscular

KL = kit ligante

LH = hormônio luteinizante

LHR = receptor do hormônio luteinizante

OT = ocitocina

OTR = receptor de ocitocina

P_4 = progesterona

PR = receptor de progesterona

PAR = receptor de progesterona *isoforma* A

PBR = receptor de progesterona *isoforma* B

PABR = receptor de progesterona *isoforma* AB

PGFM = 13, 14 diidr-15ceto prostaglandina

PIB = produto interno bruto

PR = receptor de progesterona

qRT-PCR = quantitativo transcriptase reversa da reação em cadeia de polimerase (PCR em tempo real)

RT-PCR = transcriptase reversa da reação em cadeia de polimerase

TGF = fator de crescimento transformante

TGF-β = fator de crescimento transformante tipo β

TZP = processo citoplasmático trans-zonais

VEGF = fator de crescimento endotelial vascular

VEGFA = fator de crescimento endotelial vascular A

VPF = fator de permeabilidade vascular

SUMÁRIO

RESUMO..... xvii

ABSTRACT..... xix

CAPÍTULO 1 1

1. INTRODUÇÃO 2

2. REVISÃO DE LITERATURA 3

2.1 Ciclo estral bovino..... 3

2.2 Hormônios e receptores hormonais……..... 4

2.2.1 Hormônio liberador de gonadotrofina..... 5

2.2.2 Gonadotrofinas..... 6

2.2.3 Estrógenos..... 8

2.2.4 Progestágenos..... 12

2.2.5 Ocitocina……..... 14

2.2.6 Prostaglandina……..... 15

2.3 Dinâmica folicular…..... 15

2.3.1 Folículos pré-antrais..... 15

2.3.2 Folículos antrais..... 17

2.3.3 Luteinização..... 19

2.3.4 Luteólise..... 20

2.4 Agonistas de GnRH..... 21

3. REFERÊNCIAS..... 23

CAPÍTULO 2..... 44

Efeito administração de Deslorelina por 70 dias na forma de implante na dinâmica folicular, perfil endócrino e expressão de receptores endometriais de estrógeno, progesterona e ocitocina de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*)..... 45

Resumo..... 46

Introdução..... 48

Material e métodos..... 49

Animais e instalações..... 49

Sincronização da ovulação..... 50

Implantação da Deslorelina..... 50

Avaliações ultra-sonográficas..... 51

Dosagem hormonal..... 51

Biópsias endometriais..... 52

Imunoistoquímica..... 53

Extração do RNA, confecção do cDNA e qRT-PCR..... 55

Análise estatística..... 58

Resultados..... 59

Discussão..... 74

Conclusão..... 84

Agradecimentos..... 84

Referências..... 84

CAPÍTULO 3..... 96

Fisiologia do cliclo estral da fêmea bovina..... 97

Resumo..... 98

Abstract..... 99

Resumén..... 100

Introdução..... 101

Ciclo estral bovino..... 102

Dinâmica folicular..... 102

Folículos pré-antrais..... 102

Folículos antrais..... 103

Luteinização..... 105

Luteólise..... 105

Diferenças entre *Bos taurus taurus* X *Bos taurus indicus*..... 106

Hormônios e receptores hormonais..... 106

Hormônio liberador de gonadotrofina..... 107

Gonadotrofinas..... 107

Fatores angiogênicos..... 109

Estrógenos e receptores de estrógeno..... 111

Progestágenos e receptores de progesterona..... 113

Ocitocina e receptores de ocitocina..... 114

Prostaglandina..... 115

Considerações finais..... 116

Referências bibliográficas..... 117

RESUMO

MARQUES FILHO, W. C. **Efeito da administração de Deslorelina por 70 dias na forma de implante na dinâmica folicular, perfil endócrino e expressão de receptores endometriais de estrógeno, progesterona e ocitocina de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*).** Botucatu, 2011, 124P. (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Área: Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu.

O objetivo deste foi avaliar os efeitos da utilização de implantes subcutâneos de Deslorelina (agonista de GnRH-Suprelorin®) por 70 dias sob a dinâmica folicular, secreção de FSH, LH e P_4 e, a expressão gênica e proteica dos receptores endometriais de estrógeno *α* e *β* (E*α*R e E*β*R), de progesterona *isoformas* A e B (PABR e PBR) e de ocitocina (OTR) em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). Foi sincronizada a ovulação de 15 vacas Nelore com escore de condição corporal (ECC) ≥ 3 e, no D0 foram aleatoriamente selecionados 7 animais para serem submetidos a implantação subcutânea de Deslorelina por 70 dias. O exame ultra-sonográfico foi realizado para caracterização da dinâmica folicular e os folículos foram classicados em classes: I (< 0,4 cm), II (0,4-0,6cm) e III (> 0,6cm). Amostras de sangue foram coletadas para mensuração das concentrações plasmáticas de FSH, LH e P_4. A pulsatilidade e os picos de LH foram determinados a partir de amostras sanguíneas coletadas a cada 15 minutos por 6 horas em 4 vacas escolhidas aleatoriamente nos D20 e D62. A mensuração da expressão proteica dos E*α*R, E*β*R, PABR e PBR no epitélio glandular e estroma uterino foram mensurados por meio da técnica da imunoistoquímica e, a expressão gênica dos E*α*R, E*β*R, PABR e OTR foi avaliada com auxílio da técnica de qRT-PCR, ambas a partir de fragmentos coletados por meio de biópsias uterinas nos dias 0, 4, 20 e 27. Os resultados

foram analisados por meio do teste não paramétrico de Friedman e Exato de Fisher. A relação dos resultados entre a dinâmica folicular e expressões gênica e proteica foi analisada pela correlação de Pearson, todos com nível de significância de 0,05. Durante os 70 dias de implantação da Deslorelina nenhum animal ovulou, indicando que o pico pré-ovulatório de LH foi abolido. O número máximo de folículos recrutados foi de 13,7 (± 3,86). Os folículos de classe III não foram observados na maioria dos animais a partir do D48. A concentração plasmática da P_4 se manteve em nível basal (0,4 ng/mL) durante todo o período de implantação. A secreção de FSH e LH não foi abolida ao longo do estudo. A frequência de pulsos de LH observada no D20 e D62 foi, respectivamente 1 (± 0)/6 h e 1,25 (± 0,5)/6h. As concentrações plasmáticas máximas durante os pulsos foram de 1,72 (± 0,24) e 1,24 (± 0,31) ng/mL, respectivamente. De forma geral, foi observado alto percentual de núcleos positivos dos ER e PR ao longo do estudo, bem como a alta concentração de RNAm de ER, PR e OTR. Sendo assim, se infere que o tratamento por 70 dias com implantes subcutâneos de Deslorelina suprime o recrutamento e a seleção folicular, inibe a ovulação, reduz a pulsatilidade de LH, inibe o pico pré-ovulatório de LH e, mantém elevada a expressão dos receptores endometriais de estrógeno, progesterona e ocitocina em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*).

Palavras-chaves: Nelore, Deslorelina, dinâmica folicular, hormônios, receptor endometrial.

ABSTRACT

MARQUES FILHO, W. C. **Effect of administration of Deslorelin for 70 days in the form of implant in follicular dynamic, endocrine regulation, and expression of estrogen, progesterone and oxytocin endometrial receptors in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows.** Botucatu, 2011, 124P. (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Área: Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu.

The objective this study is to evaluate the effects of subcutaneous implant Deslorelin (GnRHa-Suprelorin®) by 70 days on the endocrine dynamic, the follicular development and, gene and protein expression of endometrial receptors of estrogen *α* and *β* (E*α*R and E*β*R), progesterone *isoforms* A and B (PABR and PBR), and oxytocin (OTR) of Nelore (*Bos taurus indicus*) cows . Ovulation of 15 Nelore cows with BCS ≥ 3 was synchronized following of implantation of Deslorelin in 7 animals for 70 days. During this period, the ovaries were scanned by ultrasonography to characterize the follicular dynamics, where the follicles were divided in class: I (< 0.4 cm), II (0.4-0.6 cm) and III (> 0.6 cm). Blood samples were collected before of each ultrasonographic exam for later measurement of plasma FSH, LH and P_4. The assessment of LH pulsatile secretion was measured on blood samples collected every 15 minutes for six hours through the jugular catheterization in fourrandomly chosen cows on D20 and D62. The protein expression of E*α*R and E*β*R, PABR and PBR of endometrial glandular epithelial and stromal was measured using the technique of immunohistochemistry and the quantification of gene expression of E*α*R, E*β*R, PABR and OTR by qRT-PCR technique from fragments collected through endometrials biopsies on days 0, 4, 20 and 27. Others two samples of endometrium were used for. The comparison between the moments of the measures was performed using the nonparametrics tests of the Friedman and Fisher's Exact. The relationship between the results of follicular dynamics, gene and protein expression was performed by Pearson correlation, all with a significance level of 0.05. During the 70 days of implantation of Deslorelin neither animal ovulated, indicating that the preovulatory peak of LH was

abolished. The maximum number of follicles (13.7 ± 3.86). The class III follicles were present in most animals until the D48. Plasma concentration of P_4 remained at basal levels (0.4 ng/mL) throughout the period. The serum level of FSH and LH did not differ and was not abolished throught the study. The frequency of LH pulses observed in D20 and D62 were 1 (± 0)/6 h and 1.25 (± 0.5)/6h, and the peak plasma concentrations during the pulses were 1.72 (± 0.24) and 1.24 (± 0.31) ng/mL,respectively. In general, was observed a high percentage of positive nuclei of ER and Pr throught the study, as well as the high concentration of mRNA of ER, PR and OTR. Therefore, conclude that the treatment with Deslorelin implants for 70 days suppresses follicular recruitment and selection, inhibits ovulation, reduces the pulsatility and LH surge, inhibits preovulatory peak of LH and remains high the expression of endometrial receptors of estrogen, progesterone and oxytocin in Nelore (*Bos Taurus indicus*) cows.

Keywords: Nelore, Deslorelin, follicular dynamic, hormones, endometrial receptor.

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos, o Brasil é o país que mais transferiu embriões produzidos *in vitro* do mundo e é o segundo que mais produziu embriões *in vivo*. Além disso, é o segundo maior produtor de carne e o sexto maior produtor de leite (IETS, 2006; IBGE, 2008).

Em 2007, o rebanho era constituído por aproximadamente 199,7 milhões de cabeças, destas 80% de origem Zebuína, com alto poder de tolerância ao clima tropical (adaptabilidade e rusticidade) e criadas de forma extensiva nas regiões Centro-oeste e Norte (IBGE, 2008).

Apesar disso, o rebanho brasileiro caracteriza-se por índices produtivos médios comprometedores em termos de produtividade e sustentabilidade econômica da atividade, que possuem grande variação de acordo com os autores, o que pode estar associado aos fatores como: a extensão territorial do Brasil, as diferenças de manejo e nutrição nas propriedades, época do ano e variação genética dos animais. A taxa de natalidade é de 65%, a taxa de mortalidade de bezerros é de 8%, a idade ao primeiro parto é de 36 meses, o intervalo entre partos é de 18 meses e o período de serviço de 9 meses (ANUALPEC, 2004).

As particularidades fisiológicas que acometem estes animais durante a fase do anestro pós-parto, as características e os fatores que determinam a duração do anestro e do primeiro ciclo estral após o período de anestro (ciclo curto) ainda não foram totalmente elucidados.

Sabe-se que, independentemente da fase da vida do animal, a regulação entre os vários sistemas do organismo ocorre pela regulação de forma rápida e direta do sistema nervoso por meio dos prolongamentos nervosos dispostos pelo corpo e, de forma indireta e lenta, pelo sistema endócrino que regula a homeostase e as diversas funções específicas, tais como o desenvolvimento folicular ovariano, o comportamento sexual, a gestação, o parto e a lactação (HAFEZ & HAFEZ, 2000; RANDALL *et al.*, 2000; SWENSON & REECE, 2006; CUNNIGHAM, 2008).

A função reprodutiva durante o ciclo estral é modulada pelo padrão de secreção e concentração sérica dos hormônios da reprodução por meio dos processos de retroalimentação, bem como pela expressão gênica e proteica

dos receptores hormonais do aparelho reprodutivo e tecidos conexos (RAW *et al.*, 1995; RAZANDI *et al.*, 1999; MOWA & IWANGA, 2000a, b; MANN *et al.*, 2001; BERISHA et al., 2002).

As pesquisas que visam elucidar a fisiologia geral, a forma de regulação sobre a função reprodutiva e as reações do organismo em específicas fases da vida reprodutiva dos bovinos vêm sendo desenvolvidas com intuito de incrementar o uso da biotécnicas da reprodução, o que resultará na maximização da eficiência reprodutiva do rebanho nacional, no avanço na produção agropecuária e aumento significativo do PIB agrícola.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da utilização de implantes subcutâneos de Deslorelina (Agonista de GnRH - Suprelorin®) por 70 dias, sob a dinâmica folicular, secreção da P_4 e LH e, expressão gênica e proteica dos receptores endometriais de estrógeno *α* e *β* (E*α*R e E*β*R), progesterona *isoforma* A e B (PAR e PBR) e ocitocina (ROT) de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo estral bovino

O ciclo estral em fêmeas bovinas maduras sexualmente inicia-se após a puberdade sendo interrompido durante a gestação e as fases de anestro. Trata-se do período compreendido entre dois episódios de estro ou cio, de duração variável que apresenta fases distintas caracterizadas por modificações internas e externas no trato reprodutivo feminino, assim como no comportamento dos animais (SENGER, 2003).

Os bovinos são animais poliéstricos anuais que apresentam um ciclo estral com duração aproximada de 21 (17 a 24) dias e normalmente apresentam 2 a 3 ondas de crescimento folicular (GINTHER *et al.*, 1989a; BARROS *et al.*, 1992; BARROS *et al.*, 1993).

O ciclo estral bovino pode ser dividido em duas fases, baseada nas concentrações plasmáticas dos hormônios predominantes em cada uma delas. A fase denominada folicular compreende o proestro e o estro, perdura três a quatro dias, tem início após a secreção de $PGF_{2\alpha}$ e a luteólise, caracteriza-se pelo desenvolvimento folicular e a predominância de altas concentrações

plasmáticas de estradiol, culminando com o pico pré-ovulatório de LH e, consequentemente a ovulação, que marca o início da fase seguinte. A fase luteal inclui o metaestro e o diestro, caracteriza-se pelo desenvolvimento do CL e pela crescente ou maior concentração de progesterona plasmática, e dura aproximadamente 18 a 19 dias (WILTBANK *et al.*, 2002; SENGER, 2003).

2.2 Hormônios e receptores hormonais

O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos envolvendo, principalmente os hormônios hipotalâmicos (hormônio liberador de gonadotrofinas – GnRH), hipofisários (hormônio luteinizante – LH e hormônio folículo estimulante – FSH) e gonadais (E_2, P_4 e inibina) (GINTHER, 2000; HAFEZ & HAFEZ, 2000; SENGER, 2003).

De maneira geral, esta regulação é efetuada pelas concentrações plasmáticas dos hormônios protéicos e esteróides ciculantes na corrente sanguínea que atingem os diferentes órgãos alvos de diversas formas (RAW *et al.*, 1995; RAZANDI *et al.*, 1999; MOWA & IWANGA, 2000a, b).

A maioria dos hormônios comunica-se com as diversas células do organismo via endócrina, onde as glândulas secretam hormônios diretamente na corrente sanguínea com intuito de regular as células específicas (células-alvo) (SENGER, 2003).

A regulação parácrina consiste na comunicação entre as células vizinhas por meio dos produtos celulares, e a autócrina, caracteriza-se pela produção de mensageiros químicos secretados por células que atuarão sobre elas mesmas ao se unirem à receptores específicos (HAFEZ & HAFEZ, 2000; SENGER, 2003).

A regulação da secreção dos diversos hormônios ocorre por meio de retroalimentação ou *feedback* negativo, quando inibem a secreção, e positivo, ao estimularem a secreção hormonal. São descritos outros mecanismos de regulação, como por meio de reflexos neuroendócrinos, evidenciado durante o processo de liberação do leite quando o bezerro realiza estimulação mecânica do teto, com consequente, liberação de ocitocina (OT) e prolactina. Há ainda o controle exócrino, realizado por meio dos feromônios (HAFEZ & HAFEZ, 2000).

Entretanto, para os hormônios realizarem suas funções no organismo não bastas estarem presentes na corrente sanguínea em concentrações

satisfatórias, é imprescindível a sua ligação com receptores específicos de membrana plasmática e nuclear, que normalmente são proteínas ou glicoproteínas (SENGER, 2003; SCHILLO, 2009).

Para os hormônios protéicos LH e FSH exercerem sua função é necessária sua ligação com os receptores presentes na membrana plasmática para que penetrem nas células do tecido-alvo onde se ligam aos seus receptores citoplasmáticos específicos (KUIPER *et al.*, 1997; HAFEZ & HAFEZ, 2000; SENGER, 2003).

Já os hormônios esteróides penetram pela membrana citoplasmática. Certas células são capazes de concentrar e utilizar esteróides por intermédio da síntese de receptores citoplasmáticos específicos. O complexo esteróide-receptor citoplasmático é transferido para o núcleo, onde se liga aos receptores específicos na cromatina. Segue-se a síntese de RNA polimerase e a produção de RNA mensageiro. Assim, a capacidade de síntese de proteína por uma célula ocorre após 30 minutos da interação inicial entre o esteróide e o receptor citoplasmático (DUKES, 1996; HAFEZ & HAFEZ, 2000; SENGER, 2003; VALLEJO, 2005).

2.2.1 Hormônio liberador de gonadotrofina

O GnRH é um decapeptídeo sintetizado por células neuroendócrinas na área pré-óptica do hipotálamo, e após ser liberado, sob a forma de pulsos, atinge a adenohipófise através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, desencadeando a secreção do FSH e LH (CLARKE, 1988; FERRIS & SHUPNIK, 2006; KRIEGSFELD & SILVER, 2006).

O GnRH liga-se aos receptores específicos de membrana que ativam as proteínas G, que por sua vez ativam a enzima adenilciclase, responsável em transformar ATP em AMPc (2º mensageiro) no citoplasma. Este segundo mensageiro ativa quinases proteicas, desencadeando a formação de novas proteínas. As próprias concentrações do GnRH regulam a expressão dos receptores de GnRH (GnRHR) hipofisários (SENGER, 2003; KRIEGSFELD, 2006; SCHILLO, 2009).

O FSH e o LH são liberados de maneira pulsátil na circulação sistêmica e atuam nas gônadas regulando a gametogênese e secreção dos estrógenos gonadais (STANISLAUS *et al.*, 1998; FERRIS & SHUPNIK, 2006).

2.2.2 Gonadotrofinas

O FSH e o LH são secretados pelas células da pituitária anterior (Adenohipófise), de acordo com a estimulação ou a inibição do GnRH, regulados por meio de *feedback* positivo e negativo de acordo com a secreção e a concentração plasmática dos hormônios gonadais, e são chamados de gonadotrofinas por estimular a secreção hormonal dos ovários e dos testículos (gônadas) (SENGER, 2003).

A principal função do FSH na fêmea é promover o crescimento dos folículos, que são responsáveis pela produção de estradiol. O pico de estradiol é seguido pelo pico pré-ovulatório de LH, imprescindível ao processo ovulatório, que acarreta a formação do CL por meio da luteinização das células da granulosa e da teca (HAFEZ & HAFEZ, 2000).

O sistema circulatório envolvido nesse processo é conhecido como sistema porta hipotalâmico-hipofisário, composto por uma rede de capilares. O GnRH é secretado pelo centro tônico hipotalâmico em resposta aos baixos níveis de LH ou FSH (*feedback* positivo) e sua liberação provoca aumento da secreção dos hormônios hipofisários. Aparentemente a liberação de LH é mais responsiva ao hormônio liberador de gonadotrofina que a liberação de FSH (HAFEZ & HAFEZ, 2000; SENGER, 2003).

A formação do complexo FSH/receptor de FSH (FSHR) desencadeia uma série de processos no interior das células da granulosa do folículo, que incluem o aumento da produção de fluido folicular, da exposição de novos receptores de membrana para FSH, das junções comunicantes GAP, da atividade da enzima aromatase P450, da expressão dos receptores para LH e da síntese de estradiol a partir de andrógenos sob ação sinérgica das células da teca e granulosa (HAFEZ & HAFEZ, 2000).

As concentrações de RNAm de FSHR estão presentes em maior quantidade nas células da granulosa foliculares nos dias 1, 3, 5, 7 e 10 do ciclo estral, e no CL nos primeiros dias após ovulação (RAJAPAKSHA *et al.*, 1996; HAFEZ & HAFEZ, 2000).

Os receptores para LH (LHR) estão presentes nas células da teca e da granulosa dos folículos e no CL dos bovinos (WANDJI et al., 1992; HAFEZ & HAFEZ, 2000). Esses receptores desencadeiam a síntese de andrógenos a

partir do colesterol e a formação de novos receptores para LH (HAFEZ & HAFEZ, 2000; SENGER, 2003).

Os LHR das células da granulosa parecem estar relacionados à dominância folicular. Durante a fase de desvio folicular, de forma sinérgica, o aumento dos receptores para FSH, nas células da granulosa do folículo dominante, e dos receptores para LH, nas células da teca interna, estimula a expressão de receptores de LH nas células da granulosa e, consequentemente, o aumento na produção de estradiol pelo folículo pré-ovulatório (BAO & GARVERICK, 1998; BURATINI, 2007).

Após o pico de FSH e o declínio dos níveis circulantes deste hormônio, ocorre a atresia dos folículos subordinados recrutados no início da onda de crescimento folicular (GINTHER *et al.*, 1997). A partir de então ocorre o fenômeno da divergência ou desvio folicular, definida como o início da mudança nas taxas de crescimento entre o folículo selecionado (dominante) e os demais (subordinados) (GINTHER *et al.*, 1996).

Apesar do mecanismo preciso para a seleção do folículo dominante não estar completamente elucidado, sabe-se que o fenômeno do desvio envolve o LH e a expressão de seus receptores pelo maior folículo, bem como os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) (FORTUNE *et al.*, 2004).

Neste momento o folículo dominante apresenta diâmetro em torno de 8,5 mm em animais *Bos taurus taurus* (GINTHER *et al.*, 1999; KULICK *et al.*, 1999) e de 6,0 mm em *Bos taurus indicus* (SARTORELLI *et al.*, 2003; SARTORELLI *et al.*, 2005), quando este folículo passa a ser LH dependente, até que ocorra a ovulação ou a atresia (GINTHER *et al.*, 1996; WEBB *et al.*, 2004).

Austin *et al.* (2001) relataram que o futuro folículo dominante produz maiores concentrações de estradiol e possuem baixos níveis de proteínas ligantes a IGF (IGFBP) comparado aos folículos subordinados. Associado a isto, a seleção folicular está associada à queda momentânea da concentração plasmática de FSH por algumas horas no momento da seleção folicular. Isto se deve ao *feedback negativo* ocasionado pelo estradiol sintetizado pelo maior folículo, capaz de manter seu desenvolvimento apesar da queda na secreção de FSH com taxas de crescimento superior aos demais folículos (GINTHER et al., 2000b; FORTUNE *et al.*, 2001).

A partir deste momento, o desenvolvimento deste folículo dominante torna-se dependente dos níveis séricos de LH, os quais apresentam maior concentração de RNAm de LHR detectado por transcriptase reversa da reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) em células da granulosa comparado aos folículos subordinados (GINTHER, 2000a; BEG, 2001; FORTUNE *et al.*, 2001).

A expressão do LHR foi observada por PCR em células da granulosa de folículos antrais com 8 mm, obtidos de fêmeas Nelore, exclusivamente após a seleção do folículo dominante que ocorre aos 6 mm nesta espécie (NOGUEIRA *et al.*, 2005; SARTORELLI *et al.*, 2005).

Os LHR do CL elevam-se até o 5º dia, permanecendo em concentrações elevadas até os dias 15 e 17. A detecção gênica para o mesmo receptor apresentou comportamento semelhante no decorrer do ciclo estral (OKUDA *et al.*, 1999; SCHAMS & BERISHA, 2004).

2.2.3 Estrógenos

Entre os estrógenos, o 17β-estradiol é o de maior importância para a reprodução e predomina em animais domésticos não gestantes e gestantes. O estrógeno, hormônio esteróide é produzido pelo córtex adrenal e pelas células da granulosa de folículos ovarianos principalmente após a fase de desvio folicular (XU *et al.*, 1995; KINDER *et al.*, 1996; KOMAR *et al.*, 2001) por meio do processo catalítico de aromatização de andrógenos pela enzima aromatase citocromo P450 (HANUKOGLU, 1992; RICHARDS, 1994; CONLEY, 2001; ROSENFELD *et al.*, 2001).

Os estrógenos correspondem aos hormônios esteróides que mais desempenham funções fisiológicas nos animais, entre elas o estro na maioria das espécies (HAFEZ & HAFEZ, 2000).

Sinergicamente com a progesterona agem para possibilitar o crescimento de glândulas uterinas e mamárias. O período de estro é caracterizado por elevados níveis de estrógenos. Os estrógenos estimulam o crescimento uterino por meio da interação com receptores e, consequente aumento dos processos sintéticos dentro das células. Outros efeitos incluem o desenvolvimento físico das características sexuais secundárias femininas, o controle da liberação de hormônios hipofisários, potencialização dos efeitos da

OT e prostaglandinas sobre as contrações uterinas e auxílio no processo de implantação (HAFEZ & HAFEZ, 2000).

O estrógeno estimula o crescimento e a secreção das glândulas endometriais momentos antes da implantação necessários para manutenção do zigoto, o crescimento dos ductos nas glândulas mamárias quando atua sinergicamente com a progesterona, atividade secretora no oviduto (favorece a sobrevivência do oócito e espermatozóide), inicia a receptividade sexual, regula a secreção de gonadotrofinas (pico de hormônio luteinizante pela hipófise anterior para ovulação) (DUKES, 1996; SENGER, 2003).

Além disso, o estrógeno é epiteliotrófico, promove anabolismo das proteínas e relaciona-se com a expressão dos receptores de OT no endométrio, os quais constituem o complexo hormônio receptor com a OT secretada pelo CL, que estimulam a liberação de $PGF_{2\alpha}$ pelo útero gravídico ou não gravídico, desencadeando em ambos os casos a regressão do CL (SENGER, 2003).

Quando produzido na presença do FD, é responsável pelo *feedback* negativo ao FSH e pela retroalimentação positiva ao LH (NETT *et al.*, 2002) que, na ausência de P_4, induz o pico pré-ovulatório de LH e também o comportamento de estro (BARROS *et al.*, 1995; VASCONCELOS *et al.*, 2008).

As altas concentrações plasmáticas de estradiol e a ausência de progesterona sinalizam a maturação folicular, o que desencadeia a expressão do comportamento de estro, e o pico pré-ovulatório de LH, essencial para a ovulação do folículo dominante (TAYA *et al.*, 1996; DIAZ *et al.*, 2002).

Além de participar na regulação da secreção do FSH, o estradiol está relacionado com importantes funções autócrinas e parácrinas, tais como a proliferação celular (BLEY *et al.*, 1997), o aumento da atividade da enzima aromatase citocromo P450, o aumento na expressão dos LHR e FSHR nas células da granulosa de ratas (RICHARDS *et al.*, 1994) e de bovinos (BERISHA *et al.*, 2000), e a maior sensibilidade do folículo dominante aos hormônios FSH e LH (GINTHER *et al.*, 2001).

Em bovinos, a existência de duas a três ondas foliculares durante o ciclo estral acarreta um perfil oscilatório de produção de estradiol, devido ao crescimento e atresia de diversos folículos em cada uma das ondas foliculares, até a ovulação (IRELAND *et al.*, 1979; GINTHER *et al.*, 1989a); no entanto, o

folículo dominante é considerado o principal responsável pela produção total de estradiol (IRELAND *et al.*, 1984). Este é liberado de maneira pulsátil (WALTERS *et al.*, 1984) e atinge a concentração plasmática máxima momentos antes da ovulação (GLENCROSS & POPE, 1981).

Cupp *et al.* (1995) observaram que durante o início da fase luteínica, a concentração de progesterona é baixa e a de estradiol é alta, resultando em maior frequência dos pulsos de LH. Durante o terço médio da fase luteínica, entre o 11º e 13º dias do ciclo estral, período em que a concentração de progesterona é alta e a de estradiol é baixa, foi observada menor frequência dos pulsos de LH em relação ao início ou ao final da fase luteínica.

Após a luteólise, há diminuição dos níveis de progesterona e elevação na concentração e frequência dos pulsos de LH. Diversos estudos demonstraram que o padrão de secreção da progesterona e do estradiol está inversamente relacionado, e é determinante no controle da frequência dos pulsos de LH (KESNER *et al.*, 1981; BUTLER *et al.*, 1983; STUMPF *et al.*, 1993; BERGFELD *et al.*, 1995; CUPP *et al.*, 1995).

Em bovinos, injeções de estradiol entre os dias 13 e 18 do ciclo estral estimularam a produção de PGFM (LEMON, 1975; BARTOL *et al.*, 1981; RICO *et al.*, 1981; KNICKERBOCKER *et al.*, 1986; THATCHER *et al.*, 1986; LARSON *et al.*, 1991; CASTRO E PAULA *et al.*, 2002).

Bertan (2004) confirmou a capacidade do estradiol em estimular o aumento das concentrações séricas de PGFM no dias 15, 17 e 19 do ciclo estral, mas não no dia 13. Castro E Paula (2003) relataram que a resposta estimulatória à síntese de PGFM não foi observada em todas as fêmeas quando tratadas com estradiol no dia 15 do ciclo estral.

Thatcher *et al.* (1986) demonstraram que grupos de animais tratados com estradiol entravam em luteólise mais cedo do que grupos não tratados. De forma similar, injeções de benzoato de estradiol (BE) em vacas no dia 15 ou injeções de 17β-estradiol em ovelhas entre os dias 9 e 12 do ciclo estral também desencadeavam a luteólise (HIXON & FLINT, 1987; SHELDRICK, 1992; WALKER *et al.*, 1997).

No entanto, o estradiol isolodamente não é capaz de ativar a resposta do endométrio e ocasionar a lutólise a partir das injeções de OT em vacas e ovelhas ovariectomizadas (HOMANICS & SILVA, 1988; MANN *et al.*, 2001),

devido ao efeito inibitório do estradiol nos receptores de OT na ausência da sensibilização prévia pela progesterona (VALLET *et al.*, 1990; ZHANG *et al.*, 1992)

O início da luteólise é determinada pela prévia sensibilização endometrial pela progesterona oriunda do CL ao longo do ciclo estral, que associado a crescente produção de estradiol pelos folículos, causam uma grande estimulação na produção de receptores de OT e produção de $PGF_{2\alpha}$ pelo útero em bovinos e ovinos (KAMMINSKI *et al.*, 1997; LAU *et al.*, 1993; WALKER *et al.*, 1997).

A função do estrógeno é desencadeada no organismo em tipos celulares específicos do ovário e do útero após a formação do complexo hormônio estrógeno-receptor de estrógeno (E_2/ER), promovendo a ativação genômica e proteica, as quais são reguladas basicamente pelo E_2 e pela P_4 (SCHAMS & BERISHA, 2002; MARTIN, 2005; MARTIN *et al.*, 2008).

Atualmente, foram relatados no endométrio e CL dois tipos de ER com importância para a regulação da função reprodutiva de bovinos, *α* (E*α*R) (KUIPER *et al.*, 1996) e *β* (E*β*R) (MOSSELMAN *et al.*, 1996).

Os receptores de estrógeno possuem maior expressão no endométrio durante os dias 0 e 5 do ciclo, mediado pelos altos níveis plasmáticos do estradiol proveniente do folículo dominante, associado às baixas concentrações séricas de progesterona após a luteólise (MARTIN *et al.*, 2006; MARTIN et al., 2008).

Após a ovulação, a P_4 proveniente do CL recém formado, gradativamente promove a diminuição das concentrações endometriais dos REs que alcançam os seus menores valores por volta do 17^{o} dia do ciclo estral (diestro) (HENRICKS & HARRIS, 1978; BOSS *et al.*, 1996, MARTIN *et al.*, 2008).

Em ratos o E*α*R regula a diferenciação, a proliferação celular, possui maior expressão no tecido endometrial e possui maior afinidade de ligação ao tipo estrona de estradiol (COUSE *et al.*, 1997; KUIPER *et al.*, 1998).

Os E*β*R na maioria das espécies estão presentes em maior concentração no tecido ovárico e estão intimamente relacionados com a liberação de GnRH (COUSE *et al.*, 1997). Em humanos, há relatos que as

células endometriais estromais possuem maior concentração de E*β*R, os quais apresentam maior afinidade por estradiol e estriol (LIMA, 2008).

O RNAm para os E*α*R e E*β*R também foi detectado em CL de bovinos (SCHAMS & BERISHA, 2002), ovinos (ZIEBA et al., 2000; CARDENAS et al., 2001) e suínos (SLOMCZYNSKA & WOZNIAK, 2001). Em bovinos, o E*α*R teve maior expressão durante a fase luteal inicial e decresceu significativamente durante a fase luteal tardia. Em contraste, o E*β*R não apresentou alterações significativas durante todos os estágios examinados (SCHAMS & BERISHA, 2002).

2.2.4 Progestágenos

O progestágeno mais importante é a P_4 que é produzida em maior quantidade pelo CL, e também pelo córtex adrenal e a placenta (MCDONALD, 1989).

A progesterona é responsável pelo crescimento das glândulas endometriais, crescimento lobuloalveolar das glândulas mamárias, atividade secretora do oviduto e das glândulas endometriais responsável pela nutrição do zigoto, evita a contratilidade do útero durante a gestação e regula a secreção de gonadotrofinas. A função luteal determina a duração fisiológica do ciclo estral e garante a manutenção da prenhez (ROTHCHILD, 1981; DUKES, 1996; SENGER, 2003).

Em zebuínos, a concentração plasmática de P_4 aumenta progressivamente a partir do segundo dia após a ovulação até atingir seu platô por volta do oitavo dia do ciclo, o qual é mantido até o dia quinze, quando começa a declinar até atingir níveis basais por volta dos dias 15 a 18, caracterizando a luteólise (FIGUEIREDO *et al.*, 1997).

Gudermann *et al.* (1992) relataram que o LH estimula o CL a secretar progesterona após a ligação com seu receptor e ativação da adenil ciclase, a qual sintetiza AMPc, um mensageiro intracelular responsável por ativar enzimas envolvidas na síntese de P_4.

A progesterona inibe a apoptose nas células luteais pelo mecanismo dependente dos receptores de progesterona (PR), visto que a luteólise estrutural é um pré-requisito para o início da apoptose em células endoteliais do CL bovino (FRIEDMAN *et al.*, 2000; MYAMOTO et al., 2009).

Existem duas formas de PR: *isoformas* A (PAR) e B (PBR). O PAR está intimamente relacionado ao desempenho e as patologias reprodutivas, e sua expressão tem correlação negativa com o PBR na espécie humana (SARTORIUS *et al.*, 1994; PIEBER *et al.*, 2001; NUNES, 2007). Ambas *isoformas* estão presentes no trato reprodutivo feminino durante o ciclo e possuem atividades transcricionais diferentes, sendo que a *isoforma* A parece realizar papel modulador sob a expressão dos ER, PR e OTR no sistema reprodutivo mais importante que o PBR (FUJIMOTO *et al.*, 1997).

No endométrio e na glândula mamária, o estrógeno sensibiliza as células para a ação da P_4, promovendo a expressão do PR (CLARKE, 1990; MARTIN, 2005; MARTIN *et al.*, 2008).

No dia 13 do ciclo estral de vacas Nelore, a concentração proteica de PR no endométrio foi menor comparada aos demais dias do ciclo, ainda quando as concentrações plasmáticas de progesterona oriundas do CL permaceceram elevadas (MARTIN et al., 2008).

Estes receptores estão expressos nos folículos durante todo o ciclo estral de bovinos. No fim do ciclo estral, as baixas concentrações plasmáticas de P_4, associada as concentrações plasmáticas crescentes de estrógeno oriundas do folículo dominante, ocasiona o aumento dos receptores de ocitocina (ROT), redução dos PR e ER no endométrio (CASSAR *et al.*, 2002).

Aparentemente no CL, a expressão do RP é coordenada pela própria progesterona e o pico de LH induz a expressão destes RP. Em bovinos, estão presentes no CL, nas células lúteas grandes e pequenas de vacas gestantes e não-gestantes após 48 horas da ovulação, no entanto, em menores quantidades quando comparadas as concentrações encontradas em folículos (RUEDA *et al.*, 2000; VAN DEN BROECK *et al.*, 2002).

O uso da técnica de RT-PCR determinou a maior expressão de RNAm para o RP no tecido luteal bovino durante o estágio inicial. Houve menor expressão destes durante a fase luteal tardia e após a regressão do CL (SCHAMS & BERISHA, 2002). Porém, os níveis de RNAm mantiveram-se durante a regressão luteal enquanto as células RP positivas na técnica de imunocitoquímica declinaram em primatas (CHANDRASEKHER *et al.*, 1994; SUZUKI *et al.*, 1994; DUFFY & STOUFFER, 1995).

2.2.5 Ocitocina

Outro hormônio produzido pelo CL formado após 10 a 15 dias da ovulação é a OT, um hormônio polipeptídeo produzido também pelos neurônios hipotalâmicos, armazenado e liberado pela neurohipófise (SENGER, 2003).

A OT é responsável por promover as contrações uterinas peri-parto e pela ejeção do leite durante a amamentação. Possivelmente, suas funções relacionam-se com a luteólise por meio das prostaglandinas (DUKES, 1996; SCHAMS & BERISHA, 2002; SENGER, 2003).

A expressão dos OTR no endométrio de bovinos é regulada pelo próprio hormônio OT, pelas concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona, e seus respectivos hormônios (SILVIA *et al.*, 1991; LAMMING & MANN, 1995; MANN & LAMMING, 1995; BOOS *et al.*, 1996; MANN & LAMMING, 2006).

A interpretação dos dados de diversos autores indica que as elevadas concentrações de P_4 proveniente do CL na metade da fase luteal, quando há baixo nível plasmático de estrógeno, acarretam gradativa redução das concentrações endometriais dos ER que alcançam menores valores por volta do 17^o dia do ciclo estral (diestro) em animais de origem taurina e zebuína (HENRICKS & HARRIS, 1978; JENNER *et al.*, 1991; LAMMING & MANN, 1995; BOOS *et al.*, 1996; MANN & LAMMING, 2006; MARTIN *et al.*, 2008).

Em animais *Bos taurus taurus*, a progesterona possui efeito dominante sob o útero, pois inibe a síntese de OTR na primeira metade do ciclo estral (RAZANDI *et al.*, 1999; MANN & LAMMING, 2006).

Na metade da fase luteal, há diminuição dos PR, o que permite a ação do estrógeno produzido pelo folículo dominante e estimula a hipófise e o CL a secretar OT para ligar-se aos seus receptores endometriais. A formação deste complexo hormônio-receptor desencadeia a liberação de $PGF_{2\alpha}$ pelo útero, indispensável para o processo de luteólise (SILVIA *et al.*, 1991; RAZANDI *et al.*, 1999).

Momentos antes da ovulação, as altas concentrações de estrógeno secretadas pelo folículo pré-ovulatório resultam no decréscimo dos OTR, e posteriormente a secreção de progesterona pelo CL, insensibiliza o endométrio à OT durante os primeiros dias do próximo ciclo estral (LAMMING & MANN, 1995).

Desta forma, os OTR variam pouco durante o ciclo estral, exceto pelo período compreendido entre os dias 15 e 17, quando estão presentes em maior concentração, evento relacionado com a luteólise (JENNER *et al.*, 1991; MANN & LAMMING, 2006).

2.2.6 Prostaglandina

As prostaglandinas são substâncias orgânicas derivadas do ácido prostanóico, e estão presentes em diversos tecidos e situações biológicas. Especificamente relacionadas com a reprodução, de acordo com sua estrutura e função podem ser divididas em: E e F (DUKES, 1996).

As prostaglandinas endógenas em geral provocam contrações ou relaxamento das células musculares lisas em diversos órgãos. A série F, especificamente a $F_{2\alpha}$, produzida pelo endométrio, é a de maior importância para a reprodução em ruminantes e está relacionada com o processo da luteólise. A regressão funcional precede a regressão morfológica do CL (TSAI & WILTBANK, 1997; VIANA *et al.*, 1999).

Com o adjunto de fórmulas sintéticas, as aplicações exógenas de prostaglandinas permitiram a aceleração da involução uterina, a modulação da defesa uterina, e a utilização em protocolos de sincronização do estro (FERNANDES *et al.*, 2002a, b; LEWIS, 2004).

2.3 Dinâmica folicular

2.3.1 Folículos pré-antrais

Durante a vida embrionária e a pré-puberdade das fêmeas, a fase inicial de crescimento folicular ocorre independentemente de gonadotropinas e termina quando o folículo ainda é pré-antral. Nessa fase, os principais responsáveis pelo crescimento folicular são alguns fatores de crescimento, tais como, fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I), fator de crescimento transformante (TGF-β), particularmente o fator de crescimento diferencial-9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15 ou GDF-9B), activina e fator de crescimento fibroblástico (FGFb) (SILVIA & PRICE, 2002; HAFEZ & HAFEZ, 2000; BURATINI *et al.*, 2005).

O desenvolvimento folicular pré-antral depende também da proliferação e diferenciação das células da granulosa, processo que ocorre devido a

comunicação intercelular através dos processos citoplasmáticos trans-zonais (TZP) (GILCHRIST *et al.*, 2004).

As TZPs são extensões das células da granulosa que penetram através da zona pelúcida e atingem a membrana do oócito, onde junções do tipo Gap permitem passagem bidirecional de íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas moléculas reguladoras. Estas extensões se retraem quando o folículo atinge o estágio antral, provavelmente pela ação do LH (MCNATTY *et al.*, 1999; ALBERTINI *et al.*, 2001; GILCHRIST *et al.*, 2004).

No entanto, os padrões temporais de secreção desses fatores de crescimento ainda são desconhecidos. Há relatos que o desenvolvimento folicular inicial é estimulado pela ação sinérgica do kit ligante (KL) e da BMP-15, enquanto o GDF-9 é secretado tardiamente por oócitos maduros, promovendo a proliferação das células da granulosa e modulação da função do KL (SHIMASAKI *et al.*, 2003).

O KL produzido pelas células da granulosa de camundongos e o c-kit, receptor para KL expressos pelo oócito, resultam no complexo c-kit/KL. No folículo primordial e primário, este se relaciona com a proliferação das células da granulosa, estimula a síntese de DNA em células da granulosa e a diferenciação de células do estroma em células da teca (YOSHIDA *et al.*, 1997; PARROT & SKINNER, 2000; OTSUKA & SHIMASAKI, 2002).

No estágio secundário, o GDF-9 é essencial para o desenvolvimento dos folículos por potencializar a proliferação das células da granulosa (DONG *et al.*, 1996; BODENSTEINER *et al.*, 1999; VITT *et al.*, 2000a, b).

A interação entre o BMP-15 e o KL é fundamental para o crescimento folicular, mas são descritos algumas formas de regulação destes fatores de crescimento por meio do *feedback*. O BPM-15 estimula a expressão do KL, que, por sua vez, inibe a expressão da BMP-15 (OTUSKA & SHIMASAKI, 2002; SHIMASAKI *et al.*, 2003). Enquanto, o GDF-9 inibe a expressão do KL em células da granulosa de camundongos (JOYCE *et al.*, 2000).

Os mecanismos endócrinos também possuem papel importante no desenvolvimento de folículos pré-antrais, que expressam receptores de IGF-I e proteínas ligantes de IGFBP-2 e 3, que são reguladores da biodisponibilidade de IGFs extra-ovarianos (WEBB *et al.*, 2003).

O desenvolvimento folicular pré-antral também é regulado de forma parácrina pela ativina, a folistatina, a inibina, o fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF) (MCNATTY *et al.*, 1999; SILVIA & PRICE, 2002).

Em bovinos, o FGF-2 foi detectado nos oócitos de folículos primordiais, primários, nas células da granulosa e da teca de folículos pré-antrais em crescimento, em folículos antrais. Este fator é capaz de estimular a ativação de folículos primordiais, em culturas de fragmentos de ovários de ratas, e de promover proliferação de células da granulosa (GOSPODAROWICZ *et al.*, 1989; VAN WEZEL *et al.*, 1995; NILSSON *et al.*, 2001; SILVIA & PRICE, 2002).

Como os demais TGFs, a BMP-15 também estimula desenvolvimento folicular devido ao aumento da sensibilidade ao FSH (OTSUKA *et al.*, 2001; SHIMASAKI *et al.*, 2003).

2.3.2 Folículos antrais

Ainda quando os folículos são pré-antrais, ocorre a síntese de receptores para o FSH nas células da granulosa e para o LH nas células da teca. Com isso, inicia-se uma fase de desenvolvimento folicular dependente de gonadotropinas, caracterizada pelo recrutamento de um grupo de pequenos folículos (emergência folicular) com intervalos de aproximadamente dez dias, sob a influência do FSH secretado após as fêmeas atingirem a puberdade (GINTHER *et al.*, 1989a; XU *et al.*, 1995; KINDER *et al.*, 1996; WILTBANK *et al.*, 1996; CONLEY, 2001; KOMAR *et al.*, 2001; ROSENFELD *et al.*, 2001; SENGER, 2003).

Nas células da granulosa, o FSH estimula a ativação da enzima P450 aromatase, responsável pela metabolização e trasnformação de andrógenos em estradiol. A influência do FSH e do estradiol acarreta alterações morfológicas no folículo, que passa a apresentar uma cavidade repleta de líquido em seu interior, sendo assim chamado de folículo antral (FORTUNE & QUIRK, 1988; SENGER, 2003).

Entre todos esses folículos, apenas um continua seu desenvolvimento, o folículo dominante, caracterizado por apresentar maior capacidade de produzir 17β-estradiol em relação aos demais recrutados no início da onda. Os demais folículos denominados subordinados começam a apresentar taxa de

crescimento gradativamente menor e posteriormente entram em atresia (LUCY *et al.*, 1992; BAO & GARVERICK, 1998; GINTHER *et al.*, 1989a).

O momento em que se detecta a diferença entre a taxa de crescimento do folículo dominante e do maior folículo subordinado é denominado de desvio ou divergência folicular, que em zebuínos ocorre, respectivamente 2,7 e 3,8 dias após a emergência folicular, quando o folículo dominante possui de 5,4 a 6,1 mm em zebuínos (GIMENES *et al.*, 2005; SARTORELLI *et al.*, 2005; CASTILHO *et al.*, 2006) e entre 10 e 12 mm em *Bos taurus taurus* (TAYLOR *et al.*, 1991; GINTHER *et al.*, 1996).

O sistema IGF atua de forma sinérgica com o FSH no processo de divergência folicular e produção de estrógenos (FORTUNE *et al.*, 2004). Os IGF-I e II são expressos nas células da granulosa e da teca, no entanto, o IGF-II atua de forma parácrina (intraovariana) enquanto o IGF-I atua via endócrina (YUAN *et al.*, 1998; WEBB *et al.*, 1999; ARMSTRONG *et al.*, 2000; BURATINI, 2007).

Os IGFs estimulam a expressão de seus receptores específicos nas células da teca e da granulosa, que estão presentes em concentrações diferentes quando comparados folículos dominantes e subordinados (SPICER *et al.*, 2004). Antes do desvio, o IGF-I livre apresenta-se em maiores concentrações no fluído folicular do maior folículo se comparado às presentes no folículo subordinado (De LA SOTA *et al.*, 1996; BEG *et al.*, 2002)

As proteínas ligantes aos IGFs (IGFBP) modulam as concentrações disponíveis de IGFs na corrente sanguínea e estão presentes no fluido folicular bovino (FORTUNE et al., 2001). A concentração de IGFBP-4 nos folículos dominantes encontra-se reduzida quando comparada aos subordinados, devido à degradação proteolítica destas proteínas ligantes pela proteína plasmática associada à gestação (PAPP-A), refletindo em maiores concentrações de IGF livre capaz de estimular o maior desenvolvimento do folículo dominante (MIHM *et al.*, 2000; MAZERBOURG *et al.*, 2001).

A degradação da IGFBP-5 foi mais alta no maior folículo antes do momento do desvio folicular. Este fenômeno ocorre mais tardiamente no caso dos níveis transcrionais da IGFBP-2, que parece ser regulada pelo FSH (WEBB *et al.*, 2003; FORTUNE *et al.*, 2004).

Após a divergência folicular durante o diestro, fase em que está presente o CL oriundo do ciclo anterior e estão altos os níveis plasmáticos de P_4, responsáveis pela redução da frequência da pulsatilidade de LH, há o desvio folicular, porém o folículo dominante entra em processo de atresia, tornando-se anovulatório. A partir desse momento observa-se a emergência de uma nova onda de crescimento folicular (GINTHER *et al.*, 1989b; NISWENDER *et al.*, 1994; MONNIAUX *et al.*, 1997; WEBB *et al.*, 1999; SENGER, 2003; SCHILLO, 2009).

No entanto, se após a divergência ocorrer a regressão luteínica, com consequente diminuição da concentração plasmática da progesterona, o folículo dominante continua o seu crescimento, secreta grande quantidades de estradiol, promovendo o pico ovulatório de LH, que desencadeia a ovulação e à maturação oocitária, com retomada da meiose que havia sido interrompida no início do desenvolvimento folicular (NISWENDER *et al.*, 1994; FORTUNE *et al.*, 2004; SENGER, 2003).

2.3.3 Luteinização

Durante a ovulação ocorre a ruptura da membrana folicular composta pelas células da teca (externa e interna) e da granulosa, e a expulsão do oócito. Imediatamente, a parede do folículo é colapsada e a cavidade invadida por linfa e sangue dos capilares, que serão os componentes de uma nova estrutura, o corpo hemorrágico (DIAZ *et al.*, 2002).

Subsequentemente, o corpo hemorrágico reorganiza-se e origina o corpo lúteo (CL), sob a influência de fatores angiogênicos e mitogênicos (FGF-2, TGF-β, IGF-I, fator de crescimento semelhante à heparina e fator de crescimento endotelial vascular) (SENGER, 2003; GIOMETTI *et al.*, 2009).

O crescimento do CL ocorre rapidamente a partir da proliferação celular e da diferenciação das células da granulosa em células luteínicas grandes, que apresentam receptores para LH, responsáveis pela síntese das elevadas concentrações de progesterona, e das células da teca remanescentes do folículo ovulado em células luteínicas pequenas (LEI *et al.*, 1991; NISWENDER *et al.*, 1994; NISWENDER, 2002).

O CL é primariamente reconhecido pela habilidade em sintetizar e secretar progestágenos, hormônios que estão intimamente relacionados com a

manutenção de um ambiente adequado ao desenvolvimento embrionário e pela própria manutenção do CL durante o período da ovulação até a implantação, quando ocorre o reconhecimento materno da gestação (NISWENDER, 2002).

Além da progesterona, o CL após 10 a 15 dias de vida, produz uma substância denominada OT, que juntamente com a P_4 e o E_2, regulam o fenômeno da luteólise (LAMMING & MANN, 1995; MCCRACKEN *et al.*, 1999).

2.3.4 Luteólise

A regressão morfológica e funcional do CL ocorre 17 a 20 dias após a ovulação durante um ciclo estral de aproximadamente 21 dias. Este processo é denominado luteólise e determina a duração do ciclo estral (SENGER, 2003).

As concentrações plasmáticas de E_2, P_4 e OT estão relacionadas com a secreção de $PGF_{2\alpha}$, substância responsável pela luteólise, que é secretada pelo endométrio bovino de maneira pulsátil e mensurada através do metabólito da prostaglandina $F_{2\alpha}$ encontrada na circulação sanguínea, a 13, 14 diidr-15ceto prostaglandina (PGFM) (IRELAND *et al.*, 1984; VILLA-GODDOY, 1985; ZHANG *et al.*, 1991; SILVIA *et al.*, 1991; MCCRACKEN *et al.*, 1999; SALFEN *et al.*, 1999; MANN *et al.*, 2001; CASTRO E PAULA, 2003; BERTAN, 2004).

A OT participa na luteólise concomitantemente com o estradiol e a $PGF_{2\alpha}$ por também estimular a produção desta pelo endométrio ().

As concentrações plasmáticas de estrógenos regulam o processo da luteólise agindo diretamente sob a cascata de produção de $PGF_{2\alpha}$, iniciada pela ativação da fosfolipase C (WALKER *et al.*, 1997).

Outros autores sugerem uma ação indireta, onde o estradiol proveniente dos folículos em crescimento é responsável pelo aumento na concentração de receptores endometriais de OT associada à sensibilização prévia pela progesterona no final da fase luteínica, e que a OT proveniente do CL ou da neurohipófise, ao acoplar-se a estes receptores, estimula a secreção endometrial de $PGF_{2\alpha}$ (MCCRACKEN *et al.*, 1984; VALLET *et al.*, 1990; ZHANG *et al.*, 1992; WATHES & LAMMING, 1995; KAMMINSKI *et al.*, 1997; WALKER *et al.*, 1997; MCCRACKEN *et al.*, 1999).

Wathes *et al.* (1983, 1984) e Fields *et al.* (1985, 1992) corroboraram com esta hipótese ao demonstrarem que a OT é de fato secretada pelo CL e interage com receptores endometriais próprios (FUCHS *et al.*, 1990) para

estimular a secreção de $PGF_{2\alpha}$, culminando com a lise do CL (GROSS *et al.*, 1988; PUTNEY *et al.*, 1989; GINTHER *et al.*, 2000; MANN *et al.*, 2001; HAFEZ & HAFEZ, 2000).

Após a luteólise, os elevados níveis plasmáticos de E_2 estimulam os neurônios Kiss-1 no centro pré-ovulatório hipotalâmico, responsável pela liberação de GnRH, que por sua vez, desencadeia o pico pré-ovulatório de LH pela hipófise (KRIEGSFELD, 2006; KRIEGSFELD & SILVER, 2006; SCHILLO, 2009).

Diversos estudos demonstraram que a relação inversa entre as concentrações da P_4 e do E_2 é determinante no controle da frequência dos pulsos de LH (KESNER *et al.*, 1981; BUTLER *et al.*, 1983; STUMPF *et al.*, 1993; BERGFELD *et al.*, 1995; CUPP *et al.*, 1995; MILVAE *et al.*, 1996; ERENO, 2003).

O estrógeno estimula positivamente o centro pré-ovulatório e negativamente o centro tônico hipotalâmico, que induz a liberação de LH de forma constante, caracterizada por altas concentrações e com alta intensidade pela hipófise (SCHILLHO, 2009; WU *et al.*, 2009).

As condições onde as concentrações séricas de E_2 estão baixas associada às altas concentrações de P_4, caracterizam-se por baixas concentrações de LH secretados continuamente com grande frequência em pequena intensidade, oriundos da estimulação do GnRH secretado da mesma maneira (KRIEGSFELD, 2006; KRIEGSFELD & SILVER, 2006).

Durante o diestro, onde estão presentes um folículo dominante e o CL funcional, há um efeito inibitório do centro pré-ovulatório hipotalâmico e ausência do pico de LH (KRIEGSFELD *et al.*, 2006; SCHILLHO, 2009).

2.4 Agonistas de GnRH

Os agonistas de GnRH (GnRHa) são peptídeos sintéticos obtidos a partir de simples e duplas substituições na sequência de aminoácidos do GnRH, com intuito de retardar a degradação rápida destas substâncias pelo organismo, o que permite a sua utilização em pequenas doses e almejar os mesmos resultados que o GnRH convencional (PADULA, 2005).

Comparado ao hormônio liberador de gonadotrofinas, os GnRHa possuem maior meia-vida e afinidade aos receptores de GnRH, promovendo

intensa resposta aguda pelo organismo frente a estimulação sistêmica com GnRHa. Entre os GnRHa destacam-se: a Deslorelina, Buserelina, Leuprolide e a Gusorelina (D'OCCHIO *et al.*, 2000; MATTOS, 2001).

Este análogo sintético, de forma sistêmica ou por meio de implantes subcutâneos, tem sido usado para tratamento em animais para controle reprodutivo em geral. Há relatos na literatura da sua utilização na forma de implantes em cadelas e em felinos selvagens com intuito de realizar o controle populacional e/ou evitar acasalamentos indesejados entre animais consanguíneos por meio da indução do anestro (Padula *et al.*, 2005).

As vias parenterais, intra-venosa, intra-muscular e subuctânea, são as mais utilizadas. As vias alternativas de tratamento como a forma oral não é eficiente, no entanto, ainda estão sendo estudadas as vias de administração intra-vaginal e intra-nasal (PADULA, 2005).

Estes são utilizados ainda de forma injetável sistêmica durante o tratamento de tumores prostáticos em humanos, os protocolos de sincronização do estro em programas de IATF em bovinos, como indutor da ovulação em equinos, bem como no tratamento de folículos anovulatórios persitentes em vacas de leite (MATTOS *et al.*, 2001; D'OCCHIO *et al.*, 2000; PADULA, 2005; JUNAIDI *et al.*, 2007).

Quando tratado com GnRHa de forma prolongada por meio de implantes subcutâneos, o organismo responde de duas maneiras distintas. A primeira delas trata-se da fase aguda, que perdura vários dias e caracteriza-se pelo aumento imediato das concentrações plasmáticas de LH e FSH, seguido pelo retorno destas concentrações em níveis basais (D'OCCHIO *et al.*, 2000; PADULA, 2005).

A administração na forma de implantes com GnRHa promove a *downregulation* dos GnRHR hipofisários pela dessensibilização dos GnRHR nas células gonadotróficas através da interrupção da sinalização do segundo mensageiro, bloquiando assim a liberação de LH pela hipófise. A liberação de FSH se mantem em níveis basais ao longo de todo período. Consequentemente, as concentrações plasmáticas dos hormônios esteróides se mantem baixas (GONG *et al.*, 1996; D'OCCHIO *et al.*, 2000; MATTOS *et al.*, 2001; PADULA, 2005).

A posologia dos diferentes tipos de GnRHa que deve ser empregada ainda é uma questão polêmica de acordo com o efeito desejado e a espécie a ser tratada, uma vez que a via de aplicação, a sensibilidade e os efeitos entre as espécies, assim como o sexo do animal ocasionam respostas fisiológicas distintas (D'OCCHIO *et al.*, 2000; JIMÉNEZ-SEVERIANO *et al.*, 2005).

Atualmente no Brasil, estão sendo desenvolvidos e há alguns produtos de aplicação injetável contendo GnRHa disponíveis no mercado. No entanto, não são encontrados fabricantes brasileiros do produto na forma injetável e de implantes subcutâneos. Este fato torna dispendiosa a aquisição por meio da importação, o que inviabiliza a sua distribuição e uso comercial em larga escala.

Em estudos *in vitro* ou utilizando camundongos, são utilizados para verificar o padrão de liberação de gonadotrofinas em diferentes estádios da vida e tipos celulares, bem como para quantificar a ligação com seu receptor e a expressão dos receptores do GnRH, FSH e LH (PADULA, 2005).

Recentemente, Silvestre *et al.* (2009a, b) corroboraram por meio da avaliação da dinâmica folicular o que havia sido descrito por Gong *et al.* (1995,1996) e Mattos *et al.* (2001) quanto aos efeitos da utilização crônica dos GnRHa, ao utilizar implantes subcutâneos. Going *et al.* (1996) relatam que a Buserelina inibi o padrão de liberação pulsátil de LH e FSH após 8 e 30 dias de tratamento, respectivamente.

Silvestre et al. (2009a, b) hipotetizaram que as baixas concentrações plasmáticas de LH e FSH relacionavam-se com a maximização no processo de involução uterina, o que foi comprovado juntamente com a verificação da redução no intervalo entre partos (IP) durante a realização do estudo utilizando vacas Holandesas tratadas com implantes subcutâneos de Deslorelina durante o anestro pós-parto.

3. REFERÊNCIAS

ALBERTINI, D. F.; COMBELLES, C. M. H.; BENECCHI, E.; CARABATSOS, M. J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, p. 647-653, 2001.

ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2004. 369p.

ARMSTRONG, D. G.; GUTIERRREZ, C. G.; BAXTER, G.; GLAZYRIN, A. L.; MANN, G. E.; WOAD, K. J.; HOGG, C. O.; WEBB, R. Expression of RNAm encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. **Journal of Endocrinology**, v. 165, p. 101-113, 2000.

AUSTIN, E. J.; MIHM, M.; EVANS, A. C. O.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. L. H.; IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Alterations in intrafolicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first wave of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 839-848, 2001.

BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of animal Science**, v. 76, p. 1903-1921, 1998.

BARROS, C. M.; BETTS, J. G.; THATCHER, W. W.; HANSEN, P. J. Possible mechanisms for reduction of circulating concentrations of progesterone by interferon- I in cows: effects on hiperthemia, luteal cells, metabolism of progesterone and secretion of LH. **Journal of Endocrinology**, v. 133, p. 157-182, 1992.

BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; PAPA, F.O.; ROCHA, G. Follicular growth in Nelore cows (*Bos taurus indicus*) $PGF_{2\alpha}$ administration. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 1, p. 216, 1993.

BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; PINHEIRO, O. L. Estro ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, n. 1-2, p. 9-22, 1995.

BARTOL, F. F.; THATCHER, W. W.; LEWIS, G. S.; BLISS, E. L. L.; DROST, E. L.; BAZER, F. W. Effects of estradiol-17β on PGF and total protein content in bovine uterine flushings and peripheral blood concentrations of 13,14-dihydro-15keto PGF2α. **Theriogenology**, v. 15, p. 345-358, 1981.

BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of reproduction**, v. 64, p. 432-441, 2001.

BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; GUINTHER, O. J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of Reproduction**. v. 66, p. 120-126, 2002.

BERGFELD, E. G.; KOJIMA, F. N.; WEHRMAN, M. E.; CUPP, A. S.; MARISCAL, V. E.; SANCHEZ, T. E.; KITTOK, R.; GARCIA-WINDR, M.;

KINDER, J. E. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17b-estradiol in cows is related to concentration of progesterone in circulation when the progesterone comes from either an endogenous or exogenous source. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 257, 1995.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPAINER, R. Expression and localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (FGF-2) during the final growth of bovine ovarian follicles. **Journal of Endocrinology**, v. 167, p. 371-382, 2000.

BERISHA, B.; PFAFFL, M. W.; SCHAMS, D. Expression of Estrogen and Progesterone Receptors in the Bovine Ovary During Estrous Cycle and Pregnancy. **Endocrine**, v. 17, n. 3, p. 207–214, 2002.

BERTAN, C. M. **Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina F2α no endométrio de fêmeas bovinas**. 2004. 180p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BLEY, M. A.; SARAGÜETA, P. E.; BARAÑAO, J. L. Concerted stimulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis by sex steroids and follicle-stimulating hormone. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 62, n. 1, p. 11-19, 1997.

BODENSTEINER, K. J.; CLAY, C. M.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R. Molecular Cloning of the Ovine Growth/Differentiation Factor-9 Gene and Expression of Growth/Differentiation Factor-9 in Ovine and Bovine Ovaries. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 381-386, 1999.

BOOS, A.; MEYER, W.; SCHWARZ, R.; GRUNERT, E. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 44, p. 11-21, 1996.

BURATINI JR., J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 190-196, 2007.

BURATINI JR., J.; TEIXEIRA, A. B.; COSTA, I. B.; GLAPINSKI, V. F.; PINTO, M. G. L.; GIOMETTI, I. C.; BARROS, C. M.; CAO, M.; NICOLA, E. S.; PRICE, C. A. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate

receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4 in bovine antral follicles. **Reproduction**, v. 130, p. 343-350, 2005.

BUTLER, W. R.; KATZ, L. S.; ARRIOLA, J.; MILVAE, R. A.; FOOTE, R. H. On the negative feedback regulation of gonadotropins in castrate and intact cattle with comparison of two FSH radioimmunoassay. **Journal of Animal Science**, v. 56, n. 4, p. 919-929, 1983.

CÁRDENAS, H.; BURKE, K. A.; BIGSBY, R. M.; POPE, W. F.; NEPHEW, K. P. Estrogen receptor β in the sheep ovary during the estrous cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 128-134, 2001.

CASSAR, C. A.; DOW, M. P. D.; PURSLEY, J. R.; SMITH, G. W. Effect of the preovulatory LH surge on bovine follicular progesterone receptor RNAm expression. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 22, n. 3, p. 179-187, 2002.

CASTILHO, C.; GARCIA, J. M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G. P.; BRITO, L. F. C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction of Science**, v. 98, p. 189-196, 2006.

CASTRO E PAULA, L. A. **As funções do estradiol no processo da luteólise em bovinos: o papel da ocitocina na produção de PGF2α**. 2003. 202p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CASTRO E PAULA, L. A.; LOUREIRO, J. G. P.; MEMBRIVE, C. M. B.; CUNHA, P. M.; BERTHOLAZZI, A.; JORGE, P.; MADUREIRA, E. H.; BINELLI, M. Effects of estradiol-17β on prostaglandin F2alpha (PGF) secretion in cattle: in vitro in vivo responses. **Biology and Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 324, 2002.

CHANDRASEKHER, Y. A.; MELNER, M. H.; NAGALLA, S. R.; STOUFFER, R. L. Progesterone receptor, but not estradiol receptor, messenger ribonucleic acid is expressed in luteinizing granulosa cells and the corpus luteum in rhesus monkeys. **Endocrinology**, v. 135, p. 307–314, 1994.

CLARKE, J. J. GnRH Secretion. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 5., 1988, Dublin. **Anais…** Dublin: 1988.

CLARKE, C.L., SOUTHERLAND, R.L. Progestin regulation of cellular proliferation. **Endocrine Review**, v. 11, p. 266-301, 1990.

CONLEY, A.; HINSHELWOOD, M. Mammalian aromatases. **Reproduction**, v. 21, p. 685- 695, 2001.

COUSE, J. F.; LINDZEY, J.; GRANDIEN, K.; GUSTAFSSON, J. A.; KORACH, K. S. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-α (ERα) and estrogen receptor-ß (ERß) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERα-knockout Mmouse. **Endocrinology**, v. 138, n. 11, p. 4613-4621, 1997.

CUNNIGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3ª Ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan. 2008, 579p.

CUPP, A. S.; STUMPF, T. T.; KOJIMA, F. N.; WERTH, L. A.; WOLFE, M. W.; BOBERSON, M. S.; KITTOK, R. J.; KINDER, J. E. Secretion of gonadotropins changes during the luteal phase of the bovine oestrous cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or 17β-oestradiol. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 2, p. 109-119, 1995.

DE LA SOTA, R. L.; SIMMEN, F. A.; DIAZ T.; THATCHER, W. W. Insulin-like growth factor system in bovine firstwave dominant and subordinate follicles. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 803-812, 1996.

DIAZ, F. J.; ANDERSON, L. E.; WU, Y. L.; RABOT, A.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Regulation of progesterone and prostaglandin F2α production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, p. 65-68, 2002.

D'OCCHIO, M. J.; FORDYCEB, G. WHYTEA, T. R. ASPDENA, W. J. TRIGG, T. E. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 433-442, 2000.

DONG, J.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T. R.; LU, N.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor- 9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531-535, 1996.

DUKES, H. H. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro. 1996, 856p.

DUFFY, D. M.; STOUFFER, R. L. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the primate corpus luteum during the menstrual cycle: possible regulation by progesterone. **Endocrinology**, v. 136, p. 1869-1876, 1995.

ERENO, R. L. **Avaliação da taxa de prenhez em novilhas tratadas com protocol GnRH-PGF2α-Benzoato de estradiol (GPE) e em vacas submetidas à tratamentos hormonais com progesterona associados ou não a remoção temporária de bezerros**. Botucatu: Universidade Estadual

Paulista Julio de Mesquita, 2003. 73p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita, 2003.

FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A.M. Efeito do cloprostenol sódico no pós-parto de vacas leiteiras e retorno á atividade reprodutiva. **Hora Veterinária**, n.126, p.13-17, 2002a.

FERNANDES, C. A. C.; VIEIRA, M.R.; VALLE, M. A. G. Efeito do cloprostenol sódico no pós-parto de vacas leiteiras sobre a incidência de infecções uterina e fertilidade. **Hora Veterinária**, n.127, p.41-45, 2002b.

FERRIS, H. A.; SHUPNIK, M. A. Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GnRH. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 993-998, 2006.

FIELDS, M. J.; BARROS, C. M.; WATKINS, W. B.; FIELDS, P. A. Characterization of large luteal cells and their secretory granules during the estrous cycle of the cow. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 535-545, 1992.

FIELDS, M. J.; DUBOIS, W.; FIELDS, P. A. Dynamic features of luteal granules ultrastructural changes during the course of pregnancy in the cow. **Endocrinology**, v. 17, p. 1675-1682, 1985.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (Bos indicus) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648-654, 2001.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironmet in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

FORTUNE, J. E.; QUIRK, S. M. Regulation os steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 1-8, 1998.

FRIEDMAN, A.; WEISS, S.; LEVY, N.; MEIDAN, R. Role of tumor necrosis factor A and its type i receptor in luteal regression: induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells. **Biology and Reproduction**, v. 63, p. 1905-1912, 2000.

FUCHS, A. R.; BEHRENS, O.; HELMER, H.; LIU, C. H.; BARROS, C. M.; FIELDS, M. J. Oxytocin and vasopressin receptors in bovine endometrium and

myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. **Endocrinology**, v. 127, p. 629-636, 1990.

FUJIMOTO, J.; ICHIGO, S.; HIROSE, R.; SAKAGUCHI, H.; TAMAYA, T. Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B RNAms in secondary spreading of gynecologic cancers. **Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 62, p. 449-454, 1997.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cel interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 431-446, 2004.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M.; BARUSELLI, P. S. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 210, 2005.

GINTHER, O. J.; KASTELICK, J. P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 20, p. 187-200, 1989a.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989b.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L. J.; WILTBANK, M. C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 75-87, 1997.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, p. 1079-1093, 1999.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicles in cattle and horses. Animal Reproduction Science, v. 60-61, p. 61-79, 2000a.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 638-647, 2001.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 383-389, 2000b.

GIOMETTI, I. C.; CASTILHO, A. C. S.; SÁ FILHO, O. G.; PAPA, P. C.; BURATINI JR, J. Controle local e endócrino do desenvolvimento e da regressão do corpo lúteo bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 1, p. 34-52, 2009

GLENCROSS, R. G.; POPE, G. S. Concentrations of estradiol-17β and progesterone in the plasma of dairy heifers before and after clorprostenol-induced and natural luteolysis and during early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 4, p. 93-106, 1981.

GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of fsh and lh, and ovarian function in heifers. journal of reproduction and fertility, v. 105, p. 263–270, 1995.

GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; BRAMLEY, T. A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. biology and reproduction, v. 55, p. 68–74, 1996.

GOSPODAROWICZ, D.; PLOUET, J.; FUJII, D. K. Ovarian germinal epithelial cells respond to basic fibroblast growth factor and express its gene: implications for early folliculogenesis. **Endocrinology**. v. 125, p. 1266- 1276, 1989.

GROSS, T. S.; THATCHER, W. W.; HANSEN, P. J.; JOHNSON, J. W.; LACROIX, M. C. Prostaglandin secretion by perifused bovine endometrium: secretion towards the myometrium and luminal sides at day 17 post-estrous as altered by pregnancy. **Prostaglandins**, v. 35, p. 342-357, 1988.

GUDERMANN, T.; BIRNBAUMER, M.; BIRNBAUMER, L. Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca^{2+} mobilization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 7, p. 4479-4488,1992.

HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. Reprodução Animal. 7.ed. São Paulo: Manole, 2000.

HANUKOGLU, I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 43, p. 779-804, 1992.

HENRICKS, D. M.; HARRIS, R. B. Cytoplasmatic estrogen receptor and estrogen concentrations in bovine uterine endometrium. **Endocrinology**, v. 103, p. 176-185, 1978.

HIXON, J. E.; FLINT, A. P. F. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prodtaglandin F2α secretion in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 79, p. 457-467, 1987.

HOMANICS, G. E.; SILVIA, W. J. Effects of progesterone and estradiol-17β on uterine secretion of prostaglandin F2α in response to oxytocin in ovariectomized ewes. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 804-811, 1988.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Disponível em:** http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/default.shtm#animal. Acesso em: dezembro de 2008.

International embryo transfer society – IETS. **Disponível em:** http://www.iets.org/index.asp?error=login. Acesso em dezembro de 2008.

IRELAND, J. J.; COULSON, D. B.; MURPHEE, R. L. Follicular development during four stages of the estrous cycle in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 50, p. 760, 1979.

IRELAND, J. J.; FOGWELL, R. L.; OXENDER, W. D.; AMES, K.; COWLEY, J. L. Production of estradiol by each ovary during the estrous cycle of cows. **Journal of Animal Science**, v. 59, n. 3, p. 764-771, 1984.

JENNER, L.J.; PARKINSON, T.J.; LAMMING, G.E. Receptores uterinos em vacas cíclicas e grávidas. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 91, p. 49-58, 1991.

JIMÉNEZ-SEVERIANO, H.; MUSSARD, M. L.; FITZPATRICK, L. A.; D'OCCHIO, M. J.; FORD, J. J.; LUNSTRA, D. D.; KINDER, J. E. Testicular development of Zebu bulls after chronic treatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2111-2122, 2005.

JOYCE, I. M.; CLARK, A. T.; PENDOLA, F. L.; EPPIG, J. J. Comparison of recolbiment growth factor-9 and oocyte regulation of Kit ligand messenger

ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. **Biolology of Reproduction**, v. 63, p. 1669-1675, 2000.

JUNAIDI, A.; WILLIAMSON, P. E.; MARTIN, G. B.; STANTON, P. G.; BLACKBERRY, M. A.; CUMMINS J. M.; TRIGG T. E. Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 891–898, 2007.

KAMINSKI, M. A.; HAYES, S. H.; SILVA, W. J. Effects of progesterone with drawal on uterine secretion of prostaglandin F2α in response to oxytocin in ewes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 255-262, 1997.

KESNER, J. S.; CONVEY, E. M.; ANDERSON, C. R. Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release. **Endocrinology**, v. 108, n. 4, p. 1386-1391, 1981.

KINDER, J. S.; KOJIMA, F. N.; BERGFELD, E. G. M.; WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 6, p. 1424-1440, 1996.

KIMBALL, F.A.; HANSEL, W. Estrogen binding protein in bovine endometrium and corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 11, p. 566-577, 1974.

KNICKERBOCKER, J. J.; THATCHER, W. W.; FOSTER, D. B.; WOLFWNSON, D.; BARTOL, F. F.; CATON, D. Uterine prostaglandin and blood flow responses to estradiol-17β in cyclic cattle. **Prostaglandins**, v. 31, p. 757-770, 1986.

KOMAR, C. M.; BERNDTSON, A. K.; EVANS, A. C. O.; FORTUNE, J.E. Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decrease in estradiol and androgen, and in messenger RNA for P450 aromatase and P450 17α-hydroxilase, in bovine preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1979-2003, 2001.

KRIEGSFELD. L. J. Driving reproduction: RFamide peptides behind the wheel. **Hormones and Behavior**, v. 50, p. 655–666, 2006.

KRIEGSFELD. L. J.; SILVER, R. The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. **Hormones and Behavior**, v. 49, p. 557–574, 2006.

KUIPER, G. G. J. M.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and

ovary. Proceeding of the National **Academy of Sciences**, v. 93, p. 5925-5930, 1996.

KUIPER, G. G. J. M.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HÄGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors a and b. **Endocrinology**, v. 138, p. 863–870, 1997.

KUIPER, G. G. J. M.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; VAN DER SAAG, P. T.; VAN DER BURG, B.; GUSTAFSSON, J. A. Interaction of estrogenic cemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4252-4263, 1998.

KULICK, L. J; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER,O. J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular waves in heifers. **Theriogenology**, v. 52, p. 913-921, 1999.

LAMMING, G. E.; MANN, G. E. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F2α production in cows by progesterone and oestradiol. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 69-73, 1995.

LARSON, G. H.; WILLIAMS, W. F.; GROSS, T. S.; RUSSEK-COHEN, E.; MANSPEAKER, J. E. Systemic 13, 14-dihydro-15-ket-prostaglandin F2α (PGFM) response to exogenous estradiol by luteal heifers on days 14 and 19 of the estrous cycle and on day 19 of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 25, p. 31-9, 1991.

LAU, T. M.; KERTON, D. J.; GOW, C. B.; FAIRCLOUGH, R. J. Role of progesterone in the control of endometrial oxytocin receptors at luteolysis in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 229-233, 1993.

LEI, Z. M.; CHEGINI, N.; RAO, CH. V. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 1148-1156, 1991.

LEMON, M. The effect of oestrogens alone or in association with progestagens on the formation and regression of the corpus luteum of the cyclic cow. **Annales de Biologie Animale, Biochimie Biophysique**, v. 15, n. 2, p. 243-253, 1975.

LEWIS, G. S. Steroidal regulation of immune defenses. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 281-294, 2004.

LIMA, S. R. S. **Ginecomastia**. 2008. 56p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Portugal.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. **Journal of Reprodution and Fertility**, v. 104, p. 1-5, 1995.

MANN, G. E.; PAYNE, J. H.; LAMMING, G. E. Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin F2α secretion by the bovine and ovine uterus in vivo. **Domestic Animal Endocrinology,** v. 21, p. 127–141, 2001.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Timing of prostaglandin F2α release episodes and oxytocin receptor development during luteolysis in the cow. **Animal of Reproduction and Science**, v. 93, p. 328–336, 2006.

MARTIN, I. **Avaliação ultra-sonográfica, perfil hormonal e imunoistoquímica de receptores de estrógeno e progesterona durante o ciclo estral em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*).** Botucatu, 2005. 140p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Botucatu, 2005.

MARTIN, I.; COSTA, I. B.; MACHADO, M. F.; CASTILHO, A. C. S.; VETORATTO, L. F.; BURATINI Jr., J.; OBA, E.; FERREIRA, J. C. P. Expressão gênica do receptor de ocitocina no endométrio de vacas Nelore (*Bos Taurus indicus*) durante o ciclo estral. **In:** XVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, v. 34, 2006, Araxá. Anais…Araxá: Acta Scientiae Veterinariae, 2006, v. 34, sup. 1, p. 329.

MARTIN, I.; TORRES NETO, R.; OBA, E.; BURATINI Jr., J.; BINELI, M.; LAUFER-AMORIM, R.; FERREIRA, J. C. P. Immunohistochemical detection of receptors for oestrogen and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrus cycle in Nelore (Bos taurus indicus) cows. **Reproduction Domestic Animals**, v. 43, n. 4, p. 415-421, 2008.

MATTOS, R.; ORLANDI, C.; WILLIAMS, J.; STAPLES, C.R.; TRIGG, T.; THATCHER, W.W. Effect of an implant containing the GnRH agonist deslorelin on secretion of LH, ovarian activity and milk yield of postpartum dairy cows. **Theriogenology** , v. 56, p. 371-386, 2001.

MAZERBOURG, S.; OVERGAARD, T. M.; OXVIG, C.; CHRISTIAMSEN, M.; CONOVER, A. C.; LAURENDEAU, I.; VIDAND, M.; TOSSER-KLOPP, G.; ZAPF, J.; MONGET, P. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPPA) in ovine, bovine, porcine and equine ovarians follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and RNAm expression during follicular development. **Endocrinology**. v. 142, p. 5243-5253, 2001.

MCCRACKEN, J. A., SCHRAM, W., OKULICZ, W. C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF2α from the ovine uterus during luteolysis amd its abrogation in early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p. 31-56, 1984.

MCCRACKEN, J. A., CUSTER, E .E., LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiology Review**, v. 79, p. 263-323, 1999.

MCDONALD, L. E. **Veterinary endocrinology and reproduction**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989.

MCNATTY, K. P.; HEATH, D. A.; LUNDY, T.; FIDLER, A. E.; QUIRKE, L.; O'CONNELL, A.; SMITH, P.; GROOME, N.; TISDALL, D. J. Control of early ovarian follicular development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 3-16, 1999.

MIHM, M.; AUSTIN, E. J.; GOOD, T. E. M.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.; ROCHE, J. F.; IREALND, J. J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 811-819, 2000.

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

MONNIAUX, D.; HUET, C.; BESNARD, N.; CLEMENT, F.; BOSC, M.; PISSELET, C.; MONGET, P.; MARIANA, J. C. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 3-23, 1997.

MOSSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKMA, S. EβR: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **Febs Letters**, v. 392, p. 49-53, 1996.

MOWA, C. N.; IWANGA, T. Differential distribution of estrogen receptor – α, β m RNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization. **Journal of Endocrinology**, v. 165, p. 59-66, 2000a.

MOWA, C. N.; IWANGA, T. Developmental changes of the estrogen receptor – alpha and beta m RNA in the female reproductive organ of the rat – na analysis by in situ hybridization. **Journal of Endocrinology**, v. 167, p. 363-369, 2000b.

MYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; SASAHARA, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: impacto f angiogenic and vasoactive factors. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 159-169, 2009.

NETT, T. M.; TURZILLO, A. M.; BARATTA, M.; RISPOLI, L. A. Pituitary effects of steroids hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 33-42, 2002.

NILSSON, E.; PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 175, p. 123-130, 2001.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; MCGUIRE, W. J.; BELFIORE, C. J.; WILTBANK, M. C. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 239-247, 1994.

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

NOGUEIRA, M. F. G.; PINTO, M. L. G.; RAINHO, C. A.; AVELLAR, M. C. W.; PRICE, C. A.; BURATINI, J. R. J.; BARROS, C. M. Expressão das isoformas do gene codificador do receptor de LH em células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2005 (resumo aceito).

NUNES, C. B. **Estudo imunoistoquímico comparativo entre seis anticorpos anti-HER2 em arrays de carcinomas mamários: correlação com hibridação in situ cromogênica e avaliação interobservador**. Belo Horizonte, 2007. 97p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

OKUDA, K.; UENOYAMA, Y.; NAITO, C.; SAKABE, Y.; KAWATE, N. Luteinizing hormone receptors in the bovine corpus luteum during the oestrous cycle and pregnacy. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, p. 147-151, 1999.

OTSUKA F, YAMAMOTO S, ERICKSON GF, SHIMASAKI S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 11387-11392, 2001.

OTSUKA F, SHIMASAKI S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein-15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 8060-8065, 2002.

PADULA, A. M. GnRH analogues—agonists and antagonists. **Animal Reproduction of Science**, v. 88, p. 115–126, 2005.

PIEBER, D.; ALLPORT, V. C.; HILLS, F.; JOHNSON, M.; BENNETT, P. R. Interactions between progesterone receptor isoformas in myometrial cells in human labour. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n. 9, p. 875-879, 2001.

PUTNEY, D. J., TORRES, C. A. A., GROSS, T. S., THATCHER, W. W. PLANT, C., DROST, M. Modulation of uterine prostaglandin biosynthesis by pregnant and nonpregnant cows at day 17 post-estrous in response to in vivo and in vitro heat stress. **Animal Reproduction Science**, v. 20, p. 31-47, 1989.

RAJAPAKSHA, W. R. A. K. J. S.; ROBERTSONB, L.; O'SHAUGHNESSY, P. J. Expression of follicle- stimulating hormone-receptor RNAm alternate transcripts in bovine granulosa cells during luteinization in vivo and in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 120, n. 1, p. 25-30, 1996.

RANDALL, D. BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia Animal: mecanismos e adaptações**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000, 729p.

RAZANDI, M.; PEDRAN, A.; GREENE, G. L.; LEVIN, E. R. Cell membrane and nuclear estrogen recptors (Ers) originate from a single transcript: studies of EαR and Erα expressed in Chinesse Hamster ovary cells. **Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 2, p. 307-319, 1999.

RAW, R. E.; SILVIA, W. J.; CURRY, T. E. effects of progesterone and estradiol on prostaglandin endoperoxide synthase in ovine endometrial tissue. **Animal Reproduction Science**, v. 40, p. 17-30, 1995.

RICHARDS, A. S. Hormonal control of gene expression in the ovary. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 6, p. 725-751, 1994.

RICO, L. W.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; WOLFENSON, D.; TERQUI, M. Plasma PGFM responses to estradiol injection in pregnant and cycling cows. **Journal of Animal Science**, v. 53, N. 1, p. 363, 1981.

ROSENFELD, C. S.; WAGNER, J. S.; ROBERTS, R. M.; LUBAHN, D. B. Intraovarian actions of oestrogen. **Reproduction**, v. 122, p. 215-36, 2001.

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

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

SALFEN, B. E.; CRESSWELL, J. R.; XU, Z. Z.; BAO, B.; GARVERICK, H. A. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of the bovine oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, p. 15-21, 1999.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Caracterização morfológica do início do desvio (divergência) folicular, em novilhas e vacas da raça Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 558-559, 2003.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382-2394, 2005.

SARTORIUS, C. A.; MELVILLE, M. Y.; HOVLAND, A. R.; TUNG, L.; TAKIMOTO, G. S.; HORWITZ, K. B. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. **Molecular Endocrinology**, v. 8, p. 1347-1360, 1994.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 53-65, 2002.

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

SCHILLO, K. K. **Reproductive Physiology of Mammals: from farm to field and beyond**. 1ª ed. Delmar, Cengage Learning, Clifton Park, NY. 2009, 462p.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2ª ed. Washington: Current Conceptions, IC, 2003, 373p.

SHELDRICK, E. L. Oxytocin delays oestradiol-induced luteolysis but does not affect oestradiol-induced luteinizing hormone secretion in the ewe. **Reproduction Fertility and Development**, v. 4, p. 593-599, 1992.

SILVIA, W. J.; LEWIS, G. S.; MCCRACKEN, J. A.; THATCHER, W. W.; WILSON, L. J. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2a secretion during luteolysis in ruminants. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 655—663, 1991.

SILVA, J. M.; PRICE, C. A. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 174, p. 499-507, 2002.

SILVESTRE, F. T.; BARTOLOME, J. A.; KAMIMURA, S.; ARTECHE, A. C.; PANCARCI, S. M.; TRIGG, T.; TATCHER, W. W. Postpartum suppression of ovarian activity with a deslorelin implant enhanced uterine involution in lacting dairy cows. **Animal Reproduction of Science**, v. 110, p. 79-95, 2009a.

SILVESTRE, F.T.; KAMIMURA, S.; ARTECHE, A.C.; BARTOLOME, J.; PANCARCI, S.M.; THATCHER, W.W. Reproductive responses following postpartum suppression of ovarian follicular development with a deslorelin implant during summer heat stress in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 11, p. 320–337, 2009b.

SLOMCZYNSKA, M.; DUDA, M.; Sl-ZAK, K. The expression of androgen receptor, cytochrome P450 aromatase and FSH receptor RNAm in the porcine ovary. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 39, n. 1, p. 562-574, 2001.

SPICER, L. J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1223-1230, 2004.

STANISLAUS, D.; PINTER, J. H.; JANOVICH, J. A. Mechanisms mediating multiple physiological responses to gonadotrofin-realising hormone. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 144, n. 1, p. 1-10, 1998.

STUMPF, T. T.; ROBERSON, M. S.; WOLFE, M. W.; HAMERNIK, D. L.; KITTOK, R. J.; KINDER, J. E. Progesterone, 17β-estradiol and opioid

neuropeptides modulate pattern of LH in circulation of the cow. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 5, p. 1096-101, 1993.

SUZUKI, T.; SASANO, H.; KIMURA, N.; TAMURA, M.; FUKAYA, T.; YAJIMA, A.; NAGURA, H. Immunohistochemical distribuition of progesterone, androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. **Human Reproduction**, v. 9, n. 9, p. 1589-1595, 1994.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006, 946p.

TAYA, K.; KANEKO, H.; TAKEDOMI, T.; KISHI, H.; WATANABE, G. Role of inhibin in the regulation of FSH secretion and folliculogenesis in cows. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 563-70, 1996.

TAYLOR, C.; RAJAMAHENDRAN, R. Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 71, p. 61-68, 1991.

THATCHER, W. W.; TERQUI, M.; THIMONIER, J.; MAULEON, P. Effects of estradiol-17β n peripheral plasma concentration of 15-keto-13, 14-dihydro PGF2α and luteolysis in cyclic cattle. **Prostaglandins**, v. 31, n. 4, p. 745-756, 1986.

TSAI, S.; WILTBANK, M. C. ProstaglandinF2α induces expression of prostaglandin G/H Synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology Reproduction**, v. 57, p. 1016-1022, 1997.

VALLEJO, A. N. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. **Immunological Reviews**, v. 205, p. 158–169, 2005.

VALLET, J. L.; LAMMING, G. E.; BATTEN, M. Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 625-634, 1990.

VAN DEN BROECK, W.; D'HAESELEER, M.; CORYN, M.; SIMOENS, P. Cell-specific distribuition of progesterone receptors in the bovine ovary. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 164-170, 2002.

VAN WEZEL, I. L.; UMAPATHYSIVAM, K.; TILLEY, W. D.; RODGERS, R. J. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine

ovarian follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 115, p. 133-140, 1995.

VASCONCELOS, J. L. M.; SANTOS, R. M.; PEREZ, G. C. Estratégias para aumentar a eficiência reprodutiva em bovinos de corte. [on line]. Botucatu: FMVZ-UNESP, 2008. Disponível em: http://www.agripoint.com.br/cursos. Acesso em: 22 jan. 2008.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W. F.; FERNANDES, C. A. C. Regressão luteal e dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida por cloprostenol em vacas da raça. Gir. **Arquivo Brasileiro Medico Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 257-262, 1999.

VILLA-GODDOY, A.; IRELAND, J. J.; WORTMAN, J. A.; AMES, N. K.; HUGHES, T. L.; FOGWELL, R. L. Effect of ovarian follicles on luteal regression in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 2, p. 519-527, 1985.

VITT, U. A.; MCGEE, E. A.; HAYASHI, M.; HSUEH, A. J. W. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. **Endocrinology**. v. 141, p. 3814-3820, 2000a.

VITT, U. A.; HAYASHI, M.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. W. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 370-377, 2000b.

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing Hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 951-957, 1995.

WALKER, D. L.; WESTON, P. G.; HIXON, J. E. Influence of estradiol and progesterone withdrawal on the secretion of and the temporal correlation between pulses of oxytocin and prostaglandin F2α in ewes. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1228-38, 1997.

WALTERS, D. L.; SCHAMS, D.; SCHALLENBERGER, E. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrous cycle in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 71, p. 479-91, 1984.

WANDJI, S. A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M. A. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled basic fibroblast growth factor and 125I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 807-813, 1992.

WATHES, D. C.; SWANN, R. W.; BIRKETT, S. D.; PORTER, G.; PICHERING, B.T. Characterization of oxytocin, vasopressin and neurophysin from the bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v. 113, p. 693-698, 1983.

WATHES, D. C.; SWANN, R. W.; PICHERING, B. T. Variations in oxytocin, vasopressin and neurophysin concentrations in the bovine ovary during the oestrous cycle and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 71, p. 551-557, 1984.

WATHES, D. C.; LAMMING, G. E. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 53-57, 1995.

WEBB, R.; GOSDEN, R. G.; TELFER, E. E.; MOOR, R. M. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. **Animal Science**, v. 68, p. 257-284, 1999.

WEBB R, NICHOLAS B, GONG JG, CAMPBELL BK, GUTIERREZ CG, GARVERICK, HA, ARMSTRONG DG. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction Supplement**, v. 61, p. 71-90, 2003.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 63-74, 2004.

WILTBANK, M. C.; GÜMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21-52, 2002.

WILTBANK, M. C.; PURSLEY, R. P.; FIRCKE, P. M.; VASCONCELOS, J.; GUENTHER, J. N.; GIBBONS, J. R.; GINTHER, O. J. Development of AI and ET programs that do not require detection of estrus using recent information on follicular growth. **In:** ANNUAL CONVENTION PORTLAND, 15, 1996, Oregon. Proceedings…Oregon: American Embryo Transfer Association, p. 23-44, 1996.

WU, M.; DUMALSKA, I.; MOROZOVA, E.; VAN DEN POL, A. N.; ALREJA, M. Gonadotropin inhibitory hormone inhibits basal forebrain vGluT2-gonadotropin-releasing hormone neurons via a direct postsynaptic mechanism. **Journal of Physiology**, v. 587, n.7, p. 1401–1411, 2009.

YOSHIDA, H.; TAKAKURA, N.; KATAOKA, H.; KUNISADA, T.; OKAMURA, H.; NISHIKAWA, S. Stepwise requirement of c-Kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. **Development and Biology**, v. 184, p. 122-37, 1997.

YUAN, W.; BAO, B.; GARVERICK, H. A.; YOUNGQUIST, R. S.; LUCY, M. C. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. **Domestic Animals of Endocrinology**, v. 15, p. 55-63, 1998.

ZHANG, J.; WESTON, P. G.; HIXON, J. E. Influence of estradiol on the secretion of oxytocin and prostaglandin F2α during luteolysis in the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 395- 403, 1991.

ZHANG, J.; WESTON, P. G.; HIXON, J. E. Role of progesterone and oestradiol in the regulation of uterine oxytocin receptors in ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 395-404, 1992.

ZIEBA, D.; BILINSKA, B.; SCHMALZ-FRACZEK, B.; MURAWSKI, M. Immunohistochemical localization of estrogen receptors in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Folia Histochemistry Cytobiology**, v. 38, n. 3, p. 111-117, 2000.

Capítulo 2

TRABALHO REDIGIDO SEGUNDO AS NORMAS DA REVISTA **REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS**, EXCETO O IDIOMA

Efeitos da administração de Deslorelina por 70 dias na forma de implante na dinâmica folicular, perfil endócrino e expressão de receptores endometriais de estrógeno, progesterona e ocitocina de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*)

Wolff Camargo Marques Filho, João Carlos Pinheiro Ferreira, Euardo Trevisol, Giovana Wingeter Di Santis, Alexandre Secorun Borges, José Paes de Oliveira Filho, Ian Martin, Miriam Harumi Tsunemi

2011

Efeito da administração de Deslorelina por 70 dias na forma de implante na dinâmica folicular, perfil endócrino e expressão de receptores endometriais de estrógeno, progesterona e ocitocina de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*)

Wolff Camargo Marques Filho[a], João Carlos Pinheiro Ferreira[a*], Euardo Trevisol[a], Giovana Wingeter Di Santis[b], Alexandre Secorun Borges[c], José Paes de Oliveira Filho[c], Ian Martin[a], Miriam Harumi Tsunemi[d].

[a] Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu-SP.wolffcmf@gmail.com, jcferreira@fmvz.unesp.br, duveio@yahoo.com.br, ianmartin@uol.com.br

[b] Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina-PR. giovanaws@uel.br

[c] Departamento de Clínica Veterinária, UNESP, Botucatu/SP. asborges@fmvz.unesp.br, zep.filho@hotmail.com

[d] Departamento de Bioestatística do Instituo de Biociência de Botucatu, UNESP, Botucatu/SP. mtsunemi@ibb.unesp.br

* Autor correspondente. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu-Brazil, Distrito de Rubião Junior s/n°, 18603-970, Botucatu/SP-Brazil. Tel/fax: +551438116249.

Resumo

Objetivo-se avaliar os efeitos da implantação subcutânea de Deslorelina (GnRHa-Suprelorlin®) por 70 dias sobre a dinâmica folicular, secreção do FSH, LH e P_4 e, expressão dos receptores endometriais de estrógeno α e β (EαR e EβR), de progesterona *isoformas* A e B (PAR e PBR) e de ocitocina (OTR) em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). Foi sincronizada a ovulação de 15 vacas Nelore com ECC $\geq$ 3 e, no D0 foram

aleatoriamente selecionados 7 animais para serem submetidos a implantação subcutânea de Deslorelina por 70 dias. O exame ultra-sonográfico foi realizadoa cada 2 a 3 dias para caracterização da dinâmica folicular e os folículos classificados de acordo com o seu diâmetro em: classe I (< 0,4 cm), II (0,4-0,6cm) e III (> 0,6cm). Amostras sanguíneas foram coletadas para mensuração das concentrações plasmáticas de FSH, LH e P_4. A pulsatilidade e os picos de LH foram determinados a partir de amostras sanguíneas coletadas a cada 15 minutos por 6 horas em 4 vacas escolhidas aleatoriamente nos D20 e 62. A mensuração da expressão proteica dos EαR, EβR, PABR e PBR no epitélio glandular e estroma endometrial foram realizadas por meio da técnica da imunoistoquímica e, a expressão gênica dos EαR, EβR, PABR e OTR foi avaliada com auxílio do qRT-PCR, ambas a partir de fragmentos coletados por meio de biópsias uterinas nos dias 0, 4, 20 e 27. Os resultados foram analisados por meio do teste não paramétrico de Friedman e Exato de Fisher. A relação dos resultados entre a dinâmica folicular e expressões gênica e proteica foi analisada pela correlação de Pearson, todos com nível de significância de 0,05. Durante o período de implantação da Deslorelina nenhum animal ovulou, o que indica que o pico pré-ovulatório de LH foi abolido. O número máximo de folículos recrutados foi de 13,7 (± 3,86). Os folículos de classe III não foram observados na maioria dos animais a partir do D48. A concentração plasmática da P_4 se manteve em nível basal (0,4 ng/mL) durante todo o período de implantação. A secreção de FSH e LH não foi abolida ao longo do estudo. A frequência de pulsos de LH observada no D20 e D62 foi, respectivamente 1 (± 0)/6 h e 1,25 (± 0,5)/6h. As concentrações plasmáticas máximas durante os pulsos foram de 1,72 (± 0,24) e 1,24 (± 0,31) ng/mL, respectivamente. De forma geral, foi observado alto perecentual de núcleos positivos dos ER e PR ao longo do estudo, bem como a alta concentração de RNAm de ER, PR e OTR. Sendo assim, se infere que o tratamento por

70 dias com implantes subcutâneos de Deslorelina suprime o recrutamento e a seleção folicular, reduz a pulsatilidade e o pico de LH, inibe a ovulação e, mantém elevada a expressão dos receptores endometriais de estrógeno, progesterona e ocitocina em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*).

Palavras-chaves: Nelore, anestro, Deslorelina, dinâmica folicular, receptor endometrial.

Introdução

No Brasil, cerca de 80% dos 199,7 milhões de bovinos são da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), que se caracteriza pela alta tolerância ao clima tropical. Devido a esta rusticidade e adaptabilidade, estes animais são criados, em sua maioria, de forma extensiva nas regiões Centro-oeste e Norte (IBGE, 2008).

Em bovinos, a produtividade está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva. Deste modo, o longo período de anestro e de restabelecimento da atividade ovariana após o parto, e o baixo índice de fertilidade no primeiro ciclo estral subsequente são alguns dos fatores que limitam a produtividade e resultam em significativas perdas econômicas (Baruselli et al., 2007).

Tratamentos por longos períodos com agonistas de GnRH, como a Deslorelina, têm sido utilizados para reduzir o intervalo entre partos de vacas de origem taurina, tratar cistos foliculares e controlar a atividade reprodutiva de várias espécies animais, em machos e fêmeas, uma vez que este tipo de agonista promove *downregulation* dos receptores de GnRH hipofisários, com consequente redução na secreção de gonadotrofinas (D'oochio et al , 1996; Mattos et al., 2001; Padula, 2005; Silvestre et al., 2009a, 2009b; Güngör et al., 2010).

Em vacas Holandesas, foi constatado que a implantação subcutânea de Deslorelina por 30 dias beneficiou o processo de involução uterina e limitou o

desenvolvimento folicular máximo até 3,2 mm de diâmetro. Nestes animais, foi observada a ovulação entre 10 e 20 dias após a remoção do implante de Deslorelina (Silvestre et al., 2009a, 2009b). Em novilhas de origem européia, o implante de Buserelina suprimiu a liberação de LH e FSH, respectivamente, 8 e 30 dias após o início do tratamento (Gong et al., 1996). No entanto, não há relatos dos efeitos deste análogo do GnRH em *Bos taurus indicus*.

Sabendo que há diferenças entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* quanto à fisiologia da reprodução e peculiaridades da dinâmica folicular (Barros et al., 2000; Buratini et al., 2000), este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da utilização de implantes subcutâneos de Deslorelina (GnRHa-Suprelorlin®) por 70 dias, sob a dinâmica folicular, secreção da P_4 e LH e, expressão gênica e proteica dos receptores endometriais de estrógeno α e β (EαR e EβR), de progesterona *isoformas* A e B (PAR e PBR) e de ocitocina (OTR) de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*).

MATERIAL e MÉTODOS

Animais e instalações

O presente estudo foi conduzido entre os meses de julho e outubro de 2009 na Fazenda Experimental da FMVZ /UNESP-Botucatu, no município de São Manuel/SP (latitude -22º43’52’’, longitude -48º34’14’’), Brasil. Foram utilizadas 15 vacas adultas não lactantes da raça Nelore clinicamente normais com escore de condição corporal (ECC) ≥ 3 (0-5, Houghton et al., 1990).

As vacas permaneceram em pastejo de *Brachiara decumbens* e foram suplementadas com ração 18% PB, minerais e água *ad libitum*.

Sincronização da ovulação

A sincronização da ovulação foi realizada por meio do protocolo (Figura 1).

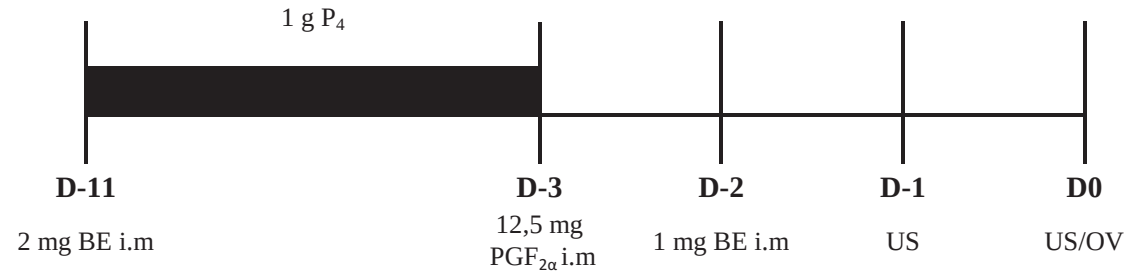


Fig 1. Protocolo de sincronização da ovulação de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). * BE (Estrogin®, Farmavet Ltda, Brasil); P_4 (DIB®, Intervet Schering-Plough, Brasil); $PGF_{2\alpha}$ (Dinoprost trometamina, Lutalyse®, Pfizer Saúde Animal, Brasil); D-1 e D0: exame ultra-sonográfico transretal a cada 12 horas para determinação da ovulação.

Implantação da Deslorelina

Foi constatada a ovulação em todos os animais no D0 e destes, 10 foram aleatoriamente selecionados para receber o implante subcutâneo não degradável de 4,7mg do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®, Peptech Animal Health, North Ride, Austrália) na face externa do pavilhão auditivo direito. Para descrição e diferenciação dos animais, cada um recebeu um código que variou de “A” a “J”.

Antes da realização do procedimento o local foi higienizado com água e sabão, seguida deposição de iodo degermante com gaze. Cinco minutos antes da implantação no local da deposição da Deslorelina, foi feito um botão anestésico pela infiltração subcutânea de 3 mL de lidocaína (Xylestesin 2%®, Cristália, Brasil) por incisão/animal.

No D8 todos os animais receberam 12,5 mg i.m dinoprost trometamina i.m (Lutalyse®, Pfizer Saúde Animal, Brasil). O implante de Deslorelina foi removido no D70 seguindo os mesmos cuidados anti-sépticos e anestésicos anteriormente descritos.

Avaliações ultra-sonográficas

A partir do dia da implantação subctunânea da Deslorelina até o D70, os ovários dos animais foram examinados, a cada 2 a 3 dias, com auxílio do aparelho ultra-sonográfico transretal (Mindray DP 3300, Mindray Biomedical Eletronics Co. Ltda, Shenzhen, China).

A cada avaliação foram identificados e determinado o diâmetro dos folículos ovarianos presentes, que de acordo com os seus diâmetros foram classificados nas seguintes classes, segundo Gimenes et al. (2008): classe I (< 0,4 cm), II (0,4-0,6 cm) e III (> 0,6 cm).

No D47, com intuito de sincronizar a emergência de onda e relacioná-la ao padrão de liberação de gonadotrofinas, todos os folículos visualizados nos ovários foram aspirados por meio de uma guia de aspiração (Cook VBOA 18 L), agulhas 18G, uma bomba à vácuo ajustada em 240 mmHg, um equipamento ultra-sonográfico Scan Vet 240 – Parus (Pie-Medical, Pie Medical Systems e Esaote Europe, Maastricht, Netherland) e um transdutor linear transretal de 5 mHz.

Dosagem hormonal

Nos mesmos dias das avaliações ultra-sonográficas, amostras sanguíneas foram coletadas por meio da venopunção dos vasos coccígeos com auxílio de agulha 21 G e sistema à vácuo em tubos heparinizados, para determinação da concentração plasmática de FSH, LH e P_4. Imediatamente após a coleta, estas amostras foram refrigeradas para posterior centrifugação a 2500G por 15 minutos e armazenamento em tubos tipo eppendorf de 1,5 mL em freezer a -20^{o}C.

De acordo com o padrão da dinâmica folicular dos animais, a mensuração da concentração plasmática de P_4 foi realizada nos D3, 4, 6, 8, 11, 19, 25, 32, 34, 48, 56, 62 e 68. A mensuração plasmática da P_4 foi realizada pela técnica de radioimunoensaio

usando Count-A-Count Kit (Diagnostics Products Corporation®, Los Angeles, CA, USA) seguindo-se as recomendações dos fabricantes em cinco ensaios em dias consecutivos com coeficiente de variação interensaio e intraensaio de 6,35% e 4,87%, respectivamente.

De acordo com o padrão da dinâmica folicular dos animais, a mensuração da concentração plasmática de FSH e LH durante o período de implantação da Deslorelina, nos dias 4, 20, 27, 37, 42 e 61 foram determinadas em todos os animais em amostras sanguíneas coletadas da mesma forma como descrito anteriomente para mensurar a concentração plasmática de P_4.

Já o padrão de pulsatilidade e os picos de LH foram determinados a partir de amostras sanguíneas coletadas a cada 15 minutos por 6 horas por meio da cateterização da jugular, nos dias 20 e 62 após a implantação da Deslorelina, em 4 animais escolhidos aleatoriamente em cada dia.

O nível sérico de FSH e LH, em todas as análises, foi mensurado pelo teste de radioimunoensaio de duplo anticorpo no laboratório de endocrinologia da UNESP-Araçatuba utilizando a técnica modificada de Bolt & Rollings (1983) e a classificação de pulsos de Fitzgerald et al. (1985).

Para o ensaio de FSH, utilizou-se o USDA-bFSH para iodinação, e primeiro anticorpo NIDDK-anti-oFSH-1 a uma diluição de 1:300.000. A sensibilidade do ensaio de FSH foi de 0,005 ng/mL e a de LH de 0,02 ng/mL. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram 4,09% e 5,06%, respectivamente. O coeficiente inter-ensaio do LH foi de 6,37%.

Biópsias endometriais

Em cada animal, quatro amostras de tecido endometrial foram coletadas semanalmente por meio de biópsias via transcervical utilizando uma pinça de biópsia

modelo Yomann (Hauptner®, Solingen, Alamenha).

Todas as pinças utilizadas no presente estudo eram lavadas diariamente em água corrente e sabão neutro, secas em estufa convencional e, posteriormente, mantidas embrulhadas em um campo cirúrgico. Antes da sua utilização, a pinça era mantida submersa em álcool 70%.

No momento da colheita procedia-se uma limpeza da região perineal e vulvar do animal com papel toalha. A pinça era introduzida pela vulva até alcançar o cérvix, que era manipulado por via transretal, a fim de permitir a intromissão da mesma no útero. O útero era então pressionado contra a mesma, por via transretal, para facilitar a obtenção de um fragmento de tamanho significativo (entre 4 e 5 mm de diâmetro).

O fragmento era retirado da pinça com auxílio de uma agulha, lavado em solução fisiológica 0,9%. Duas destas amostras foram acondicionadas em cassetes plásticos identificados com o número do animal e data da colheita para inclusão e fixação em formol tamponado 10% por 24 horas. Posteriormente, foram armazenadas em etanol 70% até a inclusão em parafina para a realização da técnica de imunoistoquímica.

As outras duas amostras foram rapidamente lavadas com a mesma solução, secas em papel toalha e, imediatamente, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80^{o}C para posterior análise da quantificação da concentração relativa do RNAm dos genes alvos (EαR, EβR, OTR e PABR) por qRT-PCR.

Imunoistoquímica

Após a inclusão das amostras de tecido endometrial em parafina, foram realizados cortes histológicos de 4 μm para confecção das lâminas utilizadas na rotina da técnica de imunoistoquímica. Algumas destas lâminas foram utilizadas para caracterização histológica do tecido endometrial coletado por meio da coloração de hematoxilina e eosina (HE) e análise em microscópio óptico Leica DML® (Leica Microsystems,

DMLB, Wetzler, Germany), com aumento de 400 e 1000X.

Outras lâminas foram utilizadas para realização da técnica da imunoistoquímica, a qual teve início com a desparafinização tecidual em cuba contendo xilol e reidratação em soluções de álcool. Posteriormente, as lâminas foram imersas em cuba contendo solução de citrato 2,1% pH 6,0 para serem submetidas ao tratamento térmico e recuperação antigênica na Pascal Modelo S2800 Dako® (Dako Cytomation California Incorporation, Carpinteria, CA, USA).

Para o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas em H_2O_2 3%, seguido da inibição das ligações com anticorpos inespecíficos utilizando solução de caseína.

O EαR (monoclonal de camundongo anti-humano receptor de estrogênio alfa clone 1D5, Dako, Carpinteria, CA, EUA), o PRAB (PGR-Ab-8 cocktail mouse MAb Neomarkers MS-298-P1, Fremont, CA, EUA) e o PRB (PR- B-30 SC-811 monoclonal IgG1, Santa Cruz Biotechonlogy, São Paulo, Campinas, Brasil) foram utilizados na diluição de 1:50. O EβR (beta receptores monoclonais, anti-humano estrogênio PPG5/10 clone 1, Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi utilizado na proporção 1:200. Todos os anticorpos primários foram incubados em câmera úmida por 18 horas a 4^{o}C.

O controle negativo foi realizado por meio de um anticorpo de camundongo (Mouse Immunoglobulin – Universal Negative Control; Dako, Carpinteria, CA, USA) incubado também por 18 horas a 4^{o}C em algumas lâminas em todas as rotinas de imunoistoquímica.

O anticorpo secundário AdvanceTM HRP® (Dako, Carpinteria, CA, USA) foi incubado por 60 minutos. As lâminas foram lavadas com solução TRIS 7,4 duas vezes por 5 minutos. A reveleção com o cromógeno DAB (3,3¢-diaminobenzidine; Liquid Dako Dab 7 Sistema de substrato cromógeno, Carpinteria, CA, EUA) foi realizada por 2

minutos.

A reação foi interrompida com 2 banhos de TRIS pH 7,4 por 5 minutos. As lâminas foram contra-coradas com HE por 3 minutos, observadas e fotografadas usando microscópio óptico Leica DML® equipado com uma câmera DC300F Leica® (Leica Microsystems, DMLB, Wetzler, Germany), nos aumentos de 400X e 1000X.

A expressão proteica do EαR, EβR, PRAB e PRB em cada lâmina foi realizada pela mesma pessoa em 10 campos escolhidos aleatoriamente. Os métodos utilizados para avaliar a imunocoloração foi o número de núcleos corados positivamente em contagem de 300 células (epitélio glandular) e outras 300 células (estroma uterino) em aumento de 1000X e, posterior, transformação em porcentagem. Para avaliar a intensidade da imunomarcação dos núcleos marcados no endométrio foi utilizado aumento de 400X e a classificação: fraca (até 25% dos núcleos fortemente marcados), moderada (entre 25% a 75% dos núcleos fortemente marcados) ou forte (acima de 75% dos núcleos fortemente marcados) (Martin et al., 2008).

Extração do RNA, confecção do cDNA e qRT-PCR

O RNA total foi extraído das amostras de tecido endometrial utilizando RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen Incoporation, Valencia, CA), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e a pureza das amostras de RNA foram determinadas por espectrofotometria (Nanodrop® 2000 Espectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e a razão A260/A280nm foi superior a 1,8 em todas as amostras avaliadas.

As amostras de RNA foram tratadas com RQ1 RNase-free DNase (Promega, Wisconsin, EUA) para eliminar possível contaminação com DNA genômico. O cDNA foi confeccionado (volume final de 40 µL) utilizando a enzima ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega®, Wisconsin, EUA) e 500 ng de RNA seguindo as

recomendações do fabricante.

Os *primers* utilizados na quantificação relativa da expressão gênica do receptor de progesterona *isoforma* AB (PABR) foram previamente descritos (Ulbrich et al., 2003), enquanto que aqueles utilizados na mensuração da expressão dos genes do EαR, do EβR e do OTR foram desenhados no programa Primer Express® v2.0 (Applied Biosystem Foster City, CA, USA) utilizando como "molde" as sequências de RNAm contidas no GenBank™ para *Bos taurus taurus* estrogen receptor *alfa* (NM_001001443.1), *Bos taurus taurus* estrogen receptor *beta* (NM_174051.3) e *Bos taurus taurus* oxytocin receptor (NM_174134.2), respectivamente.

Os primers do gene normalizador das reações de PCR em tempo real (qRT-PCR), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GaPDH), foram desenhados no programa Primer Express® v2.0 (Applied Biosystem, Califórnia, USA) utilizando como "molde" a sequência do RNAm contidas no GenBank™ para *Bos taurus taurus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NM_001034034.1).

Os primers utilizados que foram testados, *in silico*, em relação à especificidade utilizando a ferramenta BLASTn (Blast/ncbi) contra as sequências depositadas no GenBank™, as quais apresentaram 100% de identidade e foram específicos apenas para os seus respectivos alvos (Tabela 1).

TABELA 1. Sequências nucleotídicas dos primers utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Gene	Nome do primer	Sequência (5' – 3')	Produto amplificado
E*α*R	JP-EαR Forward	ACAAGCGCCAGAGAGATGAT	120 pb
	JP-EαR Reverse	CCGGGCTGTTCTTCTTAGTG	
E*β*R	JP-EβR Forward	AGAGTCCTTGGCGTGAAACCAGAT	114 pb
	JP-EβR Reverse	AACTGCTCCCACTAGCCTTCCTTT	
PABR	JP-PABR Forward	GAGAGCTCATCAAGGCAATTGG	227 pb
	JP-PABR Reverse	CACCATCCCTGCCAAGATCTTG	
OTR	JP-OXTR Forward	CTTCCTCTGCTGCTCATTCC	119 pb
	JP-OXTR Reverse	ATCTTCTCTGGCTGGAGCTG	
GaPDH	JP- GaPDH Forward	TGACCCCTTCATTGACCTTC	120 pb
	JP- GaPDH reverse	ATGGCCTTTCCATTGATGAC	

A quantificação relativa da concentração do RNAm dos genes alvos (E*α*R, E*β*R, PABR e OTR) foi realizada utilizando o método da curva padrão relativa previamente descrito (Larionov et al., 2005), utilizando o termociclador em tempo real 7500 Real-Time PCR Systems® (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e Master Mix Power Syber Green PCR® (Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

Cada reação (qRT-PCR) foi realizada em duplicata com volume final de 20 µL, que continha 0,2 µM de cada forward e reverse primer, 2 µL de cDNA template, 10 µL q-PCR máster mix e 7,2 µL água livre de nuclease. Adicionalmente, foi realizado em duplicata, em cada placa, o controle negativo (amostra sem cDNA) para cada gene para

confirmar a ausência de contaminação.

As condições de termociclagem foram: denaturação inicial a 95°C por 10 min e 40 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 60 s, em seguida foi realizada a curva de dissociação. A amplificação de produtos específicos para cada um dos genes foi confirmado pela análise da curva de dissociação ao final de cada corrida.

A expressão basal de cada gene alvo foi normalizada pelo gene GaPDH. O restabelecimento da atividade ovariana e o primeiro ciclo estral após o restabelecimento da atividade ovariana foram estudados posteriormente e, a expressão gênica de cada gene alvo no dia da segunda ovulação após a retirada do implante subcutâneo de Deslorelina recebeu o valor relativo de 1,0 e a concentração nos demais momentos foi normalizada proporcionalmente em relação a este momento.

Análise estatística

O número de folículos em cada classe, a presença de CL, a concentração plasmática de P_4 (ng/mL), a expressão gênica e proteica dos receptores endometriais, além da intensidade de imunomarcação destes receptores avaliados pela imunoistoquímica, foram considerados variáveis dependentes. A comparação das medidas entre os momentos foi realizada através do teste não paramétrico de Friedman e Exato de Fisher pelo BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007) e SPSS 17.0 (Chicago, EUA), considerando nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$).

O número de folículos observados e a taxa de crescimento folicular foram calculados por meio da média e desvio padrão. A relação dos resultados entre a dinâmica folicular e expressão gênica e proteica foi analisada pela correlação de Pearson, considerando efeito significativo para $p < 0,05$.

A concentração plasmática de LH e FSH (ng/mL) foram calculadas por meio da média e desvio padrão. A pulsatilidade de LH (ng/mL) foi analisada pela obtenção da

média e do coeficiente de variação necessários para a posterior confecção dos gráficos contendo frequência, amplitude e pulsatilidade realizada pelo software GraphPad Prism verson 4.0 2003.

RESULTADOS

Após planejamento da análise estatística do projeto, foi determinado que 10 animais eram suficientes para análise dos dados. Sendo assim, no D0 foram aleatoriamente selecionadas 10 vacas entre os 15 animais previamente submetidos à sincronização da ovulação para receber os implantes subcutâneos de Deslorelina.

Entre os animais experimentais tratados com $PGF_{2\alpha}$, um não apresentou luteólise e foi eliminado do estudo. Ao longo do estudo, um animal teve que ser sacrificado após sua queda no tronco durante a coleta seriada de sangue a cada 15 minutos por 6 horas com auxílio da cateterização da jugular para posterior determinação dos picos de LH, que resultou em paraparesia dos membros anteriores, seguida da tetraparalisia e apatia do animal. Posteriormente, outro animal foi excluído do estudo após o diagnóstico de infecção uterina em decorrência da perfuração uterina em virtude da falha no manuseio da pinça de colheta de biopsia endometrial.

Portanto, o experimento permaneceu com 7 animais até o final e não foram observadas ovulações durante os 70 dias em que os animais permaneceram com o implante subcutâneo de Deslorelina.

Em virtude do padrão de crescimento folicular e da análise da dinâmica folicular observada nos animais, após a realização da análise estatística, foi preconizada a ilustração dos dados referentes ao número de folículos nos dias 0, 6, 13, 20, 27, 34, 41, 48, 56, 62, 70 (Figura 2).

O número de folículos classe I observado nos dias 0, 6 e 13 após a implantação da Deslorelina foi menor que o constatado nos demais dias ($p<0,05$), sendo que o maior

número médio de folículos foi verificado nos dias 56, 62 e 70 (Figura 2).

Não foi constatada diferença com relação ao número médio de folículos classe II ($p>0,05$) (Figura 2).

O grande número de folículos classe III foi detectado 27 dias após a implantação da Deslorelina, que diferiu do observado nos dias 0, 6, 48, 56, 62 e 70 ($p<0,05$) (Figura 2).

Não houve correlação entre as classes foliculares e as demais varáveis do estudo ($p>0,05$).

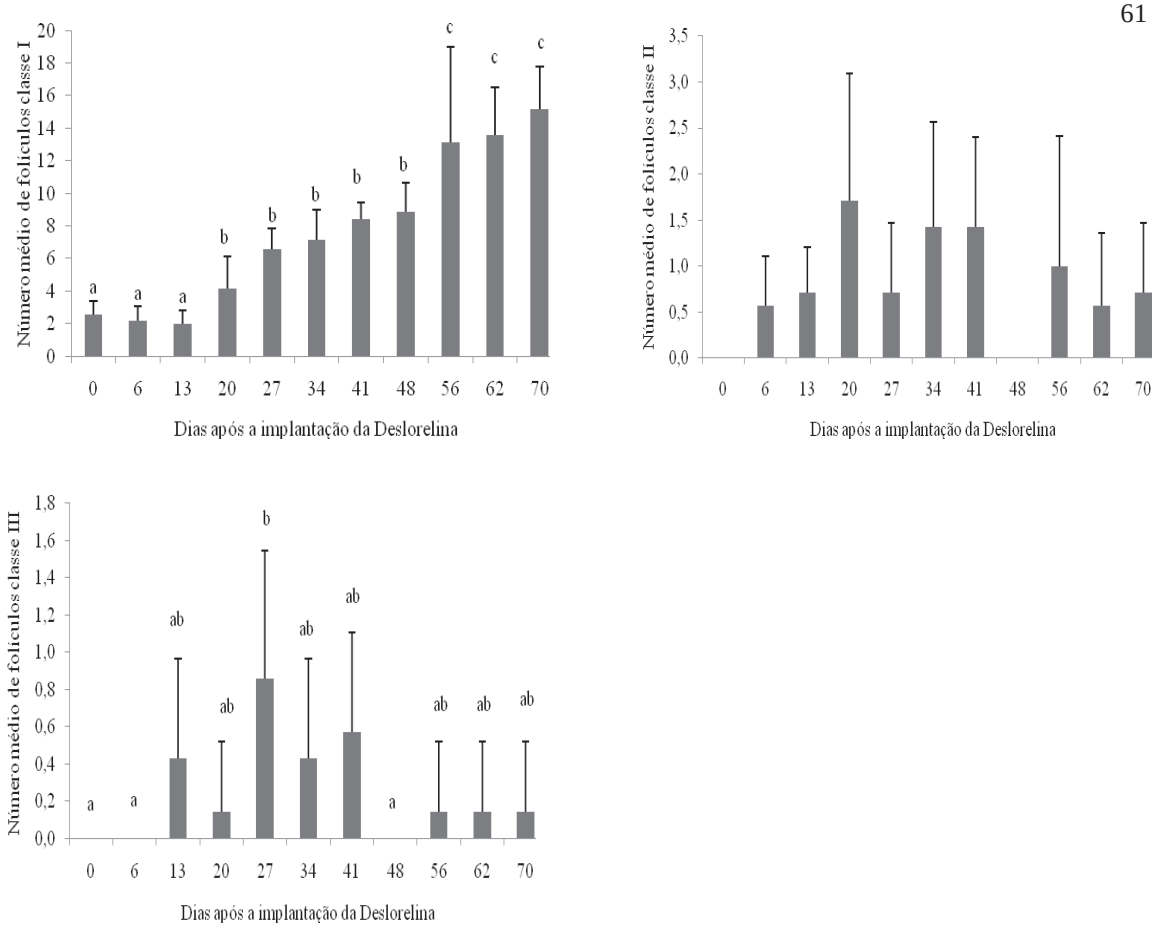


Fig 2. Número médio de folículos classe I (< 0,4 cm), II (0,4-0,6 cm) e III (> 0,6 cm) em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. Barras com letras diferem significativamente ($p<0,05$).

Durante os 70 dias de implantação da Deslorelina, a taxa de crescimento folicular média por dia foi de 0,08 (± 0,01) cm e foram constatados dois padrões de desenvolvimento folicular. Nos primeiros 35 dias, em média nos animais, o recrutamento de cada onda folicular ocorreu com intervalos de 11 (± 5) dias, e o maior diâmetro folicular verificado apresentava entre 1,1 a 1,4 cm.

Este padrão de desenvolvimento folicular médio observado durante os primeiros 35 dias de implantação subcutânea da Deslorelina pode ser pela dinâmica folicular da vaca “A” (Figura 3).

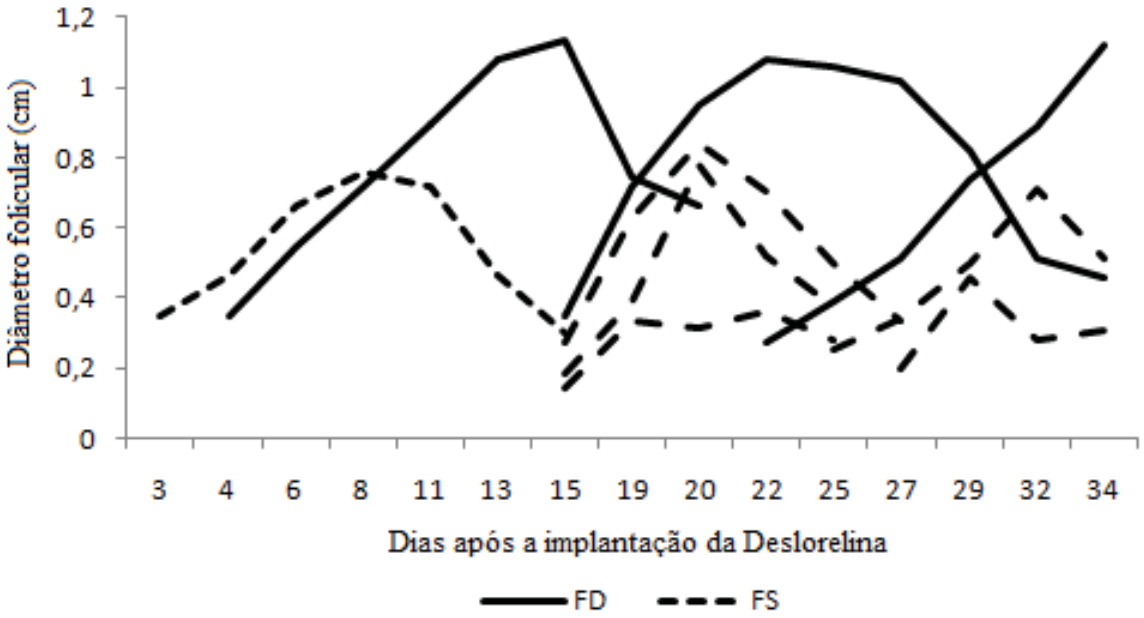
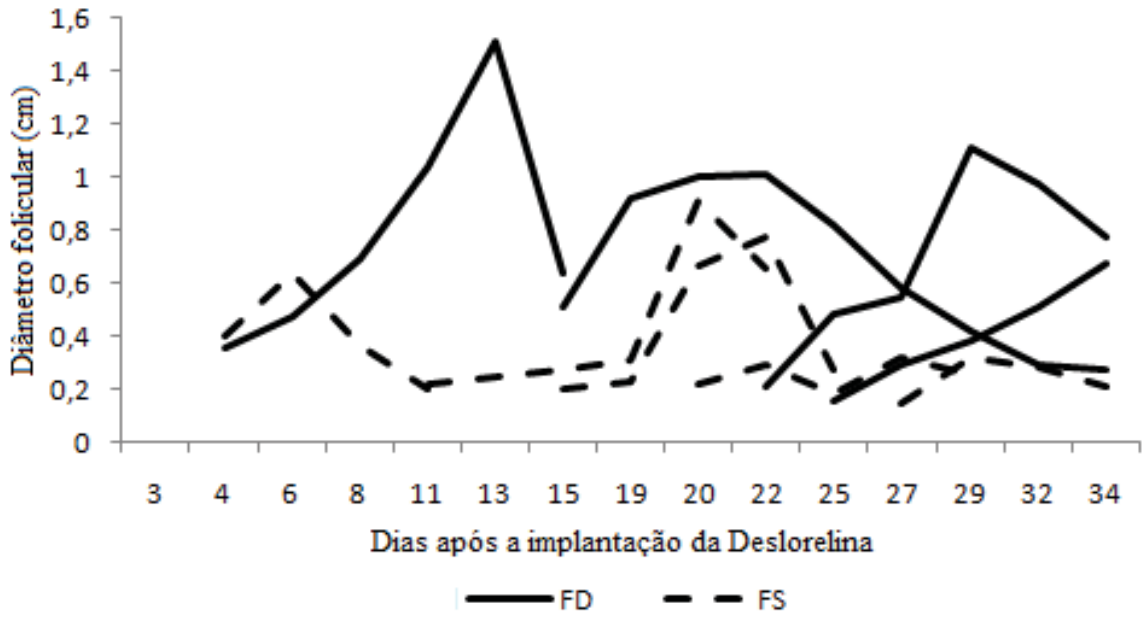


Fig 3. Dinâmica folicular da vaca A durante os primeiros 35 dias durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. Folículos dominantes (FD) e folículos subordinados (FS).

O número médio de folículos recrutados por onda de crescimento folicular durante os primeiros 35 dias de implantação da Deslorelina foi de 8,12 (± 2,15).

Três animais apresentaram padrão de crescimento folicular similar durante os primeiros 35 dias do período de implantação da Deslorelina, sendo que os maiores folículos atingiram diâmetro máximo entre 1,5 e 1,6 cm (Figura 4). Dois animais apresentaram dinâmica folicular constituída por folículos de no máximo 0,8 a 1,0 cm de diâmetro.



371 **Fig 4.** Dinâmica folicular da vaca I durante os primeiros 35 dias durante o período de implantação
372 subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. Folículos dominantes (FD) e
373 folículos subordinados (FS).

374 Durante os últimos 20 dias de implantação subcutânea do GnRHa, houve
375 crescimento folicular com intervalo médio de 10 (± 4) dias, sendo que a emergência
376 média de folículos por onda foi de 13,7 (± 3,86).

377 Um dos animais apresentou diâmetro folicular máximo inferior a 0,6 cm,
378 enquanto que em outros dois animais, foram detectados folículos com até 0,6 e 0,9 cm.
379 O padrão de desenvolvimento folicular médio representativo dos animais experimentais
380 foi mais uma vez o da vaca “A” (Figura 5).

381 Esta modificação na dinâmica folicular durante os últimos 20 dias do estudo
382 comparada aos primeiros 35 dias ocorreu em 5/7 (71,42%) animais.

383

384

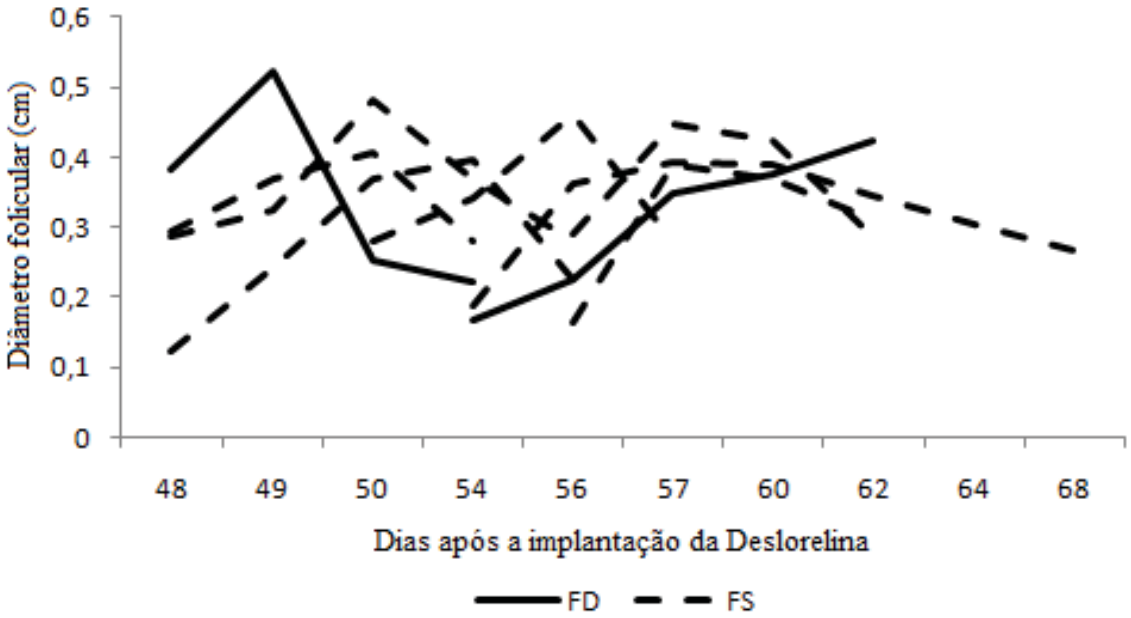


Fig 5. Dinâmica folicular da vaca A durante os últimos 20 dias durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. Folículos dominantes (FD) e folículos subordinados (FS).

Durante a análise da dinâmica folicular ao longo do período de implantação da Deslorelina, foi observado em três (3/7) animais a presença de folículos anovulatórios persistentes maiores que 1 cm por aproximadamente 18 (± 1) dias, simultâneos ao recrutamento e seleção do outros folículos.

Para verificar o efeito da presença destes folículos anovulatórios persistentes associado ao objetivo de sincronizar a emergência de uma nova onda folicular e relacioná-la ao padrão de liberação de gonadotrofinas justificou a realização da aspiração folicular. Devido a disponibilidade do técnico e do aparelho de ultra-sonografia necessário para o procedimento, esta foi realizada no D47.

Nos dias 3, 4, 6 e 8, o nível sérico de P_4 foi maior que o constatado nos demais dias, nos quais se manteve abaixo de 0,4 ng/mL ($p<0,05$) (Tabela 2).

Não houve correlação entre a concentração plasmática de P_4 e as demais varáveis do estudo ($p>0,05$).

TABELA 2. Concentração plasmática de P_4 (média ± desvio padrão) (ng/mL) de vacas Nelore (*Bos tuaurs indicus*) durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina - Suprelorin®) por 70 dias. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes.

Dias após a implantação da Deslorelina	Média ± desvio padrão (ng/mL)
D3	1,24 ± 0,05[a]
D4	1,88 ± 1,08[a]
D6	2,43 ± 1,45[a]
D8	3,56 ± 3,76[a]
D11	0,56 ± 0,40[b]
D19	0,39 ± 0,23[b]
D25	0,23 ± 0,08[b]
D32	0,21 ± 0,09[b]
D34	0,07 ± 0,05[b]
D48	0,06 ± 0,05[b]
D56	0,25 ± 0,31[b]
D62	0,36 ± 0,21[b]
D68	0,03 ± 0,01[b]

Não houve variação quanto a concentração plasmática de LH, mensurada nos dias 4, 20, 27, 37, 42, 61 ($p>0,05$), ao longo do período de implantação da Deslorelina, cujo valor médio foi de 1,22 (± 0,11) ng/mL (Figura 6).

Não houve correlação entre a concentração plasmática de LH e as demais varáveis do estudo ($p>0,05$).

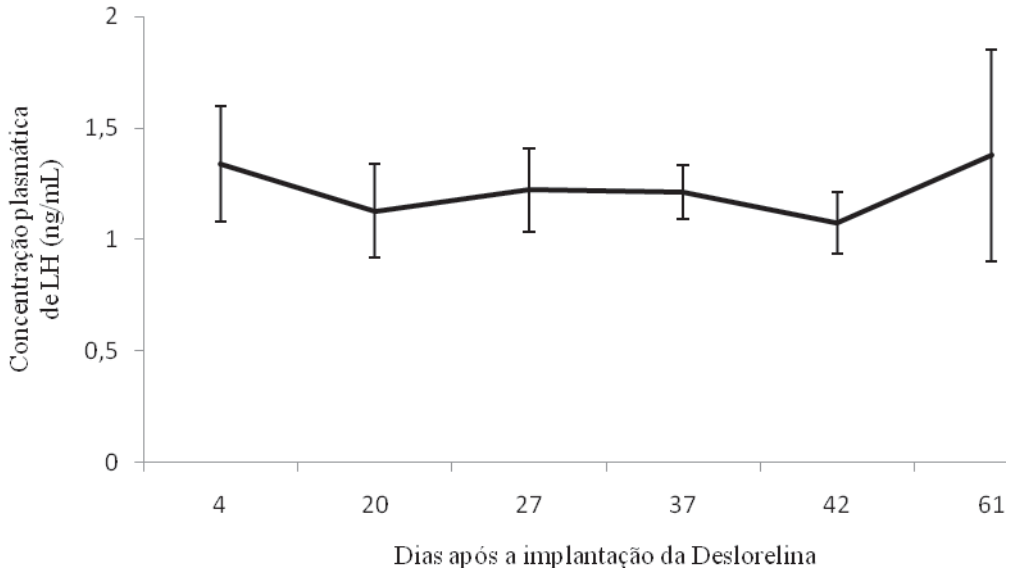


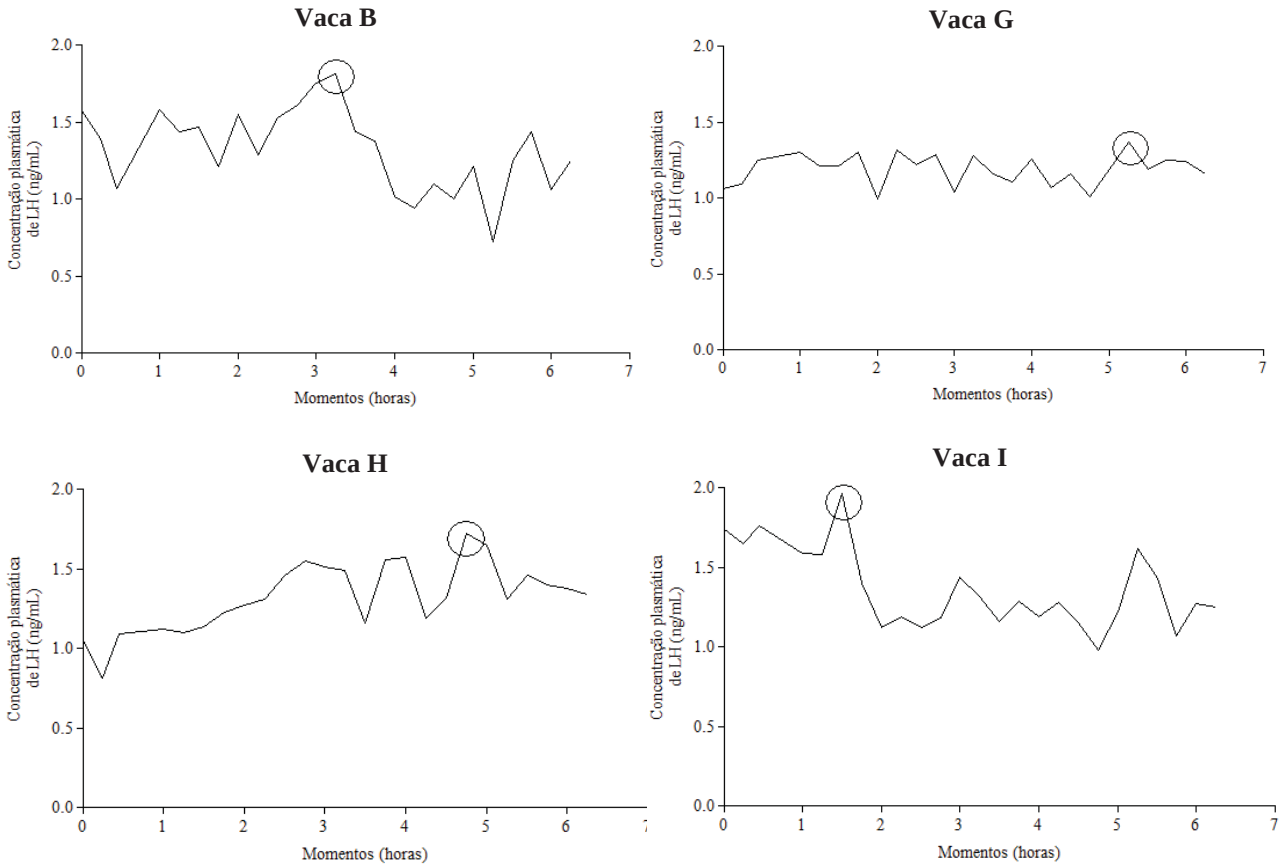
Fig 6. Média e desvio padrão da concentração plasmática de LH (ng/mL) em vacas Nelore (n=7) nos D4, 20, 27, 37, 42 e 61 durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias.

Em virtude da modificação do padrão da dinâmica folicular dos animais nos primeiros 35 dias do período de implantação subcutânea da Deslorelina comparada aos últimos 20 dias, a pulsatilidade e os picos de LH foram determinados nos dias 20 e 62.

Foram escolhidos aleatoriamente 4 dos 7 animais do estudo para posterior cateterização da veia jugular nos D20 e 62 devido ao tempo necessário para coletar as amostras sanguíneas, manutenção do cateter em todos animais e o intervalo de 15 minutos entre as coletas, as limitações de manejo dos animais, o tipo e tamanho da estrutura física e, ao comportamento indócil dos animais.

A frequência de pulsos de LH observada no D20 e D62 foi, respectivamente 1 (± 0)/6 h e 1,25 (± 0,5)/6h. Os valores máximos durante os pulsos foram de 1,72 (± 0,24) e 1,24 (± 0,31) ng/mL, respectivamente.

O padrão de pulsatilidade da concentração plasmática de LH a partir das amostras coletadas a cada 15 minutos por 6 horas com auxílio da cateterização da veia jugular no



D20 das vacas B, G, H e I estão ilustrados na figura 7.

Fig 7. Concentração plasmática de LH (ng/mL) mensurada a cada quinze minutos por seis horas das vacas B, G, H e I no D20 durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. Cada círculo representa um pico de LH.

Já a concentração plasmática do padrão de pulsatilidade do LH no D62 durante o período de implantação da Deslorelina por 70 dias das vacas A, B, C e I estão representados na figura 8.

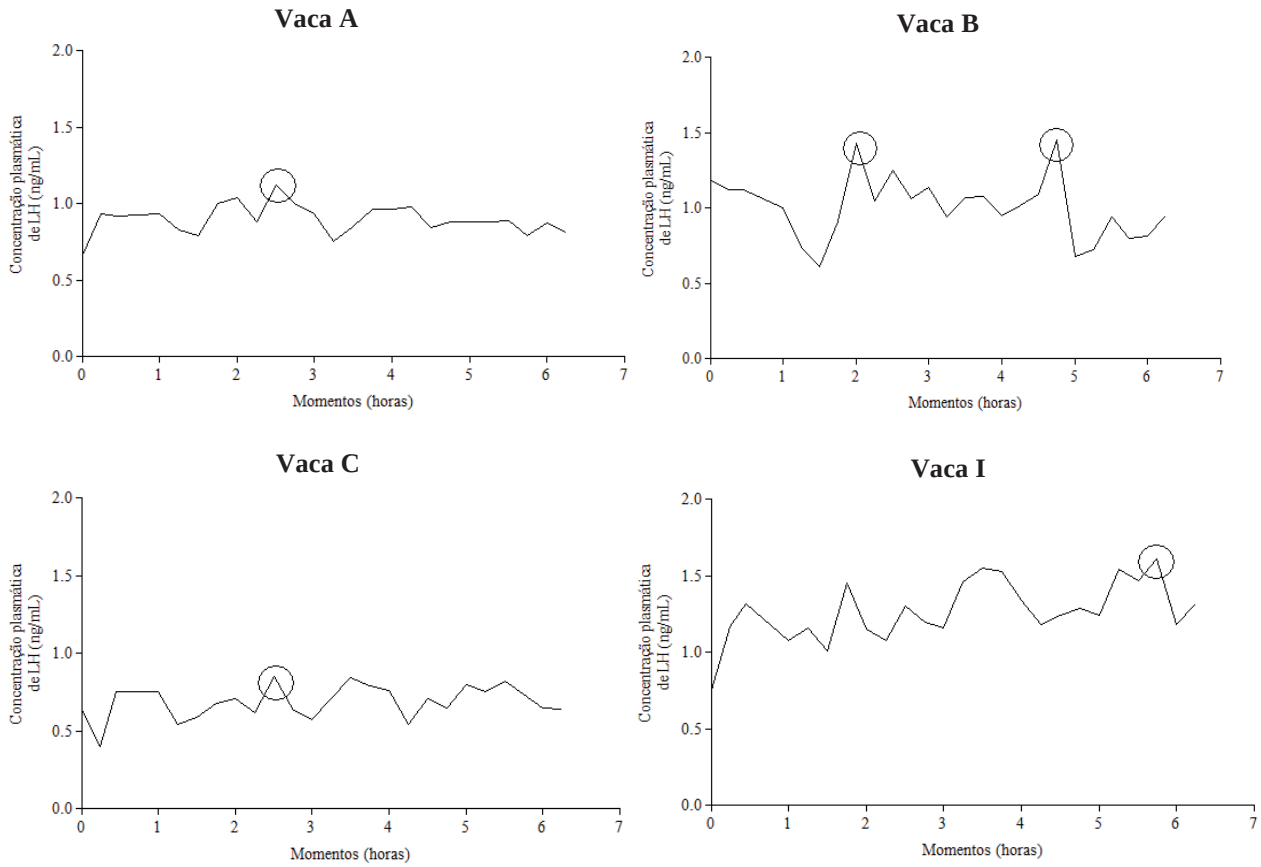


Fig 8. Concentração plasmática de LH (ng/mL) mensurada a cada quinze minutos por seis horas das vacas A, B, C e I no D62 durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. Cada círculo representa um pico de LH.

Não houve variação da concentração plasmática de FSH, mensurada nos dias 4, 20, 27, 37, 42, 61 ($p>0,05$), ao longo do período de implantação da Deslorelina, cujo valor médio foi de 1,58 (± 0,04) ng/mL (Figura 9).

Não houve correlação entre a concentração plasmática de FSH e as demais varáveis do estudo ($p>0,05$).

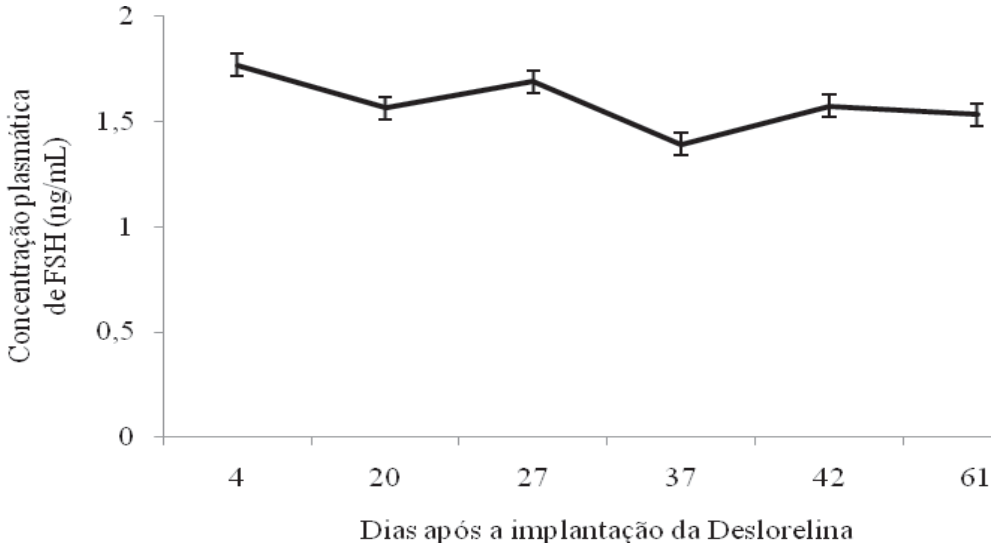


Fig 9. Média e desvio padrão da concentração plasmática de FSH (ng/mL) em vacas Nelore (n=7) nos D4, 20, 27, 37, 42 e 61 durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias.

Em virtude da semelhança da dinâmica folicular nos animais e do perfil endócrino observado durante os 35 primeiros dias do período de implantação da Deslorelina; e devido a ausência de tecido endometrial e/ou quantidade de células do estroma e epitélio glandular coletados necessários para realização das técnicas de imunoistoquímica e qRT-PCR, foram mensuradas a expressão gênica e proteica dos receptores endometriais nos dias 0, 4, 20 e 27.

A porcentagem de núcleos positivos dos EαR no estroma uterino foi maior no D27, que não diferiu do constatado no D0 e D20 durante o período de implantação da Deslorelina por 70 dias, mas foi superior que o verificado no D4. No entanto, os resultados obtidos nos D0, D4 e D20 não diferiram entre si ($p>0,05$) (Figura 10).

Diferentemente do observado no estroma uterino, o percentual médio de imunomarcação dos EαR no epitélio glandular endometrial não diferiu ao longo do período de implantação da Deslorelina ($p>0,05$) (Figura 10).

O percentual médio de imunomarcação dos EβR no estroma uterino não diferiu após a implantação da Deslorelina (Figura 10). Do mesmo modo, não houve diferença

quanto ao percentual médio de imunomarcação dos EβR no epitélio glandular uterino nos dias 0, 4, 20 e 27 durante o período de implantação de Deslorelina (Figura 10).

Não houve correlação entre o percentual de núcleos positivos dos ER no estroma uterino e no epitélio glandular e, as demais varáveis do estudo ($p>0,05$).

Com relação à expressão proteica dos PABR e PBR no estroma uterino, foi constatado que no D27 a porcentagem média de imunomarcação destes receptores foi inferior ao observado nos dias 0, 4 e 20 durante o período de implantação da Deslorelina por 70 dias ($p<0,05$). Vale ressaltar ainda que os resultados obtidos nos D0, D4 e D20 não diferiram entre si (Figuras 10).

A porcentagem média de imunomarcação dos PABR no epitélio glandular endometrial no D0 foi menor que nos demais dias ($p>0,05$) e diferente do verficado no D4 ($p<0,05$). No entanto, não foi constatada diferença entre os dias 4, 20 e 27 durante o período de implantação de Deslorelina. Além disso, é importante salientar que o perfil de expressão proteica destes receptores no epitélio glandular ao longo do período de implantação da Deslorelina diferiu do observado no estroma uterino ($p<0,05$) (Figura 10).

Com relação ao perfil de expressão proteica dos PBR no epitélio glandular endometrial, constata-se que o percentual médio de imunomarcação destes receptores no D27 foi menor que o verificado nos demais dias ($p>0,05$), no entanto, diferiu apenas do D4, em que se obteve maior percentual ($p<0,05$) (Figura 10).

Não houve correlação entre o percentual de núcleos positivos dos PR no estroma uterino e no epitélio glandular e, as demais varáveis do estudo ($p>0,05$).

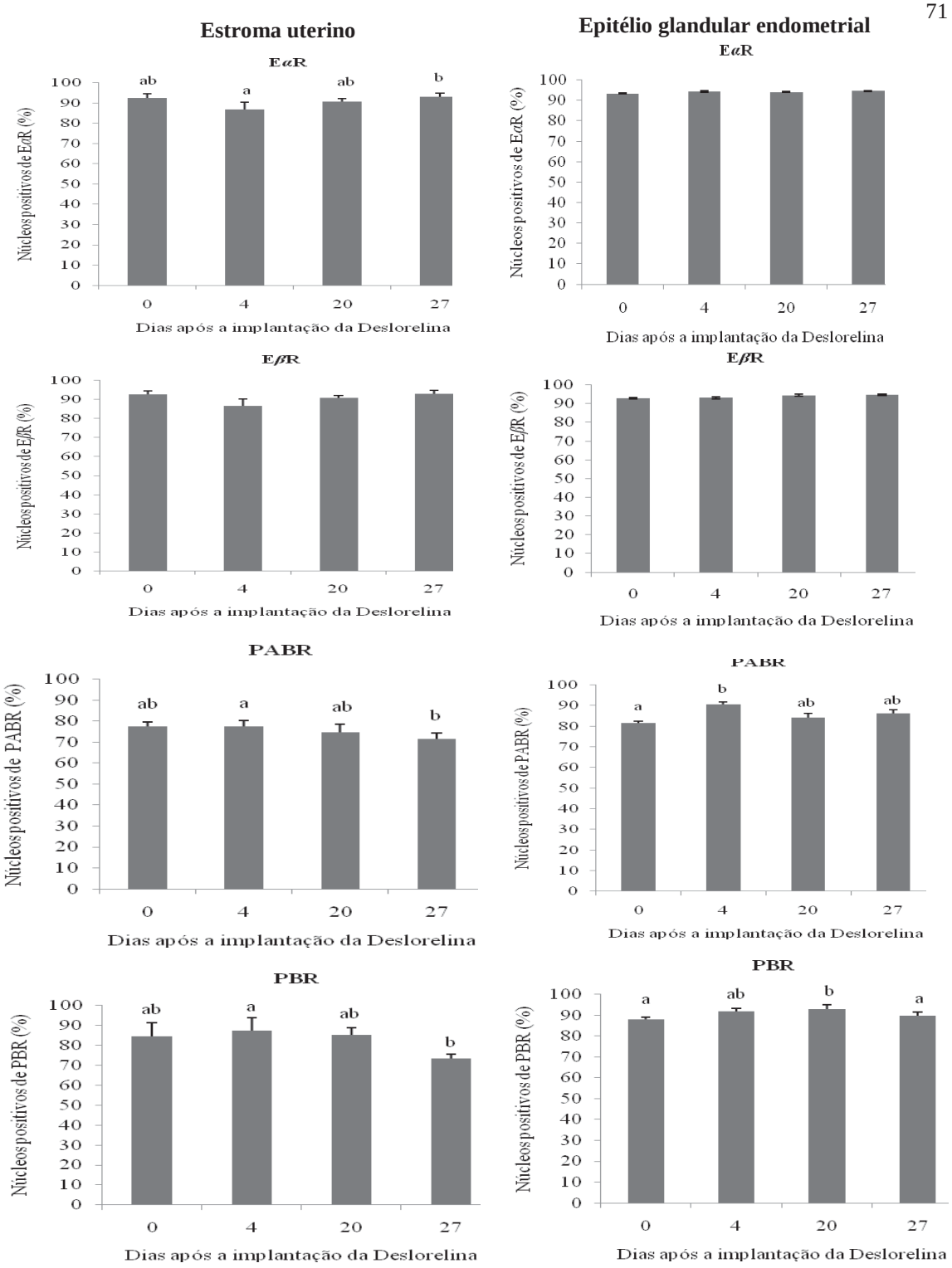


Fig 10. Porcentagem de núcleos positivos do receptor de estrógeno *alfa* (E*α*R) no estroma uterino e no epitélio glandular endometrial, de estrógeno *beta* (E*β*R) no estroma uterino e no epitélio glandular endometrial, de progesterona *isoforma* AB (PABR) no estroma uterino e no epitélio glandular endometrial e de progesterona *isoforma* B (PBR) no estroma uterino e no epitélio glandular endometrial de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) nos dias 0, 4, 20 e 27 durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. Barras com letras diferem significativamente ($p<0,05$).

As lâminas de imunoistoquímica classificadas de acordo com a intensidade de imunomarcação durante o período de implantação da Deslorelina por 70 dias apresentaram somente classificação de intensidade moderada e forte para todos os receptores avaliados ao longo do estudo.

O percentual de amostras de acordo com a classificação da intensidade de imunomarcação dos E*α*R, E*β*R, PABR e PBR no endométrio de vacas Nelore tratadas com Deslorelina não diferiram ao longo do estudo (p>0,05) (Figura 11).

Não houve correlação entre a intensidade de imunomarcação classificada como fraca, moderada e forte e, as demais varáveis do estudo (p>0,05).

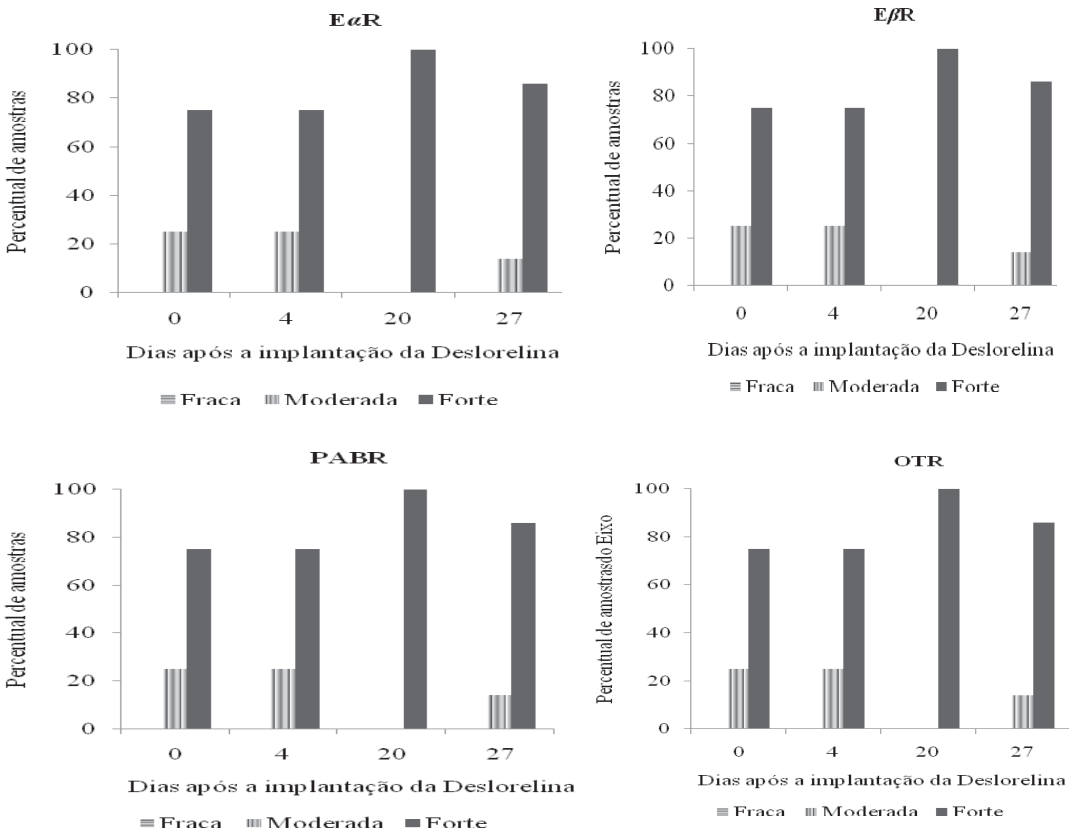


Fig 11. Percentual de intensidade de imunomarcação fraca, moderada e forte dos receptores endometriais de estrógeno *alfa* (E*α*R) e *beta* (E*β*R), de progesterona *isoformas* AB (PABR) e B (PBR) de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias.

Houve aumento da concentração de RNAm do EαR no D0, sem contudo, que fosse observada diferença quanto à expressão relativa média do RNAm (X fold) do EαR no endométrico de vacas Nelore ($p>0,05$), quantificada nos D0, 4, 20 e 27 durante o período de implantação da Deslorelina por 70 dias (Figura 12).

Do mesmo modo, não foi detectada diferença quanto à expressão relativa média do RNAm (X fold) do EβR nos dias 0, 4, 20 e 27 durante o período de implantação da Deslorelina por 70 dias ($p>0,05$) (Figura 12).

Não houve correlação entre a concentração de RNAm dos ER e as demais varáveis do estudo ($p>0,05$).

Também não foi constatada diferença com relação à expressão relativa média do RNAm (X fold) do PABR nos dias 0, 4, 20 e 27 durante o período de implantação de Deslorelina por 70 dias ($p>0,05$) (Figura 12).

Não houve correlação entre a concentração de RNAm dos PR e as demais varáveis do estudo ($p>0,05$).

A maior expressão gênica dos OTR foi observada no D20 ($p>0,05$) e, assim como verificado para os receptores de estrógeno e progesterona, não houve diferença quanto à expressão relativa média do RNAm (X fold) do OTR nos dias 0, 4, 20 e 27 durante o período de implantação de Deslorelina por 70 dias (Figura 12).

Não houve correlação entre a concentração de RNAm dos OTR e as demais varáveis do estudo ($p>0,05$).

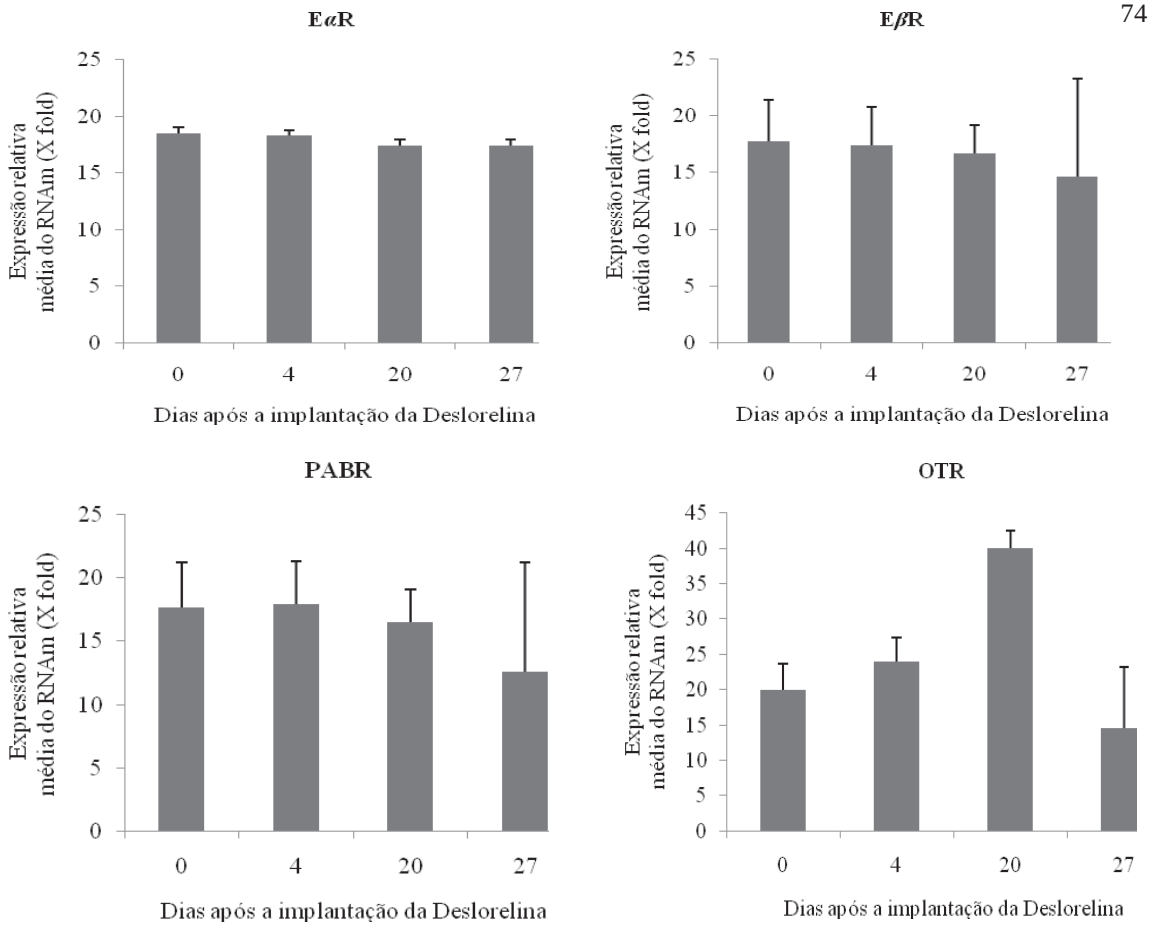


Fig 12. Expressão relativa média do RNAm (X fold) dos receptores endometriais de estrógeno *alfa* (EαR) e *beta* (EβR), de progesterona *isoforma* AB (PABR) e de ocitocina (OTR) de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o período de implantação subcutânea do agonista de GnRH (Deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias.

Discussão

Assim como relatado por Meneghetti et al. (2005), em vacas Nelore, o protocolo de sincronização da ovulação empregado no presente estudo foi eficiente uma vez que todos os animais estavam ovulados no D0.

Do mesmo modo, durante o período em que os animais permaneceram com o implante subcutâneo da Deslorelina nenhum deles ovulou durante os 70 dias de implantação, provavelmente devido a inibição do pico pré-ovulatório de LH, conforme observado por D'Occchio et al. (2000) em vacas de origem taurina.

A presença de folículos das classes I e II, ao longo dos 70 dias de implantação com Deslorelina, indica que os animais apresentaram dinâmica de crescimento folicular

composta pelas fases de recrutamento e seleção folicular, caracterizada por folículos de 0,2 a 0,5 cm, conforme elucidaram Sartorelli et al. (2005) e Gimenes et al. (2008, 2009) com o estudo acerca da dinâmica folicular em Nelore.

Já a presença de folículos classe III até a metade do período de implantação da Deslorelina indica que houve o fenômeno de divergência folicular e os folículos atingiram diâmetros compatíveis com o tamanho pré-ovulatório considerado para animais zebuínos, quando são dependentes de LH (Sartorelli et al., 2005).

A alteração no padrão da dinâmica folicular na maioria dos animais durante os últimos 20 dias comparada aos primeiros 35 dias do estudo, sem que fosse determinada diferença na concentração plasmática de FSH e LH ao longo do estudo, sugere há uma possível relação entre o tempo de implantação da Deslorelina e o padrão de desenvolvimento folicular em consequencia da diminuição do padrão de liberação de gonadotrofinas após 35 dias do período de implantação subcutânea do GnRHa.

O número médio de folículos recrutados por onda de crescimento folicular nos dois padrões diferentes de dinâmica folicular observados nos primeiros 35 dias e nos últimos 20 dias do estudo, com média aproximada de 8 e 14 folículos por onda, respectivamente, foram menores que o relatado pela literatura em animais taurinos (30 a 60 folículos - Ginther et al., 1996; Carvalho et al, 2008; Sartori et al., 2010) e zebuínos (15 a 33 folículos - Buratini et al., 2000; Bastos et al., 2010; Sartori et al., 2010), durante o ciclo estral normal, e em taurinos no pós-parto (20 folículos - Flores et al., 2008), sugerindo que a implantação subcutânea da Deslorelina inibiu a liberação de FSH em vacas Nelore.

O menor número de folículos classe I após a implantação da Deslorelina contrapõe o que foi relatado por Ireland et al. (2007) e Mossa et al. (2010) que, em seus estudos durante o ciclo estral normal de vacas taurinas, não observaram diferença entre

637 a quantidade de folículos recrutados por onda folicular e a concentração plasmática de
638 gonadotrofinas.

639 O intervalo médio entre a emergência de ondas de crescimento folicular (± 10
640 dias) corrobora com o observado por Figueiredo et al. (1997) e Sartori et al. (2004)
641 durante o ciclo estral normal em animais Zebu, e no pós-parto de vacas taurinas (Yavas
642 et al., 1999; Flores et al., 2008) e zebuínos (Rubio et al., 2010).

643 Vale ressaltar ainda que a taxa de crescimento folicular diário ao longo dos 70
644 dias em que as vacas Nelore permaneceram com o implante de Deslorelina foi
645 semelhante ao constatado por Mantovani et al. (2010) ao analisar protocolos de
646 sincronização para IATF em animais meio sangue zebuínos e, por Figueiredo et al.
647 (1996) e Borges et al. (2003) em vacas Nelore, no entanto foi menor que a citada em
648 novilhas Nelore tratadas com BST (Buratini et al., 2000).

649 A avaliação da dinâmica de crescimento folicular em vacas Nelore tratadas com
650 Deslorelina durante os primeiros 35 dias do período de implantação sugere que a
651 liberação de FSH e LH, foram suficientes para ocorrer a emergência, seleção e
652 divergência dos folículos. Este padrão foi semelhante ao observado por Martin et al.
653 (2008) em vacas Nelore durante o ciclo estral normal e, em vacas taurinas gestantes
654 (Ginther et al., 1989b, 1989c; Bó et al., 1995; Okamura & Ohkura, 2007).

655 Já nos últimos 20 dias do período de implantação, o modelo de desenvolvimento
656 folicular dos animais sugere que houve supressão do padrão de liberação pulsátil de LH
657 necessário ao desenvolvimento do folículo dominante, bem como o pico pré-ovulatório
658 de LH, essencial para a ovulação (Cupp et al., 1995; Ambrose et al., 2005), visto que os
659 folículos ultrapassavam o tamanho de desvio caracterizado por Castilho et al. (2007) e
660 Gimenes et al. (2008), durante a fase da divergência folicular em Nelore (0,6 cm), mas
661 não atingiam o tamanho pré-ovulatório e ovulavam.

Os agonistas de GnRH tem maior afinidade à receptores hipofisários específicos que o GnRH endógeno e, sua utilização prolongada culmina com efeitos agudos e crônicos sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, resultando em *downregulation* destes receptores e, a consequente alteração no perfil de secreção das gonadotrofinas (D'Occhio et al., 2000). No entanto, o aumento na concentração plasmática de LH imediatamente após a implantação da Deslorelina que caracteriza o efeito agudo ocasionado pelo tratamento com GnRHa, não foi constatado em nosso estudo conforme descrito em animais taurinos por Gong et al. (1996).

Já o efeito crônico da implantação subcutânea da Deslorleina se caracteriza pela ausência do pico pré-ovulatório de LH. No entanto, em vacas Nelore submetidas ao tratamento por 70 dias com GnRHa não foi constatado o bloqueio total da secreção de LH, como observado por D'Occhio & Aspeden (1996) em vacas de origem taurina.

A ausência de ovulações indica, no entanto, que o pico pré-ovulatório de LH, que é estimulado pelo pico de E_2 e é imprescindível para que ocorra a ovulação (Fortune et al., 2001; Ginther et al., 2001; Okamura & Ohkura, 2007), foi abolido durante todo o período em que os animais permaneceram com o implante subcutâneo de Deslorelina.

Apesar disto, o padrão de pulsatilidade do LH se manteve, uma vez que, ao longo de todo estudo, foi constatado o contínuo crescimento folicular após estabelecimento da divergência. Estes resultados diferem, contudo, do observado por Gong et al. (1995, 1996) em novilhas Holandesas tratadas com a buserelina por 30 dias, nas quais o pico e a pulsatilidade de LH foram abolidos, e sua concentração plasmática permaneceu em níveis basais.

A concentração plasmática média de LH liberado de forma pulsátil em vacas Nelore ao longo do período de implantação da Deslorelina, indica que o tratamento por 70 dias com GnRHa deprimiu a secreção pulsátil de LH, comparado ao padrão em vacas

Nelore durante o protocolo de sincronização da ovulação (Monteiro et al., 2009). Esta concentração foi maior que a relatada em vacas e novilhas Nelore submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação por (Ferraz, 2007) e durante o diestro em vacas taurinas de corte (Cupp et al., 1995), no entanto foram menores que as relatadas em novilhas Holandesas durante o protocolo de sincronização do estro (Ambrose et al., 2005).

Durante a fase do diestro do ciclo estral de vacas Holandesas, os pulsos de LH ocasionam aumento das concentrações plasmáticas de P_4 (Cupp et al., 1995; Ginther et al., 2011a). Do mesmo modo, Humphrey et al. (1983) durante o pós-parto de vacas taurinas e Ginther et al. (2011b) em novilhas Holandesas após o início do processo da luteólise observaram que a baixa pulsatilidade e a frequencia de LH foi acompanhada por baixa concentração plasmática de P_4 em novilhas holandesas tratadas com 3 μg/Kg de antagonistas de GnRH (Aciline) no D15 do ciclo, bem como foi observado em vacas Nelore tratadas com implantes subcutâneos de Deslorelina durante 70 dias.

Entretanto, a dosagem da concentração plasmática de LH a cada 15 minutos por 6 horas em vacas Nelore não evidenciou diferença no padrão de liberação quanto a frequência e amplitude quando comparados os D20 e D62 após a implantação da Deslorelina. A concentração e o número de picos constatados no intervalo de 6 horas foram menores que os relatados em vacas e novilhas Nelore durante o protocolo de sincronização da ovulação por Maio et al. (2006) e Ferraz (2007).

Com relação ao FSH, não foi observado a elevada concentração plasmática de FSH imediatamente após a Deslorelina, o que caracteriza o efeito da fase aguda do tratamento com implantes subcutâneos de GnRHa e foi observado após o parto em vacas de origem taurina (Wiltbank et al., 2002; Bó et al., 2003).

O padrão de crescimento folicular e a presença de folículos maiores que 0,4 cm

712 indicam que a secreção deste hormônio não foi abolida em vacas Nelore durante o
713 período de implantação subcutânea de Deslorelina por 70 dias, sendo que a
714 concentração plasmática permaneceu entre 1 e 1,5 ng/mL ao longo de todo estudo, ao
715 contrário do que foi relatado em novilhas Holandesas submetidas ao tratamento
716 subcutâneo com Buserelina durante 30 dias, nas quais a secreção de FSH foi inibida
717 após 30 dias de implantação e apresentaram somente folículos entre 2 e 5 mm de
718 diâmetro (Gong et al., 1995, 1996).

719 Este resultado indica que a administração por 30 dias de GnRHa deprime a
720 liberação de FSH pela hipófise, posteriormente relatada também por D'occhio et al.,
721 (2000) e Mattos et al. (2001).

722 No entanto, este efeito crônico da implantação subcutânea do GnRHa não foi
723 comprovado durante as avaliações da dinâmica ovariana em Nelore tratadas durante 70
724 dias com implantes subcutâneos de Deslorelina, visto que os folículos emergiram e
725 ultrapassaram o diâmetro de desvio folicular até o tamanho pré-ovulatório, diferente da
726 dinâmica composta exclusivamente composta de pequenos folículos a partir do D27 em
727 vacas Holandesas durante o pós-parto tratadas com implantes de Deslorelina por 30 dias
728 (Silvestre et al., 2009a, 2009b).

729 Isto pode ser justificado, sabendo que a liberação de FSH relaciona-se com a fase
730 da emergência folicular até o fenômeno do desvio, quando o folículo dominante produz
731 grandes quantidades de E_2 e inibina, responsáveis pela inibição da secreção de FSH pela
732 hipófise. Momento em que a concentração de FSH passa a ser basal, quantidade
733 insuficiente para o desenvolvimento dos folículos subordinados, porém ainda necessário
734 ao crescimento gradativo do folículo dominante (Ginther, 2000).

735 As concentrações palsmáticas de FSH em vacas Nelore durante a implantação
736 subcutânea da Deslorelina por 70 dias foi menor que a relatada anteriormente por

Ginther et al. (1996b) durante o período de gestação e após o parto de vacas Holandesas. Bem como durante o diestro de novilhas Holandesas antes e após a caracterização do desvio folicular (Ginther et al., 1996a; Ginther, 2000). Entretanto, foi maior que a concentração plasmática média de FSH (0,42 ng/mL) de novilhas Nelore antes e após o fenômeno da divergência folicular durante o protocolo de sincronização do estro (Gimenes et al., 2008).

Ao longo de todo período de implantação da Deslorelina, a concentração plasmática de FSH foi maior que a observada durante o crescimento folicular ao longo do ciclo estral de novilhas Nelore tratadas com BST (Buratini et al., 2000) e que em novilhas Nelore ao longo da primeira onda de crescimento folicular.

Durante as avaliações ultra-sonográficas, foi constatada a persistência de folículos com diâmetro superior a 1,4 cm, que não ovularam devido a abolição do pico pré-ovulatório de LH ocasionado pela administração subcutânea da Deslorelina por 70 dias, mas que não entraram em atresia. Estruturas semelhantes foram relatadas anteriormente, são chamadas de folículos anovulatórios persistentes, que se caracterizam pelo diâmetro considerado pré-ovulatório, que não ovulam e podem ou não interferir sobre o desenvolvimento dos demais folículos (Wiltbank et al., 2002).

Em nosso estudo, estruturas semelhantes foram observadas, as quais não influenciaram a secreção de FSH e, consequentemente, o desenvolvimento de novas ondas foliculares durante todo o período em que as vacas Nelore permaneceram com o implante subcutâneo de Deslorelina, indicando que estes folículos tratavam-se de estruturas afuncionais, conforme relatado por Hamilton et al. (1995).

A aspiração de todos os folículos no D47 foi realizada com intuito de verificar a influencia dos folículos anovulatórios persistentes sobre a dinâmica folicular de vacas Nelore durante o período de implantação subcutânea da Deslorelina, de sincronizar a

762 emergência de uma nova onda folicular e a avaliação do padrão de liberação das
763 gonadotrofinas. No entanto, esta ocorreu posteriormente à metade do experimento,
764 momento em que foi constatada alteração abrupta no padrão da dinâmica folicular na
765 maioria dos animais.

766 O fato destes folículos anovulatórios persistentes, anteriormente a aspiração
767 folicular, não serem capazes de inibir a emergência e desvio dos demais folículos nos
768 sugere que a sua remoção coincidiu, mas não foi fundamental para ocorrer a alteração
769 na dinâmica folicular dos animais, por meio da modificação do padrão de liberação de
770 gonadotrofinas e pelo possível *feedback* negativo do $E_{2,}$ sintetizado por estes folículos
771 aspirados no D47.

772 A hipótese mais provável é que o tempo de implantação subcutânea da
773 Deslorelina em vacas Nelore é importante para determinação do padrão de secreção de
774 FSH e LH, responsável pelo perfil de crescimento folicular.

775 A concentração plasmática de P_4 a partir do D0 até o D8 acima de 1 ng/mL indica
776 a presença do CL e está de acordo com Niswender et al.(1994). Já a concentração basal
777 de P_4 no restante do estudo após a indução da luteólise, confirma a ausência de
778 ovulações em Nelore durante o período de implantação da Deslorelina e, corrobora com
779 o verificado em vacas taurinas após o parto tratadas por 30 dias com implantes
780 semelhantes por Silvestre et al. (2009a) em vacas de leite.

781 A imunomarcação dos EαR, EβR, PAR e PBR no epitélio glandular e no estroma
782 do endométrio de vacas Nelore foi tão eficiente quanto o relatado em animais de origem
783 taurina durante a realização da técnica da imunoistoquímica (Kuiper et al., 1996;
784 Mosselman et al., 1996; Conneely & Lydon, 2000).

785 Após a indução da luteólise no D8 até o fim do estudo, as baixas concentrações
786 plasmáticas de P_4 e a presença de folículos em crescimento, responsáveis pela produção

de E_2, favoreceram a elevada expressão proteica de EαR e EβR no epitélio glandular e no estroma uterino em vacas Nelore durante o período de implantação subcutânea da Deslorelina, conforme relatado por meio da técnica da imunoistoquímica em amostras coletadas no fim do diestro (luteólise) e o estro em vacas Holandesas (Lamming & Mann, 1995; Robinson et al., 2001; Mann & Lamming, 2006), no pós-parto de vacas taurinas (Vesanen et al., 1988) e, durante o estro em vacas Nelore (Martin et al., 2008). Este fato se justifica uma vez que a expressão proteica dos receptores endometriais de estrógeno é regulada principalmente pelas concentrações plasmáticas de P_4 (Boos et al., 1996; Boos et al., 2000; Goff, 2004; Martin et al., 2008).

Assim como os receptores endometriais de estrógeno, existem dois tipos de receptores de P_4, as *isoformas* A e B (Fujimoto et al., 1997; Conneely & Lydon, 2000), que são reguladas pela concentração plasmática de P_4 (Vesanen et al., 1992; Martin, 2005). No entanto, durante o estudo não foi possível verificar diferença entre a expressão proteica destas *isoformas* no tecido endometrial conforme realizado por Nunes et al. (2007) em tecido mamário de humanos.

O alto percentual de núcleos positivamente marcados dos ER e a alta expressão do RNAm dos OTR, constatados neste estudo, sugerem que a possível mensuração da expressão proteica dos OTR em Nelore revelaria uma alta expressão destes receptores, assim como citado por Tasende et al. (2002) durante o anestro pós-parto de vacas. Estes autores relataram ainda que a elevada concentração plasmática de E_2 e a baixa de P_4 favorecem a elevada expressão de ER e de OTR. Segundo alguns pesquisadores, esta situação resulta na luteólise prematura durante ciclo estral subsequente (Zollers et al., 1993; Mann et al., 2001; Day, 2004; Goff et al., 2006).

A intensidade de imunomarcação dos ER e dos PR não variou ao longo do período de anestro em vacas Nelore tratadas com Deslorelina, ao contrário do que foi

relatado ao longo do ciclo estral de vacas Nelore por Martin et al. (2008). Segundo este autor, a maior intensidade de imunomarcação dos ER e dos PR foi observado durante o estro e o início da fase lútea do ciclo, respectivamente, o que não foi verificado em nosso estudo devido a baixa concentração de P_4 ao longo de todo período de implantação da Deslorelina, responsável pela inibição da ovulação.

A quantificação da expressão relativa do RNAm dos EαR, EβR, PABR e OTR pela técnica de qRT-PCR no tecido endometrial em Nelore foi eficiente assim como constatado anteriormente em animais de origem taurina por meio da técnica do qRT-PCR (Robinson et al., 2001; Schams & Berischa 2002; Ulbrich et al., 2003).

A elevação da expressão do RNAm dos ER até o D4 em relação aos demais dias experimentais, porém esta não diferiu dos demais momentos ($p>0,05$), como foi relatado por Robinson et al. (2001), Schams & Berischa (2002) e Bollwein et al. (2010), que observaram alta expressão dos ER durante a fase inicial do diestro de bovinos, momento em que as concentrações de P_4 estão aumentando gradativamente.

Estes mesmos autores constataram elevada expressão dos ER no fim da fase lútea do ciclo estral, do mesmo modo como verificado, no presente estudo, ao longo de todo o período de implantação da Deslorelina, quando as concentrações de P_4 estavam baixas e havia crescimento folicular com consequente produção de E_2.

Mesmo não sendo diferente, o período em que houve aumento da concentração média de RNAm dos PABR coincidiu com o período de viabilidade do CL, padrão de expressão gênica semelhante ao descrito por Robinson et al. (2001) e Jordan et al. (2009), que verificaram maior concentração gênica dos PR entre os dias 6 e 14 do ciclo estral em vacas Holandesas.

A expressão relativa média do RNAm dos OTR permaneceu elevada ao longo de todo o período de implantação da Deslorelina em Nelore, no entanto, não foi constatada

diferença comparado aos dias em que o CL estava presente($p>0,05$) que corresponde ao D4, conforme citado por Robinson et al. (2001). Este padrão de expressão dos OTR foi semelhante durante o estro e luteólise em vacas Holandesas Robinson et al. (2001) e, enfatiza a existência de correlação positiva entre a expressão dos OTR e as concentrações plasmáticas de E_2 concomitantemente com o crescimento folicular e a redução da concentração plasmática de P_4.

Conclusão

O tratamento de vacas Nelore com implantes subcutâneos de Deslorelina (GnRHa-Suprelorin®), por 70 dias ininterruptos, influencia a dinâmica folicular, sem contudo, suprimir o recrutamento e a seleção folicular. Inibe a ovulação, reduz a pulsatilidade e amplitude do padrão de secreção de LH, inibe o pico pré-ovulatório de LH e, mantém elevada a expressão dos receptores endometriais de estrógeno, progesterona e ocitocina.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela FMVZ/UNESP-Botucatu, FAPESP (processos n. 2008/00906-1 e 2008/05253-1), FUNDUNESP (01189/08) e Peptech Animal Health.

Referências

AMBROSE JD, KASTELIC JP, RAJAMAHENDRAN R, AALI M, DINN N, 2005: Progesterone (CIDR)-based timed AI protocols using GnRH, porcine LH or estradiol cypionate for dairy heifers: ovarian and endocrine responses and pregnancy rates. Theriogenology **64**, 1457-1474.

AYRES M, AYRES JRM, AYRES DL, SANTOS AS, 2007: BioEstat 5.0-Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas: Sociedade Civil Mamirauá, Belém. CNPq, Brasília. 290p.

BARROS CM, MOREIRA MBP, FIGUEIREDO RA, TEIXEIRA AB, TRINCA LA, 2000: Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, $PGF_{2\alpha}$ and estradiol benzoate. Theriogenology **53**, 1121–1134.

BARUSELLI PS, GIMINES LU, SALES JNS, 2007: Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. Revista Brasileira de Reprodução Animal **31**, 205-211.

BASTOS MR, MATTOS MCC, MESCHIATTI MAP, SURJUS RS, GUARDIEIRO M M, MOURÃO GB, PIRES AV, PEDROSO AM, SANTOS FAP, SARTORI R, 2010: Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. Acta Scientiae Veterinariae (Abstract in press).

BLAST/NCBI. Disponível em: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em: maio de 2009.

BÓ GA, ADAMS GP, PIERSON RA, MAPLETOFT RJ, 1995: Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. Theriogenology **43**, 31-40.

BÓ GA, BARUSELLI, PS, MARTÍNEZ MF, 2003: Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. Animal Reproduction Science **78**, 307-326.

BOLLWEIN H, PROST D, ULBRICH SE, NIEMANN H, HONNENS A, 2010: Effects of a shortened preovulatory follicular phase on genital blood flow and endometrial hormone receptor concentrations in Holstein-Friesian cows. Theriogenology **73**, 242–249.

BOLT DJ, ROLLINGS R, 1983: Development and application of a radioimmunoassay for bovine FSH. Journal of Animal Science **56**, 146-154.

BOOS A, MEYER W, SCHWARZ R, GRUNERT E, 1996: Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. Animal Reproduction Science **44**, 11-21.

885 BOOS A, KOHTES J, STELLJES A, ZERBE H, THOLE HH, 2000:
886 Immunohistochemical assessment of progesterone, oestrogen and glucocorticoid
887 receptors in bovine placentomes during pregnancy, induced parturition, and after birth
888 with or without retention of foetal membranes. Journal of Reproduction and Fertility
889 **120**, 351–360.

890 BORGES A M, TORRES CAA, RUAS JRM, ROCHA JÚNIOR VR, CARVALHO
891 GR, FONSECA JF, NETO AM, ASSIS AJ, 2003: Características da dinâmica folicular
892 e regressão luteal de vacas das raças gir e nelore após tratamento com cloprostenol
893 sódico. Revista Brasileira de Zootecnia **32**, 85-92.

894 BURATINI JR J, PRICE CA, VISINTIN JA, BÓ GA, 2000: Effects of dominant
895 follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on
896 ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. Theriogenology **54**,
897 421-431.

898 CARVALHO JB, CARVALHO NA, REIS EL, NICHI M, SOUZA AH, BARUSELLI
899 OS, 2008: Effect of early luteolysis in progesterone based timed AI protocols in *Bos*
900 *indicus*, *Bos indicus* X *taurus*, and *Bos taurus* heifers. Theriogenology **69**, 167-175.

901 CASTILHO C, GARCIA JM, RENESTO A, NOGUEIRA GP, BRITO LFC, 2007:
902 Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular
903 deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. Animal
904 Reproduction of Science **98**, 189-196.

905 CONNEELY OM., LYDON JP, 2000: Progesterone receptors in reproduction:
906 functional impact of the A and B isoforms. Steroids **65**, 571–577.

907 CUPP AS, STUMPF TT, KOJIMA FN, WERTH LA, WOLFE MW, BOBERSON MS,
908 KITTOK RJ, KINDER JE, 1995: Secretion of gonadotropins changes during the luteal

phase of the bovine oestrous cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or 17β-oestradiol. Animal Reproduction Science **37**, 109-119.

DAY ML, 2004: Hormonal induction of estrous cycles in anestrous Bos taurus beef cows. Animal Reproduction Science **82**, 487–494.

D'OCCHIO MJ, ASPDEN WJ, 1996: Characteristics of luteinizing hormone LH. and testosterone secretion, pituitary responses to LH-releasing hormone LHRH. and reproductive function in young bulls receiving the LHRH agonist deslorelin: effect of castration on LH responses to LHRH. Biology and Reproduction **54**, 45–52.

D'OCCHIO MJ, FORDYCEB G, WHYTEA TR, ASPDEN AWJ, TRIGG TE, 2000: Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. Animal Reproduction Science **60**, 433-442.

FERRAZ HT, 2007: Dinâmica folicular, concentração sérica de hormônio luteinizante e citologia vaginal de fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*) submetidas à sincronização da ovulação. Goiânia, 2007. 47p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Universidade Federal de Goiás-UFG, Goiânia, 2007.

FIGUEIREDO RA, BARROS CM, PINHEIRO OL, SOLER JMP, 1997: Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. Theriogenology **47**, 1489-1505.

FITZGERALD BP, I'ANSON H, LEGAN S, LOY RG, 1985: Changes in pattern of luteinizing hormone secretion before and after the first ovulation in the postpartum mare. Biology of Reproduction **33**, 316-323.

FLORES R, LOOPER ML, RORIE RW, HALLFORD DM, ROSENKRANS CF, 2008: Endocrine factors and ovarian follicles are influenced by body condition and somatotropin in postpartum beef cows. Journal of Animal Science **86**, 1335-1344.

FORTUNE J. E, RIVERA GM, EVANS ACO, TURZILLO AM, 2001: Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. Biology of Reproduction **65**, 648-654.

FUJIMOTO J, ICHIGO S, HIROSE R, SAKAGUCHI H, TAMAYA T 1997: Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B RNAms in secondary spreading of gynecologic cancers. Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology **62**, 449-454.

GIMENES LU, FANTINATO NETO P, ARANGO JSP, AYRES H, BARUSELLI OS, 2009: Follicular dynamics of Bos indicus, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. Animal Reproduction of Science **6**, 256.

GIMENES LU, SÁ FILHO MF, CARVALHO NAT, TORRES-JÚNIOR JRS, SOUZA AH, MADUREIRA EH, TRINCA LA, SARTORELLI ES, BARROS CM, CARVALHO JBP, MAPLETOFT RJ, BARUSELLI OS, 2008: Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. Theriogenology **69**, 852–858.

GINTHER OJ, KNOPF L, KASTELIC JP, 1989a: Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. Journal of Reproduction and Fertility **87**, 223-230.

GINTHER OJ, KNOPF L, KASTELIC JP, 1989b: Ovarian follicular dynamics in heiters during early pregnancy. Biology of Reproducfion **41**, 247-254.

GINTHER OJ, KOT K, KULICK LJ, WILTBANK MC, 1996a: Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. Theriogenology

GINTHER OJ, KOT K, KULICK LJ, MARTIN S, WILTBANK MC, 1996b: Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. Journal of Reproduction and Fertility **108**, 271-279.

GINTHER OJ, 2000: Selection of the dominant follicle in cattle and horses. Animal Reproduction Science **60-61**, 61-79.

GINTHER OJ, BEG MA, BERGFELT DR, DONADEU FX, KOT K, 2001: Follicle selection in monovular species. Biology of Reproduction **65**, 638-647.

GINTHER OJ, FUENZALIDA MJ, PUGLIESI G, HANNAN MA, BEG MA, 2011a: Effect of luteinizing hormone oscillations on progesterone concentrations based on treatment with a gonadotropinreleasing hormone antagonist in heifers. Domestic Animal Endocrinology **40**, 119–127.

GINTHER OJ, FUENZALIDA MJ, SHRESTHA HK, BEG MA, 2011b: Concomitance of luteinizing hormone and progesterone oscillations during the transition from preluteolysis to luteolysis in cattle. Domestic Animal Endocrinology **40**, 77–86.

GOFF AK, 2004: Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. Biology of Reproduction **71**, 11-16.

GOFF AK, JAMSHIDI AA, KOMBÉ A, 2006: Inhibition of prostaglandin F2α synthesis and oxytocin receptor by progesterone antagonists in bovine endometrial cells in vitro. Steroids **71**, 785–791.

GONG JG, BRAMLEY TA, GUTIERREZ CG, PETERS AR, WEBB R, 1995: Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. Journal of Reproduction and Fertility **105**, 263–270.

GONG JG, CAMPBELL BK, BRAMLEY TA, GUTIERREZ CG, PETERS AR, WEBB R, 1996: Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. Biology and Reproduction **55**, 68–74.

GÜNGÖR O, KAYA M, GÜRBULAK K, ORAL H, KAYA S, KAÇAR C, 2010: Use of GnRH agonist (Deslorelin) in combination with $PGF_{2\alpha}$ on the termination of pregnancy in bitches. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi **16**, 903-908.

HAMILTON SA, GARVERICK HA, KEISLER DH, XU ZZ, LOOS K, YOUNGQUIST RS, SALFEN BE, 1995: Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. Biology of Reproduction **53**, 890-898.

HOUGHTON PL, LEMENAGER RP, HORSTMAN LA, HENDRIX KS, MOSS GE, 1990: Effects of body composition, pre- and postpartum energy level and early weaning on reproductive performance of beef cows and preweaning calf gain. Journal of Animal Science **68**, 1438-1446

HUMPHREY WD, KALTENBACH CC, DUNN TG, KORITNIK DR, NISWENDER GD, 1983: Characterization of Hormonal Patterns in the Beef Cow during Postpartum Anestrus. Journal of Animal Science **56**, 445-453.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/default.shtm#animal. Acesso em: dezembro de 2008.

IRELAND JJ, WARD F, JIMENEZ-KRASSEL F, IRELAND JL, SMITH GW, LONERGAN P, EVANS ACO, 2007: Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. Human Reproduction **22**, 1687-1695.

JORDAN A, HERZOG K, ULBRICH SE, BEINDORFF N, HONNES Ä, KRÜGER L, MYAMOTO A, BOLLWEIN H, 2009: Genital blood endometrial gene expression during the preoculatory period after prostaglandin F2α-induced luteolysis in different luteal phases in cows. Journal of Reproduciton and Development **55**, 309-315.

KUIPER GGJM, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S, GUSTAFSSON JA, 1996: Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proceeding of the National Academy of Sciences **93**, 5925-5930.

LAMMING GE, MANN GE, 1995: Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F2α production in cows by progesterone and oestradiol. Journal of Reproduction and Fertility **103**, 69-73.

LARIONOV A, KRAUSE A, MILLER W, 2005: A standard curve based method for relative real time PCR data processing. BMC Bioinformatics **6**, 1-16.

MAIO JRG, SANDOVAL GAF, SOUZA EDF, NOGUEIRA GP, CIPRIANO RS, PERECIN F, GARCIA JM, 2006: Concentração sérica de LH em vacas Nelore ciclando ou ovariectomizadas submetidas ao tratamento com 2,0 mg de benzoato de estradiol. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO, 2006, Angra do Reis. Acta Scientiae Veterinariae, **34**, 360.

MANN GE, LAMMING GE, 2006: Timing of prostaglandin F2α release episodes and oxytocin receptor development during luteolysis in the cow. Animal Reproduction Science **93**, 328–336.

MANTOVANI AP, NICH M, SÁ FILHO MF, AYRES H, VETTORATO LF, BÓ GA, BARUSELLI OS, 2010: Follicular growth and plasma progesterone patterns in *Bos indicus* X *Bos taurus* heifers submitted to different $PGF_{2\alpha}$/progesterone-based sunchronization protocols. Animal Reproduciton **7**, 91-96.

MARTIN I, 2005: Avaliação ultra-sonográfica, perfil hormonal e imunoistoquímica de receptores de estrógeno e progesterona durante o ciclo estral em vacas Nelore (Bos taurus indicus). Botucatu, 2005. 140p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Botucatu, 2005.

MARTIN I, TORRES NETO R, OBA E, BURATINI JÚNIOR, J, BINELI M, LAUFER-AMORIM R, FERREIRA JCP, 2008: Immunohistochemical detection of receptors for oestrogen and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrus cycle in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows. Reproduction Domestic Animals **43**, 415-421.

MATTOS R, ORLANDI C, WILLIAMS J, STAPLES CR, TRIGG T, THATCHER WW, 2001: Effect of an implant containing the GnRH agonist deslorelin on secretion of LH, ovarian activity and milk yield of postpartum dairy cows. Theriogenology **56**, 371-386.

MENEGHETTI M, LOSI TC, MARTINS JÚNIOR AP, VILELA ER, VASCONCELOS JLM, 2005: Protocolos de sincronização de ovulação a base de progesterona e estradiol, em vacas de corte paridas. 3: Efeito do uso de ECP, Benzoato de Estradiol e GnRH como estímulo ovulatório. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal **16**, 2005, Goiânia. Anais: Resumo 188.

MONTEIRO FM, MELO DS, FERREIRA MMG, CARVALHO LM, SARTORELI ES, EDERHARDT BG, NOGUEIRA GP, BARROS CM, 2009: LH surge in Nelore cows (*Bos indicus*), after induced estrus or after ovarian superestimulation. Animal Reproduction Science **110**, 128–138.

MOSSELMAN S, POLMAN J, DIJKMA S, 1996: EβR: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. Febs Letters **392**, 49-53.

NISWENDER GD, JUENGEL JL, MCGUIRE WJ, BELFIORE CJ, WILTBANK MC, 1994: Luteal Function: the estrous cycle and early pregnancy. Biology of Reproduction **50**, 239-247.

NUNES CB, 2007: Estudo imunoistoquímico comparativo entre seis anticorpos anti-HER2 em arrays de carcinomas mamários: correlação com hibridação in situ

cromogênica e avaliação interobservador. Belo Horizonte, 2007. 97p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mias Gerais, Belo Horizonte, 2007.

OKAMURA H, OHKURA S, 2007: Neuroendocrine control of reproductive function in ruminants. Animal Science Journal **78**, 105–111.

PADULA AM, 2005: GnRH analogues—agonists and antagonists. Animal Reproduction of Science **88**, 115–126.

PADULA AM, MACMILLAN KL, 2002: Reproductive responses of early postpartum dairy cattle to continuous treatment with a GnRH agonist (Deslorelin) for 28 days to delay the resumption of ovulation. Animal Reproduction of Science **70**, 23–36.

ROBINSON RS, MANN GE, LAMMING GE, WATHES DC, 2001: Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. Reproduction **122**, 965–979.

RUBIO I, CASTILLO E, SOTO R, ALARCÓN F, MURCIA C, GALINA CS, 2010: Postpartum follicular development in Brahman cows under two stocking rates. Tropical Animal Health and Production **42**, 539–545.

SARTORELLI ES, CARVALHO LM, BERGFELT DR, GINTHER OJ, BARROS CM, 2005: Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (Bos indicus) heifers and cows. Theriogenology **63**, 2382-2394.

SARTORI R, HAUGHIAN JM, SHAVER RD, ROSA GJM, WILTBANK MC, 2004: Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. Journal of Dairy Science **87**, 905-920.

SARTORI R, BASTOS MR, BARUSELLI PS, GIMENES LU, ERENO RL, BARROS CM, 2010: Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. In: Reproduction in

Domestic Ruminats VII, v. 67, 2010, Anchorage. Proccedings…Anchorage: Society of Reproduction and Fertility **67**, 357.

SCHAMS D, BERISHA B, 2002: Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. Domestic Animal Endocrinology **23**, 53-65.

SILVESTRE FT, BARTOLOME JA, KAMIMURA S, ARTECHE AC, PANCARCI SM, TRIGG T, TATCHER WW, 2009a: Postpartum suppression of ovarian activity with a deslorelin implant enhanced uterine involution in lacting dairy cows. Animal Reproduction of Science **110**, 79-95.

SILVESTRE FT, KAMIMURA S, ARTECHE AC, BARTOLOME J, PANCARCI SM, THATCHER WW, 2009b: Reproductive responses following postpartum suppression of ovarian follicular development with a deslorelin implant during summer heat stress in lactating dairy cows. Animal Reproduction Science **11**, 320–337.

TASENDE C, MEIKLE A, RODRÍGUEZ-PIÑÓN M, FORSBERG M, GÁRAFALO EG, 2002: Estrogen and porgesterone receptor content in the pituitary gland and uterus of progesterone-primed and gonadotropin relising hormone-treated anestrous ewes. Theriogenology **57**, 1719-1731.

ULBRICH SE, KETTLER A, EINSPANIER R, 2003: Expression and localization of estrogen receptor α, estrogen receptor β and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology **84**, 279–289.

VESANEN M, ISOMAA V, ALANKO M, VIHKO R, 1988: Cytosol estrogen and progesterone receptors in bovine endometrium after uterine involution pospartum and in the estrous cycle. Animal Reproduction of Science **17**, 9-20.

VESANEN M, ISOMAA V, ALANKO M, VIHKO R, 1992: Bovine uterine, cervical and ovarian estrogen and progesterone receptor concentrations. Acta Veterinaria Scandinavica **33**, 379-386.

WILTBANK MC, GÜIMEN A, SARTORI R, 2002: Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. Theriogenology **57**, 21-52.

YAVAS Y, JOHNSON WH, WALTON JS, 1999: Modification of follicular dynamics by exogenous FSH and progesterone, and the induction of ovulation using HCG in postpartum beef cows. Theriogenology **52**, 949-963.

ZOLLERS JUNIOR WG, GARVERICK HA, SMITH MF, MOFFATT RJ, SALFEN B. E, YOUNGQUIST RS, 1993: Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrous cycle. Journal of Reproduction and Fertility **97**, 329-337.

Capítulo 3

REVISÃO ENVIADA PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA

VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Fisiologia do ciclo estral da fêmea bovina

Wolff Camargo Marques Filho, Letícia Ferrari Crocomo, João Carlos Pinheiro Ferreira

2011

FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL DA FÊMA BOVINA

Wolff Camargo Marques Filho[1*]
Letícia Ferrari Crocomo[2]
João Carlos Pinheiro Ferreira[3]

RESUMO

No Brasil, cerca de 80% dos 199,7 milhões de bovinos são da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), que se caracteriza pela rusticidade e o elevada tolerância ao clima tropical. Estas características favorecem a distribuição e criação de animais Nelore, em sua maioria, de forma extensiva. Como nas demais atividades, para a criação de bovinos se tronar viável economicamente, é necessário o aprimoramento do manejo de criação e das biotecnologias reprodutivas, com intuito de reduzir o intervalo entre partos, o período de serviço, e consequentemente obter 1 bezerro/vaca/ano. Deste modo, o longo período de anestro e de restabelecimento da atividade ovariana após o parto, e o baixo índice de fertilidade no primeiro ciclo estral subsequente são alguns dos fatores que limitam a produtividade e resultam em significativas perdas econômicas na bovinocultura brasileira. Ao longo da vida reprodutiva dos animais domésticos ocorrem oscilações na concentração plasmática dos hormônios da reprodução que, por meio da ligação com seus receptores específicos, promovem a regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, com consequente alterações morfológicas e endocrinológicas do trato reprodutivo. Existem, no entanto, diferenças entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* quanto à fisiologia da reprodução e peculiaridades da dinâmica folicular. Em zebuínos, as particularidades relacionadas ao anestro pós-parto, ao ciclo curto e à baixa eficiência reprodutiva relacionada ao uso da primeira ovulação pós-parto, decorrente da luteólise prematura do primeiro corpo lúteo, ainda são desconhecidas. O retorno à atividade ovariana pós-parto na vaca ocorre após o restabelecimento da síntese e do estoque disponível de LH na hipófise. Isto ocorre em virtude da depleção do estoque de LH durante a gestação, em decorrência do *feedback* negativo e prolongado do estradiol (E_2) e progesterona (P_4) (principalmente P_4) sobre o hipotálamo, diminuindo a liberação de GnRH e, consequentemente, a síntese e liberação de LH pela hipó-

---

1*Médico Veterinário, Doutor em Reprodução Animal, bolsista **FAPESP**, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. E-mail: wolffcmf@gmail.com

*Médica Veterinária, Mestre em Reprodução Animal, bolsista **CAPES**, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

2* Prof. Dr. do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP, Botucatu, São Paulo.

* Correspondência: Distrito de Rubião Jr, s/n, CEP 18618-000 Botucatu – SP

fise anterior. Após o parto, há diminuição da concentração plasmática de P_4, que resulta no acúmulo de LH na hipófise anterior. A secreção de FSH aumenta rapidamente, suficiente para estimular o recrutamento folicular, enquanto que os pulsos de LH são retomados cerca de 20 a 30 dias pós-parto. Deste modo, a compreensão da fisiologia do ciclo estral da fêmea bovina e dos mecanismos de regulação das funções ovarianas e endometrial por meio do eixo hipotalâmico-hipofisário é fundamental para o desenvolvimento científico e aprimoramento biotecnológico.

Palavras-chaves: Bovinos, ciclo estral, dinâmica folicular, hormônios, receptores.

PHYSIOLOGY OF THE FEMALE BOVINE ESTROUS CYCLE

ABSTRACT

In Brazil, about 80% of 119.7 million of bovines are Nelore (*Bos taurus indicus*), which is characterized by hardiness and high tolerance to the tropical climate. These characteristics favor the distribution and breeding of Nelore animals, mostly, in extensive form. As in other activities, for the cattle breeding become economically viable is necessary to improve the breeding management and the reproductive biotechnologies, aiming to reduce the calving interval, the service period, and consequently get a calf/cow/year. Thus, the long anoestrus period and ovarian activity restoration after parturition, and the low fertility rate in the following first cycle are some of the factors that limit the productivity and result in significant economic losses in Brazilian cattle rearing. Throughout the reproductive life of domestic animals there are fluctuations in serum concentrations of reproductive hormones that, by binding to their specific receptors, promote the regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, with subsequent morphological and endocrinological changes in tract reproductive. There are, however, differences between *Bos taurus taurus* and *Bos Taurus indicus* with regard to the reproductive physiology and follicular dynamics peculiarities. In zebu cattle, the specifics related to postpartum anoestrus, short cycle and low reproductive efficieny related to the use of first postpartum ovulation, due to premature luteolysis of the first corpus luteum, are still unknow. The return to ovarian activity in postpartum cows occurs after the restoration of synthesis and the available stock of LH in the pituitary gland. This is due to the depletion of the LH stock during pregnancy, due to the prolonged negative feedback of E_2 and P_4 (P_4 mainly) on the hypothalamus, decreasing the release of GnRH and, consequently, the synthesis and release of LH by anterior pituitary. After parturition, there is P_4 serum concentration reduction, resulting

in the LH accumulation in anterior pituitary. The FSH secretion increases rapidly enough to stimulate follicular recruitment, while LH pulses are resumed about 20 to 30 days postpartum. Thus, the understanding the physiology of the female bovine estrous cycle and the mechanisms of endometrial and ovarian function regulation, through the hypothalamic-pituitary axis is essential for improving the scientific development and biotechnology improvement.

Keywords: cattle, estrous cycle, follicular dynamics, hormones, receptors.

FISIOLOGÍA DE CICLO ESTRAL DE LA HEMBRA BOVINA

RESUMÉN

En Brasil, alrededor del 80% de los 199.7 milliones de bovinos son de la raza Nelore (*Bos taurus indicus*), que se caracteriza por la rusticidad y alta tolerancia al clima tropical. Estas características favorecen la creación y distribución del Nelore, en su mayoría, de forma extensiva. Como en otras actividades, para que la creación de ganado se convierta en económicamente viable, es necesario mejorar el manejo de creación y de las biotecnologías reproductivas, con el objetivo de reducir el intervalo entre parto, el período de servicio, y en consecuencia obtener un ternero/vaca/año. Así, el largo período de anestro y de restauración de la actividad ovárica después del parto, y la baja tasa de fecundidad en el primer ciclo estral siguiente son algunos de los factores que limitan la productividad y conducen a importantes pérdidas económicas en el ganado bovino en Brasil. A lo largo de la vida reproductiva de los animales domésticos se producen fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas de las hormonas reproductivas, que al unirse a sus receptores específicos, promueven la regulación del eje hipotálamo-hipofisis-gonadal, con posterior modificaciones morfológicas y endocrinológicas en el tracto reproductivo. Hay, sin embargo, diferencias entre *Bos taurus* y *Bos indicus* en la fisiología reproductiva con respecto a la fisiología reproductiva y a las peculiaridades de la dinámica folicular. En cebú, los detalles relacionados con el anestro posparto, el ciclo corto y a la baja eficiencia reproductiva, relacionada con el uso de la primera ovulación posparto, debido a la luteolisis prematura del primer cuerpo lúteo, aún son desconocidos. El retorno a la actividad ovárica en vacas posparto ocurre después de la restauración de la síntesis y de la disposición de LH en la hipófisis. Esto se debe al agotamiento de las existencias de LH durante la gestación, debido a la retroalimentación negativa y prolongada de E_2 e P_4

(especialmente P_4) en el hipotálamo, disminuyendo la liberación de GnRH y, en consecuencia, la síntesis y liberación de LH por la hipófisis anterior. Después del parto, la concentración plasmática de P_4 se reduce, lo que resulta en la acumulación de LH en la pituitária anterior. La secreción de FSH aumenta con rapidez suficiente para estimular el reclutamiento folicular, mientras que los pulsos de LH se repiten entre 20 y 30 días después del parto. Así, la comprensión de la fisiologia del ciclo estral de la hembra bovina y de los mecanismos de regulación del endométrio y de las funciones ováricas por médio del eje hipotálamo-hipófisis es essencial para el desarollo científico y mejora biotecnológica.

Palabras claves: ciclo estral, dinâmica folicular, hormonas, receptores.

INTRODUÇÃO

O rebanho bovino é constituído por aproximadamente 199,7 milhões de cabeças, sendo 80% de origem Zebuína, com alto poder de tolerância ao clima tropical (adaptabilidade e rusticidade) (1). No entanto, o intervalo entre partos é de 18 meses e o período de serviço é de 9 meses (2).

O organismo como um todo é regulado pelo sistema nervoso, de forma rápida e direta, por meio dos prolongamentos nervosos dispostos pelo corpo e, de forma indireta e lenta, pelo sistema endócrino que regula a homeostase e as diversas funções específicas, tais como o desenvolvimento folicular ovariano, o comportamento sexual, a gestação, o parto e a lactação (3,4).

A função reprodutiva durante o ciclo estral é modulada pelo padrão de secreção e concentração sérica dos hormônios da reprodução por meio dos processos de retroalimentação, bem como pela expressão gênica e proteica dos receptores hormonais do aparelho reprodutivo e tecidos conexos (5,6).

As particularidades fisiológicas que acometem estes animais durante a fase do anestro pós-parto, os fatores que determinam a duração desta fase e do primeiro ciclo estral após o período de anestro (ciclo curto) ainda não foram totalmente elucidados.

Neste contexto, pesquisas referentes à fisiologia geral, à forma de regulação da função reprodutiva e às reações do organismo em fases específicas da vida reprodutiva dos bovinos vêm sendo desenvolvidas com intuito de incrementar o uso da biotécnicas da reprodução e maximizar a eficiência reprodutiva do rebanho nacional.

CICLO ESTRAL BOVINO

O ciclo estral de fêmeas bovinas sexualmente maduras se inicia após a puberdade sendo interrompido durante a gestação e o anestro. Trata-se do período compreendido entre dois episódios de estro ou cio, de duração variável, que apresenta fases distintas caracterizadas por modificações internas e externas no trato reprodutivo feminino, assim como no comportamento dos animais (7).

Os bovinos são animais poliéstricos anuais que apresentam ciclo estral com duração aproximada de 21 (17 a 24) dias e normalmente apresentam 2 a 3 ondas de crescimento folicular (8,9). Neste animais, o ciclo estral bovino pode ser dividido em duas fases, baseada nas concentrações plasmáticas dos hormônios predominantes em cada uma delas.

A fase folicular, com duração de 3 a 4 dias, compreende o proestro e o estro e, tem início após a secreção de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) e o processo da luteólise. Se caracteriza pelo desenvolvimento folicular e predominância de altas concentrações plasmáticas de estradiol (E_2), culminando com o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) e, a consequente ovulação, que marca o início da fase seguinte. A fase luteal, com duração aproximada de 18 a 19 dias, inclui o metaestro e o diestro e, se caracteriza pelo desenvolvimento do corpo lúteo (CL) e pela crescente ou maior concentração plasmática de P_4 (7,10).

DINÂMICA FOLICULAR

- FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS

Durante a vida embrionária e a pré-puberdade das fêmeas, a fase inicial de crescimento folicular ocorre independentemente de gonadotropinas e termina quando o folículo ainda é pré-antral, momento em que são dependentes dos fatores de crescimento, tais como, fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I), fator de crescimento transformante (TGF-β), particularmente o fator de crescimento diferencial-9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15 ou GDF-9B), activina e fator de crescimento fibroblástico (FGF) (11).

O desenvolvimento folicular pré-antral depende também da proliferação e diferenciação das células da granulosa, processo que ocorre devido a comunicação intercelular através dos processos citoplasmáticos trans-zonais (TZP) (12), que permitem a passagem bidirecional de íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas

moléculas reguladoras. Estas extensões se retraem quando o folículo atinge o estágio antral, provavelmente pela ação do LH (12,13).

O crescimento folicular inicial é estimulado pela ação sinérgica do kit ligante (KL) e da BMP-15, enquanto o GDF-9 é secretado tardiamente por oócitos maduros, promovendo a proliferação das células da granulosa e modulação da função do KL (14).

O KL produzido pelas células da granulosa de camundongos e seu receptor específico (c-kit), expressos no oócito, formam o complexo c-kit/KL. No folículo primordial e primário, este se relaciona com a proliferação e síntese de DNA nas células da granulosa, e estimula a diferenciação de células do estroma em células da teca (15,16).

No estágio secundário, o GDF-9 é essencial para o desenvolvimento dos folículos, uma vez que potencializa a proliferação das células da granulosa (17). A interação entre o BMP-15 e o KL também é fundamental para o crescimento folicular. O BPM-15 estimula a expressão do KL, que, por sua vez, inibe a expressão da BMP-15 (14). Enquanto o GDF-9 inibe a expressão do KL em células da granulosa de camundongos (18).

Os mecanismos endócrinos também exercem importante função no desenvolvimento de folículos pré-antrais, os quais expressam receptores de IGF-I e proteínas ligantes de IGFBP-2 e 3, que são reguladores da biodisponibilidade de IGFs extra-ovarianos (19).

O desenvolvimento folicular pré-antral também é regulado de forma parácrina pela ativina, folistatina, inibina, fator de crescimento epidermal (EGF) e FGF (20). O FGF-2 é capaz de estimular a ativação de folículos primordiais em culturas de fragmentos de ovários de ratas, e de promover proliferação de células da granulosa (20,21).

- FOLÍCULOS ANTRAIS

Nos folículos pré-antrais, há expressão de receptores para o FSH, nas células da granulosa, e para o LH, nas células da teca. Com isso, se inicia uma fase de desenvolvimento folicular dependente de gonadotropinas, caracterizada pelo recrutamento de um grupo de pequenos folículos (emergência folicular) com intervalos de aproximadamente dez dias, sob a influência do FSH secretado após as fêmeas atingirem a puberdade (7,8).

Nas células da granulosa, o FSH estimula a ativação da enzima P450 aromatase, responsável pela metabolização e transformação de andrógenos em estradiol. A influência do FSH e do estradiol acarreta alterações morfológicas no folículo, que passa a apresentar uma cavidade repleta de líquido em seu interior, sendo chamado de folículo antral (7,22).

Entre todos esses folículos, apenas um continua seu desenvolvimento, o folículo dominante, caracterizado pela maior capacidade de produzir 17β-estradiol em relação aos demais recrutados no início da onda. Os demais folículos denominados subordinados começam a apresentar taxa de crescimento gradativamente menor e entram em atresia (8).

O momento em que se detecta diferença entre a taxa de crescimento do folículo dominante e do maior folículo subordinado é denominado de desvio ou divergência folicular que ocorre, respectivamente, 2,7 e 3,8 dias após a emergência folicular, quando o folículo dominante possui de 5,4 a 6,1 mm em zebuínos (23) e entre 10 e 12 mm em *Bos taurus taurus* (24).

O sistema IGF atua de forma sinérgica com o FSH no processo de divergência folicular e produção de estrógenos (25). Os IGF-I e II são expressos nas células da granulosa e da teca, no entanto, o IGF-II atua de forma parácrina (intraovariana) enquanto o IGF-I atua via endócrina (26).

Os IGFs estimulam a expressão de seus receptores específicos nas células da teca e da granulosa, que estão presentes em concentrações diferentes quando comparados folículos dominantes e subordinados (27). As IGFBPs modulam as concentrações disponíveis de IGFs na corrente sanguínea e estão presentes no fluido folicular bovino (28).

Após a divergência folicular durante o diestro, fase em que o CL oriundo do ciclo anterior está presente e o nível plasmático de P_4, responsável pela redução da frequência da pulsatilidade de LH, está alto, ocorre o desvio folicular. No entanto, o folículo dominante entra em processo de atresia e se torna anovulatório. A partir desse momento ocorre a emergência de uma nova onda de crescimento folicular (8).

No entanto, se após a divergência ocorrer a regressão luteínica com consequente diminuição da concentração plasmática da P_4, o folículo dominante continua o seu crescimento e secreta grande quantidade de estradiol promovendo o pico ovulatório de LH, que desencadeia a ovulação e à maturação oocitária (7,25).

- LUTEINIZAÇÃO

Durante a ovulação ocorre a ruptura da membrana folicular composta pelas células da teca (externa e interna) e da granulosa, e a expulsão do oócito. Imediatamente, a parede do folículo é colapsada e a cavidade invadida por linfa e sangue dos capilares, que serão os componentes de uma nova estrutura, o corpo hemorrágico (29).

Subsequentemente, o corpo hemorrágico se reorganiza e origina o CL, sob a influência de fatores angiogênicos e mitogênicos (FGF-2, TGF-β, IGF-I, fator de crescimento semelhante à heparina e fator de crescimento endotelial vascular) (30).

O crescimento do CL ocorre rapidamente a partir da proliferação celular e da diferenciação das células da granulosa em células luteínicas grandes, que apresentam receptores para LH, responsáveis pela síntese das elevadas concentrações de P_4, e das células da teca remanescentes do folículo ovulado em células luteínicas pequenas (31).

O CL é primariamente reconhecido pela habilidade em sintetizar e secretar progestágenos, hormônios que estão relacionados com a manutenção de um ambiente adequado ao desenvolvimento embrionário e pela própria manutenção do CL durante o período da ovulação até a implantação, quando ocorre o reconhecimento materno da gestação (31). Além da P_4, o CL após 10 a 15 dias de vida, produz uma substância denominada ocitocina (OT), que juntamente com a P_4 e o E_2, regulam o fenômeno da luteólise (32).

-LUTEÓLISE

A regressão morfológica e funcional do CL ocorre 17 a 20 dias após a ovulação durante o ciclo estral de aproximadamente 21 dias. Este processo é denominado luteólise e determina a duração do ciclo estral (7).

As concentrações plasmáticas de E_2, P_4 e OT estão relacionadas com a secreção de $PGF_{2\alpha}$, substância responsável pela luteólise, que é secretada pelo endométrio bovino de maneira pulsátil e mensurada através do metabólito da $PGF_{2\alpha}$ encontrada na circulação sanguínea, a 13, 14 diidr-15ceto prostaglandina (PGFM) (33).

Há relatos de ação indireta, onde o estradiol proveniente dos folículos em crescimento é estimula o aumento na concentração de receptores endometriais de OT associada à sensibilização prévia pela P_4 no final da fase luteínica. A OT proveniente do CL ou da neurohipófise, ao se acoplar a estes receptores, estimula a secreção endometrial de $PGF_{2\alpha}$ (34; 32).

Após a luteólise, os elevados níveis plasmáticos de E_2 estimulam os neurônios Kiss-1 no centro pré-ovulatório hipotalâmico, responsável pela liberação de GnRH, que por sua vez, desencadeia o pico pré-ovulatório de LH pela hipófise (35; 36).

DIFERENÇAS ENTRE *Bos taurus indicus* X *Bos taurus taurus*

Alguns estudos demonstram que os zebuínos apresentam menor fertilidade que os *Bos taurus taurus*. Assim como a espécie de origem européia, o *Bos taurus indicus* apresenta 2 ou 3 ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral (37).

Há diferenças na dinâmica folicular entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* quanto ao número de folículos recrutados. Os zebuínos apresentam maior número de ondas de crescimento foliculares por ciclo estral (38), e menor diâmetro do folículo pré-ovulatório e do CL (37; 39).

HORMÔNIOS E RECEPTORES HORMONAIS

O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos envolvendo, principalmente os hormônios hipotalâmicos (hormônio liberador de gonadotrofinas – GnRH), hipofisários (LH e FSH) e gonadais (E_2, P_4 e inibina) (3; 7).

De maneira geral, esta regulação é efetuada pelas concentrações plasmáticas dos hormônios protéicos e esteróides circulantes na corrente sanguínea que atingem os diferentes órgãos alvos de diversas formas (40). Também ocorre regulação via parácrina, que consiste na comunicação entre células vizinhas por meio dos produtos celulares, e autócrina, que se caracteriza pela produção de mensageiros químicos secretados por células que atuarão sobre elas mesmas ao se unirem à receptores específicos (7).

A regulação da secreção dos diversos hormônios ocorre por meio de *feedback* negativo, com inibição da secreção, e positivo, com estimulação da secreção hormonal. São descritos outros mecanismos de regulação, como por meio de reflexos neuroendócrinos, evidenciado durante o processo de liberação do leite quando o bezerro realiza estimulação mecânica do teto, com consequente, liberação de OT e prolactina. Há ainda o controle exócrino, realizado por meio dos feromônios (3).

Para que os hormônios desencadearem suas funções no organismo é imprescindível a ligação com receptores específicos de membrana plasmática e nuclear, que normalmente são proteínas ou glicoproteínas (7; 36).

O LH e FSH exercerem sua função por meio da ligação com os receptores específicos na membrana plasmática, seguida da penetração nas células-alvo onde se ligam aos seus receptores citoplasmáticos específicos (3; 7).

Enquanto os hormônios esteróides penetram pela membrana citoplasmática, o complexo esteróide-receptor citoplasmático é transferido para o núcleo, onde se liga aos receptores específicos na cromatina. Segue-se a síntese de RNA polimerase e a produção de RNA mensageiro. Assim, a capacidade de síntese de proteína por uma célula ocorre após 30 minutos da interação inicial entre o esteróide e o receptor citoplasmático (7; 41).

-HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINA

O GnRH é um decapeptídeo sintetizado por células neuroendócrinas na área pré-óptica do hipotálamo, e após ser liberado sob a forma de pulsos, atinge a adenohipófise através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, desencadeando a secreção do FSH e LH (35).

A ligação do GnRH aos receptores específicos de membrana ativa as proteínas G, que por sua vez ativam a enzima adenilciclase, responsável em transformar ATP em AMPc (2º mensageiro) no citoplasma. Este segundo mensageiro ativa quinases proteicas, desencadeando a formação de novas proteínas. As próprias concentrações do GnRH regulam a expressão dos receptores de GnRH (GnRHR) hipofisários (7; 36).

O sistema circulatório envolvido nesse processo é conhecido como sistema porta hipotalâmico-hipofisário, composto por uma rede de capilares. O GnRH é secretado pelo centro tônico hipotalâmico em resposta aos baixos níveis de LH ou FSH (*feedback* positivo) e sua liberação provoca aumento da secreção dos hormônios hipofisários.(3; 7).

-GONADOTROFINAS

A secrerção do FSH e o LH pelas células da pituitária anterior (Adenohipófise) é regulada pelo *feedback* positivo e negativo e pela concentração plasmática dos hormônios gonadais (7).

A principal função do FSH na fêmea é promover o crescimento dos folículos, que são responsáveis pela produção de estradiol. O pico de estradiol é seguido pelo pico pré-ovulatório de LH, imprescindível ao processo ovulatório, que acarreta a formação do CL por meio da luteinização das células da granulosa e da teca (3).

A formação do complexo FSH/receptor de FSH (FSHR) desencadeia uma série de processos no interior das células da granulosa, que incluem aumento da produção de fluido folicular, expressão de novos receptores de membrana para LH e FSH e das junções comunicantes GAP, estímulo da atividade da enzima aromatase P450 e da síntese de estradiol a partir de andrógenos sob ação sinérgica das células da teca e granulosa (3).

As concentrações de RNAm de FSHR estão presentes em maior quantidade nas células da granulosa foliculares nos dias 1, 3, 5, 7 e 10 do ciclo estral, e no CL nos primeiros dias após ovulação (42; 3).

Os receptores para LH (LHR) estão presentes nas células da teca e da granulosa dos folículos e no CL dos bovinos Esses receptores desencadeiam a síntese de andrógenos a partir do colesterol e a formação de novos receptores para LH (3; 7).

Os LHR das células da granulosa parecem estar relacionados à dominância folicular. Durante a fase de desvio folicular, o aumento dos receptores para FSH, nas células da granulosa do folículo dominante, e dos receptores para LH, nas células da teca interna, estimula a expressão de receptores de LH nas células da granulosa e, consequentemente, o aumento na produção de estradiol pelo folículo pré-ovulatório (26).

Após o pico de FSH e o declínio dos níveis circulantes deste hormônio, ocorre a atresia dos folículos subordinados recrutados no início da onda de crescimento folicular (43). A partir de então ocorre o fenômeno da divergência ou desvio folicular, definida como o início da mudança nas taxas de crescimento entre o folículo selecionado (dominante - FD) e os demais (subordinados - FS) (24).

Apesar do mecanismo preciso para a seleção do folículo dominante não estar completamente elucidado, sabe-se que o fenômeno do desvio envolve o LH e a expressão de seus receptores pelo maior folículo, bem como os IGFs (25).

Neste momento, o folículo dominante apresenta diâmetro em torno de 8,5 mm em animais *Bos taurus taurus* (44) e de 6,0 mm em *Bos taurus indicus* (23), quando este folículo passa a ser LH dependente, até que ocorra a ovulação ou a atresia (24).

Austin et al. (45) relataram que o futuro folículo dominante produz maiores concentrações de estradiol e possuem baixos níveis de IGFBP comparado aos folículos subordinados. Associado a isto, a seleção folicular está relacionada à queda momentânea da concentração plasmática de FSH, decorrente do *feedback negativo* promovido pelo E_2 proveniente do maior folículo, capaz de manter seu desenvolvimento

apesar da queda na secreção de FSH. A partir deste momento, o desenvolvimento deste FD se torna dependente dos níveis séricos de LH (44; 28).

A expressão do LHR foi observada por meio do PCR em células da granulosa de folículos antrais com 8 mm, obtidos de fêmeas Nelore, exclusivamente após a seleção do FD que ocorre aos 6 mm nesta espécie (46; 23).

Os LHR presentes no CL elevam-se até o 5º dia, permanecendo em concentrações elevadas até os dias 15 e 17. A detecção gênica para o mesmo receptor apresentou comportamento semelhante no decorrer do ciclo estral (47,48).

-FATORES ANGIOGÊNICOS

Durante o ciclo estral, ocorrem mudanças na vascularização do trato reprodutivo quanto ao tamanho e morfologia, as quais desencadeiam alterações funcionais e estruturais (49). O processo de crescimento vascular no organismo é denominado de angiogênese, essencial para nutrição, regulação endócrina da reprodução, crescimento e diferenciação celulares (50; 51).

A circulação sanguínea intra-ovariana e endometrial é caracterizada por redes capilares que permitem a manutenção dos níveis séricos das gonatropinas, fatores de crescimento, de E_2 e da P_4 para as diversas estruturas presentes no decorrer do ciclo estral (52).

A função e a síntese cíclica dos fatores angiogênicos ao longo do tempo e a forma de controle que caracteriza o trato reprodutivo feminino sugerem a existência de uma relação entre a angiogênese e a reprodução. Este fenômeno ocorre por meio dos componentes angiogênicos e anti-angiogênicos de forma parácrina, sendo responsáveis pela neovascularização, proliferação celular, estimulação e inibição do desenvolvimento folicular (53).

O controle da angiogênese é realizado por fatores endógenos moduladores. As famílias dos fatores de crescimento endoteliais vasculares células-específicas (fator de crescimento endotelial vascular – VEGF -, fator de permeabilidade vascular – VPF - e angiopoitinas – 1 e 2) e seus receptores foram detectados no trato reprodutivo feminino, sendo relacionados com a seleção e maturação foliculares, a ovulação e as modificações endometriais. Além de que são mediadores dos hormônios reprodutivos na vascularização endometrial (54).

O VEGF é um fator pró-angiogênico e, juntamente com os seus receptores tirosina kinase (Flk1/KDR – VEGF/R1 e Flt1 – VEGF/R2), estimulam a angiogênese nos folículos e no CL (55).

Os folículos pré-antrais não possuem vascularização própria, portanto dependem da circulação presente no estroma ovariano. Quando o antro é formado, surge uma rede capilar nas camadas interna e externa da teca, que fornecem aos folículos fatores de crescimento, gonadotrofinas, oxigênio e substâncias precursoras esteroidais (56; 51).

Durante o desenvolvimento folicular, há formação de uma rede vascular na camada das células tecais e, no momento da ovulação, observa-se a separação das camadas formadas pelas células da teca e da granulosa, concomitante ao aumento da angiogênese (53).

Em humanos, a hipóxia estimula a expressão do VEGF, do VPF e da angiopoetina 2. Observa-se uma intensa imunomarcação de VEGF na camada das células da teca de folículos saudáveis e a mínima marcação nas células da granulosa. Há grande expressão gênica de VEGF em CL jovens de ratos, enquanto a angipoetina 1 surge quando o CL está maduro, contribuindo com a sua manutenção. A angiopoetina 2 possui os mesmos receptores que a angiopoetina 1 no ovário, no entanto, sua expressão é maior durante a fase inicial de maturação do CL e exerce ação sinérgica ao VEGF, os quais antecedem a função exercida pela angipoetina 1 (53; 54).

As maiores atividades angiogênicas foram observadas na porção apical da camada capilar interna de folículos com tamanho mediano e nas porções média e basal das camadas capilares internas de folículos dominantes de bovinos. A degeneração capilar foi observada principalmente na camada vascular de folículos pequenos e de folículos antrais médios (57).

As células da teca e da granulosa dos folículos pré-ovulatórios, e as células lúteas grandes e pequenas, apresentam grande expressão gênica de VEGF em ratos e, VEGFA em bovinos (50,58). A angipoetina 2 possui ação sinérgica ao VEGFA, assim como com o VEGF, que apresenta grande expressão gênica nas células tecais e na zona pelúcida de folículos pré-ovulatórios (57; 59).

Entretanto, em folículos atrésicos de ratos não se observou a expressão gênica de VEGF, mas foram detectados genes codificadores para angipoetina 2 na célula da granulosa, assim como em corpos lúteos velhos (53; 54), uma vez que as ações parácrina e autócrina do VEGF e do VEGFA impedem a apoptose das células da

granulosa, que age como um agente citoprotetor para as células endoteliais por induzir a formação de proteínas antiapoptóticas em ratos (51) e em bovios (50).

O VEGF tem sua expressão estimulada pelos IGFs, TGFs, EGFs e inter-leucinas (ILs), bem como pelo óxido nítrico, que por sua vez, estimula a esteroidogenese e a proliferação celular (51).

Ao longo do ciclo, o útero sofre diversas modificações. A expressão gênica de VEGF é maior no epitélio glandular e aumenta rapidamente a partir de estímulos realizados pelo estradiol (54).

-ESTRÓGENOS E RECEPTORES DE ESTRÓGENO

Entre os estrógenos, o 17β-estradiol é o de maior importância para a reprodução e predomina em animais domésticos não gestantes e gestantes. O estrógeno é produzido pelo córtex adrenal e pelas células da granulosa de folículos ovarianos, principalmente após a fase de desvio folicular, por meio do processo catalítico de aromatização de andrógenos pela enzima aromatase citocromo P450 (60; 61).

A dinâmica folicular de bovinos ao longo do ciclo estral acarreta um perfil oscilatório de produção de E_2, devido ao crescimento e atresia de diversos folículos em cada uma das ondas foliculares, até a ovulação (24). O FD é considerado o principal responsável pela produção total de E_2. Este é liberado de maneira pulsátil e atinge a concentração plasmática máxima momentos antes da ovulação (44).

Sinergicamente com a P_4 agem para possibilitar o crescimento de glândulas uterinas e mamárias. O período de estro é caracterizado por elevados níveis de estrógenos, que estimulam o crescimento uterino por meio da interação com seus receptores e, o consequente aumento dos processos sintéticos dentro das células. Outros efeitos incluem o desenvolvimento físico das características sexuais secundárias femininas, o controle da liberação de hormônios hipofisários, potencialização dos efeitos da OT e PGFs sobre as contrações uterinas e auxílio no processo de implantação (3).

O estrógeno estimula o crescimento e a secreção das glândulas endometriais momentos antes da implantação necessários para manutenção do zigoto, o crescimento dos ductos nas glândulas mamárias quando atua sinergicamente com a P_4, atividade secretora no oviduto (favorece a sobrevivência do oócito e espermatozóide), inicia a receptividade sexual, regula a secreção de gonadotrofinas (pico de LH pela hipófise anterior para ovulação) (7).

Além disso, o estrógeno é epiteliotrófico, promove anabolismo das proteínas e relaciona-se com a expressão dos receptores de OT no endométrio, os quais constituem o complexo hormônio receptor com a OT secretada pelo CL, que estimulam a liberação de $PGF_{2\alpha}$ pelo útero gravídico ou não gravídico, desencadeando em ambos os casos a regressão do CL (7).

Quando produzido na presença do FD, é responsável pelo *feedback* negativo ao FSH e pela retroalimentação positiva ao LH que, na ausência de P_4, induz o pico pré-ovulatório de LH e também o comportamento de estro (62; 63).

As altas concentrações plasmáticas de E_2 e a ausência de P_4 sinalizam a maturação folicular, que desencadeia a expressão do comportamento de estro e o pico pré-ovulatório de LH, essencial para a ovulação do FD (64; 29).

Além de participar na regulação da secreção do FSH, o E_2 está relacionado com importantes funções autócrinas e parácrinas, tais como a proliferação celular (65), o aumento da atividade da enzima aromatase citocromo P450, o aumento na expressão dos LHR e FSHR nas células da granulosa de bovinos (66), e a maior sensibilidade do folículo dominante aos hormônios FSH e LH (67).

Foi observado que durante o início da fase luteínica, a concentração de P_4 é baixa e a de E_2 é alta, resultando em maior frequência dos pulsos de LH. Durante o terço médio da fase luteínica, entre o 11º e 13º dias do ciclo estral, período em que a concentração de P_4 é alta e a de E_2 é baixa, foi observada menor frequência dos pulsos de LH em relação ao início ou ao final da fase luteínica (68).

Após a luteólise, há diminuição dos níveis de P_4 e elevação na concentração e frequência dos pulsos de LH. Diversos estudos demonstraram que o padrão de secreção da P_4 e do E_2 está inversamente relacionado, e é determinante no controle da frequência dos pulsos de LH (68; 69).

No entanto, o E_2 isolodamente não é capaz de ativar a resposta do endométrio e ocasionar a lutólise a partir das injeções de OT em vacas e ovelhas ovariectomizadas (5), devido ao efeito inibitório do E_2 nos receptores de OT na ausência da sensibilização prévia pela P_4 (70; 71)

O início da luteólise é determinado pela prévia sensibilização endometrial pela P_4 oriunda do CL ao longo do ciclo estral, que associado a crescente produção de E_2 pelos folículos, causam uma grande estimulação na produção de receptores de OT e produção de $PGF_{2\alpha}$ pelo útero em bovinos e ovinos (72; 73).

A função do estrógeno é desencadeada no organismo em tipos celulares específicos do ovário e do útero após a formação do complexo hormônio estrógeno-receptor de estrógeno (E_2/ER), promovendo a ativação genômica e proteica, as quais são reguladas basicamente pelo E_2 e pela P_4 (48; 74).

Atualmente, foram relatados no endométrio e CL dois tipos de ER com importância para a regulação da função reprodutiva de bovinos, α (EαR) (75) e β (EβR) (76).

Os receptores de E_2 possuem maior expressão no endométrio durante os dias 0 e 5 do ciclo, mediado pelos altos níveis plasmáticos do E_2 proveniente do FD, associado às baixas concentrações séricas de P_4 após a luteólise (74).

Após a ovulação, a P_4 proveniente do CL recém formado, gradativamente promove a diminuição das concentrações endometriais dos ER que alcançam os seus menores valores por volta do 17^o dia do ciclo estral (diestro) (77).

Em ratos o EαR regula a diferenciação, a proliferação celular e possui maior expressão no tecido endometrial (75). Em bovinos, o EαR teve maior expressão durante a fase luteal inicial e decresceu significativamente durante a fase luteal tardia (48).

Os EβR na maioria das espécies estão presentes em maior concentração no tecido ovárico e estão intimamente relacionados com a liberação de GnRH (78) e, em bovinos, não varia ao longo do ciclo estral (48). Em humanos, há relatos que as células endometriais estromais possuem maior concentração de EβR, os quais apresentam maior afinidade por E_2 e estriol (79).

-PROGESTÁGENOS E RECEPTORES DE PROGESTERONA

A P_4 é responsável pelo crescimento das glândulas endometriais, crescimento lóbulo-alveolar das glândulas mamárias, atividade secretora do oviduto e das glândulas endometriais responsável pela nutrição do zigoto, evita a contratilidade do útero durante a gestação e regula a secreção de gonadotrofinas. A função luteal determina a duração fisiológica do ciclo estral e garante a manutenção da prenhez (7).

A concentração plasmática de P_4 aumenta progressivamente a partir do segundo dia após a ovulação até atingir seu platô por volta do oitavo dia do ciclo, o qual é mantido até o dia quinze, quando começa a declinar até atingir níveis basais por volta dos dias 15 a 18, caracterizando a luteólise (37).

Há relatos de que o LH estimula o CL a secretar P_4 após a ligação com seu receptor e ativação da adenil ciclase, a qual sintetiza AMPc, um mensageiro intracelular

responsável por ativar enzimas envolvidas na síntese de P_4 (80). A P_4 inibe a apoptose nas células luteais pelo mecanismo dependente dos receptores de progesterona (PR), visto que a luteólise estrutural é um pré-requisito para o início da apoptose em células endoteliais do CL bovino (81).

Existem duas formas de PR: *isoformas* A (PAR) e B (PBR). O PAR está intimamente relacionado ao desempenho e as patologias reprodutivas e, sua expressão tem correlação negativa com o PBR na espécie humana (82; 83; 84). Ambas *isoformas* estão presentes no trato reprodutivo feminino durante o ciclo e possuem atividades transcricionais diferentes, sendo que a *isoforma* A parece realizar papel modulador sob a expressão dos ER, PR e receptor de ocitocina (OTR) no sistema reprodutivo mais importante que o PBR (85).

No endométrio e na glândula mamária, o estrógeno sensibiliza as células para a ação da P_4, promovendo a expressão do PR (74; 86). No dia 13 do ciclo estral de vacas Nelore, a concentração proteica de PR no endométrio foi menor comparada aos demais dias do ciclo, ainda quando as concentrações plasmáticas de P_4 oriundas do CL permaceceram elevadas (74).

Estes receptores estão expressos nos folículos durante todo o ciclo estral de bovinos. No fim do ciclo estral, as baixas concentrações plasmáticas de P_4, associada as concentrações plasmáticas crescentes de E_2 oriundas do FD, ocasiona o aumento dos OTR, redução dos PR e ER no endométrio (87).

Aparentemente no CL, a expressão do PR é coordenada pela própria P_4 e o pico de LH induz a expressão destes RP. Em bovinos, estão presentes no CL, nas células lúteas grandes e pequenas de vacas gestantes e não-gestantes após 48 horas da ovulação, no entanto, em menores quantidades quando comparadas as concentrações encontradas em folículos (88).

O uso da técnica de RT-PCR determinou a maior expressão de RNAm para o PR no tecido luteal bovino durante o estágio inicial. Houve menor expressão destes durante a fase luteal tardia e após a regressão do CL (48). Porém, os níveis de RNAm mantiveram-se durante a regressão luteal enquanto as células PR positivas na técnica de imunocitoquímica declinaram em primatas (89).

-OCITOCINA E RECEPTORES DE OCITOCINA

Outro hormônio produzido pelo CL formado após 10 a 15 dias da ovulação é a OT, um hormônio polipeptídeo produzido também pelos neurônios hipotalâmicos,

armazenado e liberado pela neurohipófise, relacionada às contrações uterinas peri-parto e pela ejeção do leite durante a amamentação. Possivelmente, suas funções relacionam-se com a luteólise por meio das PGFs (7; 48).

A expressão dos OTR no endométrio de bovinos é regulada pelo próprio hormônio OT, pelas concentrações plasmáticas de E_2 e P_4, e seus respectivos receptores (90). As elevadas concentrações de P_4 proveniente do CL na metade da fase luteal, quando há baixo nível plasmático de E_2, acarretam gradativa redução das concentrações endometriais dos ER que alcançam menores valores por volta do 17^o dia do ciclo estral em animais de origem taurina e zebuína (90; 74).

Em animais *Bos taurus taurus*, a P_4 possui efeito dominante sob o útero, pois inibe a síntese de OTR na primeira metade do ciclo estral (90). Na metade da fase luteal, há diminuição dos PR, o que permite a ação do estrógeno produzido pelo folículo dominante e estimula a hipófise e o CL a secretar OT para ligar-se aos seus receptores endometriais. A formação deste complexo hormônio-receptor desencadeia a liberação de $PGF_{2\alpha}$ pelo útero, indispensável para o processo de luteólise (91).

Momentos antes da ovulação, as altas concentrações de E_2 secretadas pelo folículo pré-ovulatório resultam no decréscimo dos OTR, e posteriormente a secreção de P_4 pelo CL, insensibiliza o endométrio à OT durante os primeiros dias do próximo ciclo estral (92).

Desta forma, os OTR variam pouco durante o ciclo estral, exceto pelo período compreendido entre os dias 15 e 17, quando estão presentes em maior concentração, evento relacionado com a luteólise (90).

-PROSTAGLANDINA

As PGFs são substâncias orgânicas derivadas do ácido aracdônico, e estão presentes em diversos tecidos e situações biológicas. Especificamente relacionadas com a reprodução, de acordo com sua estrutura e função podem ser divididas em: E e F (7). Em geral, provocam contrações ou relaxamento das células musculares lisas em diversos órgãos. A série F, especificamente a $F_{2\alpha}$, produzida pelo endométrio, é a de maior importância para a reprodução em ruminantes e está relacionada com o processo da luteólise. A regressão funcional precede a regressão morfológica do CL (38).

Com o adjunto de fórmulas sintéticas, as aplicações exógenas de PGFs permitiram a aceleração da involução uterina, a modulação da defesa uterina, e a utilização em protocolos de sincronização do estro (93).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ciclo estral da fêmea bovina e a dinâmica do desenvolvimento folicular são regulados de maneira endócrina, parácrina e autócrina, por fatores angiogênicos, de crescimento, pelas gonadotrofinas, pelos hormônios esteróides e seus receptores. Apesar do grande número de estudos, ainda são desconhecidos fenômenos que interferem na eficiência reprodutiva dos animais.

O adjunto das técnicas que envolvem a biologia molecular e a compreensão dos mecanismos reguladores do ciclo estral normal permitem o esclarecimento que determinam alterações no ciclo estral bovino, como por exemplo o anestro pós-parto, a baixa eficiência reprodutiva relacionada ao uso da primeira ovulação pós-parto e a luteólise prematura do primeiro corpo lúteo, que não permite que ocorra o reconhecimento materno da gestação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Botucatu; 2008 [cited 2008 Dez 05]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/estatística/indicadores/agropecuária/produçãoagropecuária>.

(2) Anualpec. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2004. 369p.

(3) Hafez B, Hafez ESE. Reprodução Animal. 7.ed. São Paulo: Manole, 2000.

(4) Cunnigham JG. Tratado de Fisiologia Veterinária. 3ª Ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan. 2008, 579p.

(5) Mann GE, Payne JH, Lamming GE. Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin F2α secretion by the bovine and ovine uterus in vivo. Dom. Anim. Endocrin. 2001, 21: 127–141.

(6) Berisha B, Pfaffl MW, Schams D. Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrous cycle and pregnancy. Endocrine, 2002, 17: 207–214.

(7) Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. 2ª ed. Washington: Current Conceptions, IC, 2003, 373p.

(8) Ginther OJ, Kastelick JP, Knopf L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. Anim. Reprod. Sci., 1989. 20: 187-200.

(9) Barros CM, Figueiredo RA, Papa FO, Rocha G. Follicular growth in Nelore cows (*Bos taurus indicus*) $PGF_{2\alpha}$ administration. J. Anim. Sci., 1993. 71: 216.

(10) Wiltbank MC, Gümen A, Sartori R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. Theriogenology, 2002. 57: 21-52.

(11) Buratini Jr. J, Teixeira ABC, Costa I, Glapinski VF, Pinto MG, Giometti IC, Barros CM, Cao M, Nicola ES, Price CA. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. Reproduction, 2005. 130: 343-350.

(12) Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cel interactions during follicle development in mammals. Anim. Reprod. Sci., 2004. 82-83: 431-446.

(13) Albertini DF, Combelles CMH, Benecchi E, Carabatsos M J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. Reproduction, 2001. 121: 647-653.

(14) Shimasaki S, Moore RK, Erickson GF, Otsuka F. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. Reproduction, 2003. 61: 323-337.

(15) Parrott, JA, Skinner MK. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell. Rec. Mol. Reprod. Develop., 2000. 55: 55-64.

(16) Otsuka F, Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein-15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. Proc. Nat. Academ. Sci. Unit. Stat. Am., 2002. 89: 8060-8065.

(17) Vitt UA, Mcgee EA, Hayashi M, Hsueh AJW. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. Endocrin., 2000. 141: 3814-3820.

(18) Joyce IM, Clarck AT, Pendola FL, Eppig JJ. Comparison of recombinant growth factor-9 and oocyte regulation of Kit ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. Biol. Reprod., 2000. 63: 1669-1675.

(19) Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. Reprod. Sup. 2003. 61: 71-90.

(20) Silva JM, Price CA. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. J. Endocrin., 2002. 174: 499-507.

(21) Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. Molecular and Cellular Endocrinology, 2001. 175: 123-130.

(22) Fortune JE, Quirk SM. Regulation os steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. J. Anim. Sci., 1998. 66: 1-8.

(23) Sartorelli ES, Carvalho LM, Bergfelt DR, Ginther OJ, Barros CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. Theriogenology, 2005. 63: 2382-2394.

(24) Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM. Selection of the dominant follicle in cattle. Biol. Reprod., 1996. 55: 1187-1194.

(25) Fortune JE, RIVERA GM, YANG MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironmet in selection of the dominant follicle. Anim. Reprod. Sci., 2004. 82-83: 109-126.

(26) Buratini Jr. J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. Rev. Brasil. Reprod. Anim., 2007. 31: 190-196.

(27) Spicer LJ. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. Biol. Reprod., 2004. 70: 1223-1230.

(28) Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO, Turzillo AM. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. Biol. Reprod., 2001. 65: 648-654.

(29) Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ, Wiltbank MC. Regulation of progesterone and prostaglandin F2α production in the CL. Mol. Cell. Endocrin., 2002. 191: 65-68.

(30) Giometti IC, Castilho ACS, Sá Filho OG, Papa PC, Buratini Jr J. Controle local e endócrino do desenvolvimento e da regressão do corpo lúteo bovino. Ver. Bras. Reprod. Anim., 2009. 33: 34-52.

(31) Niswender GD. Molecular control of luteal secretion of progesterone. Reproduction, 2002. 123: 333–339.

(32) Mccracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. Physiol. Rev., 199. 79: 263-323.

(33) Bertan CM. Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de $PGF_{2\alpha}$ no endométrio de fêmeas bovinas. 2004. 180p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

(34) Wathes DC, Lamming GE. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. J. Reprod. Fert., 1995. 49: 53-57.

(35) Krigsfeld LJ, Silver R. The regulation of neuroendocrine function: timing is everything. Horm. Beh., 2006. 49: 557–574.

(36) Schillo KK. Reproductive Physiology of Mammals: from farm to field and beyond. 1ª ed. Delmar, Cengage Learning, Clifton Park, NY. 2009, 462p.

(37) Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JMP. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. Theriogenology, 1997. 47: 1489-1505.

(38) Viana JHM, Ferreira AM, Sá WF, Fernandes CAC. Regressão luteal e dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida por cloprostenol em vacas da raça. Gir. Arq. Brasil. Med. Vet. Zoot., 1999. 51: 257-262.

(39) Gimenes LU, Sá Filho MF, Madureira EH, Trinca LA, Barros CM, Baruselli PS. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos indicus*). Act. Scie. Vet., 2005. 33: 210.

(40) Mowa CN, Iwanga T. Differential distribution of estrogen receptor – α, β m RNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization. J. Endocrinol., 2000. 165: 59-66.

(41) Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. Immunol. Rev., 2005. 205: 158–169.

(42) Rajapaksha WRAKS, Robertsonb L, O'shaughnessy PJ. Expression of follicle-stimulating hormone-receptor RNAm alternate transcripts in bovine granulosa cells during luteinization in vivo and in vitro. Mol. Cell. Endocrinol., 1996. 120: 25-30.

(43) Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Wiltbank MC. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. Theriogenology, 1997. 48: 75-87.

(44) Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. Selection of dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. Theriogenology, 1999. 52: 1079-1093.

(45) Austin EJ, Mihm M, Evans ACO, Knight PG, Ireland JLH, Ireland JJ, Roche JF. Alterations in intrafolicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first wave of the bovine estrous cycle. Biol. Reprod., 2001. 64: 839-848.

(46) Nogueira MFG, Pinto MLG, Rainho CA, Avellar MCW, Price CA, Buratini JRJ, Barros CM. Expressão das isoformas do gene codificador do receptor de LH em células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos. Act. Scie. Vet., 2005 (resumo aceito).

(47) Okuda K, Uenoyama Y, Naito C, Sakabe Y, Kawate N. Luteinizing hormone receptors in the bovine corpus luteum during the oestrous cycle and pregnacy. Reprod. Fert. Develop., 1999. 11: 147-151.

(48) Schams D, Berisha B. Regulation of corpus luteum function in cattle – an overview. Reprod. Dom. Anim., 2004. 39: 241-251.

(49) Nottola SA, Macchiarelli G, Motta PM. The angioarchitecture of estrous, pseudopregnant and pregnant rabbit ovary as seen by scanning electronmicroscopy of vascular corrosion casts. Cell Tis. Res., 1997. 288: 353–363.

(50) Greenaway J, Gentry PA, Feigi J, Lamarre J, Petrik JJ. Thrombospondin and vascular endothelial growth factor are cyclically expressed in an inverse pattern during bovine ovarian follicle development. Biol. Reprod., 2005. 72: 1071-1078.

(51) Abramovich D, Parborell F, Tesone M. Effect of a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitory treatment on the folliculogenesis and ovarian apoptosis in gonadotropin-treated prepubertal rats. Biol. Reprod., 2006. 75: 434-441.

(52) Danforth DR, Arbogast LK, Ghosh S, Dickerman A, Rofagha R, Friedman CI. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. Biol. Reprod., 2003. 68: 1736–1741.

(53) Fraser HM, Lunn SF. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. Brit. Med. Bul., 2000. 56: 787-797.

(54) Jafe RB. Importance of Angiogenesis in Reproductive Physiology. Sem. Perinat., 2000. 24: 79-81.

(55) Shimizu T, JIANG JY, SASADA H, SATO E. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. Biol. Reprod., 2002. 67: 1846–1852.

(56) Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molkness TA, Xu F, Hazzard TM. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. Arch. Med. Res., 2001. 32: 567-575.

(57) Jiang JY, Macchiarelli G, Tsang BK, Sato E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. Reproduction, 2003. 125: 211–223.

(58) Kobayashi S, Berisha B, Amselgruber WM, Schams D, Miyamoto A. Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin $F_{2\alpha}$. J. Endocrinol., 2001. 170: 369-380.

(59) Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Kayisly UA, Arici A, Demir R. Localization of vascular endothelial growth factor in the zona pellucid of developing ovarian follicles in the rat: a possible role in destiny of follicles. Histochem. Cell Biol., 2003. 120: 383–390.

(60) Conley A, Hinshelwood M. Mammalian aromatases. Reproduction, 2001. 21: 685-695.

(61) Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. Intraovarian actions of oestrogen. Reproduction, 2001. 122: 215-36.

(62) Nett TM, Turzillo AM, Baratta M, Rispoli L. A. Pituitary effects of steroids hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. Dom. Anim. Endocrinol., 2002. 23: 33-42.

(63) Vasconcelos JLM, Santos RM, Perez GC. Estratégias para aumentar a eficiência reprodutiva em bovinos de corte. Botucatu, 2008 [cited 2008 Jan 22]. Available from: http://www.agripoint.com.br/cursos.

(64) Taya K, Kaneko H, Takedomi T, Kishi H, Watanabe G. Role of inhibin in the regulation of FSH secretion and folliculogenesis in cows. Anim. Reprod. Sci., 1996. 42: 563-70.

(65) Bley MA, Saragüeta PE, Barañao JL. Concerted stimulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis by sex steroids and follicle-stimulating hormone. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1997. 62: 11-19.

(66) Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspainer R. Expression and localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (FGF-2) during the final growth of bovine ovarian follicles. J. Endocrinol., 2000. 167: 371-382.

(67) Ginther, OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. Follicle selection in monovular species. Biol. Reprod., 2001. 65: 638-647.

(68) Cupp AS, Stumpf TT, Kojima FN, Werth LA, Wolfe MW, Boberson MS, Kittok RJ, Kinder JE. Secretion of gonadotropins changes during the luteal phase of the bovine oestrous cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or 17β-oestradiol. Anim. Reprod. Sci., 1995. 37: 109-119.

(69) Bergfeld EG, Kojima FN, Wehrman ME, Cupp AS, Mariscal VE, Sanchez TE, Kittok R, Garcia-Windr M, Kinder JE. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17b-estradiol in cows is related to concentration of progesterone in circulation when the progesterone comes from either an endogenous or exogenous source. Anim. Reprod. Sci., 1995. 37: 257.

(70) Vallet JL, Lamming GE, Batten M. Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. J. Reprod. Fert., 1990. 90: 625-634.

(71) Zhang J, Weston PG, Hixon JE. Role of progesterone and oestradiol in the regulation of uterine oxytocin receptors in ewe. J. Reprod. Fert.ity, 1992. 94: 395-404.

(72) Lau TM, Kerton DJ, Gow CB, Fairclough RJ. Role of progesterone in the control of endometrial oxytocin receptors at luteolysis in sheep. J. Reprod. Fert., 1993. 9: 229-233.

(73) Walker DL, Weston PG, Hixon JE. Influence of estradiol and progesterone withdrawal on the secretion of and the temporal correlation between pulses of oxytocin and prostaglandin F2α in ewes. Biol. Reprod., 1997. 56: 1228-38.

(74) Martin I, Torres Neto R, Oba E, Buratini Jr. J, Binelli M, Laufer-Amorim R, FERREIRA JCP. Immunohistochemical detection of receptors for oestrogen and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrus cycle in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows. Reprod. Dom. Anim., 2008. 43: 415-421.

(75) Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Van Der Saag PT, Van Der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β. Endocrinology, 1998. 139: 4252-4263.

(76) Mosselman S, Polman J, Dijkma S. EβR: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. Febs Lett., 1996. 392: 49-53.

(77) Boos A, Meyer W, Schwarz R, Grunert E. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. Anim. Reprod. Sci., 1996. 44: 11-21.

(78) Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-α (ERα) and estrogen receptor-ß (ERß) messenger ribonucleic acid in the wild-type and erα-knockout mouse. Endocrinology, 1997. 138: 4613-4621.

(79) Lima SRS. Ginecomastia. 2008. 56p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Portugal.

(80) Gudermann T, Birnbaumer M, Birnbaumer L. Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca^{2+} mobilization. J. Biol. Chem., 1992. 267: 4479-4488.

(81) Myamoto A, Shirasuna K, Sasahara K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: impacto of angiogenic and vasoactive factors. Dom. Anim. Endocrinol., 2009. 37: 159-169.

(82) Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takamoto GS, Horwitz KB. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. Mol. Endocrinol., 1994. 8: 1347-1360.

(83) Pieber D, Allport VC, Hills F, Johnson M, Bennett PR. Interactions between progesterone receptor isoformas in myometrial cells in human labour. Mol. Hum. Reprod., 2001. 7: 875-879.

(84) NUNES, C. B. Estudo imunoistoquímico comparativo entre seis anticorpos anti-HER2 em arrays de carcinomas mamários: correlação com hibridação in situ cromogênica e avaliação interobservador. Belo Horizonte, 2007. 97p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

(85) Fujimoto J, Ichigo S, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T. Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B RNAms in secondary spreading of gynecologic cancers. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1997. 62: 449-454.

(86) Clarke CL, Sougtherland RL. Progestin regulation of cellular proliferation. Endoc. Review, 1990. 11: 266-301.

(87) Cassar CA, Dow MPD, Pursley JR, Smith GW. Effect of the preovulatory LH surge on bovine follicular progesterone receptor RNAm expression. Domestic Animal Endocrinology, 2002. 22: 179-187.

(88) Van Den Broeck W, D'haeselleer M, Coryn M, Simoens P. Cell-specific distribuition of progesterone receptors in the bovine ovary. Reprod. Dom. Anim., 2002. 37: 164-170.

(89) Duffy DM, Stouffer RL. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the primate corpus luteum during the menstrual cycle: possible regulation by progesterone. Endocrinology, 1995. 136: 1869-1876.

(90) Mann GE, Lamming GE. Timing of prostaglandin F2α release episodes and oxytocin receptor development during luteolysis in the cow. Anim. Reprod. Sci., 2006. 93: 328–336.

(91) Razandi M, Pedran A, Greene GL, Levin ER. Cell membrane and nuclear estrogen recptors (Ers) originate from a single transcript: studies of EαR and Erα expressed in Chinesse Hamster ovary cells. Mol. Endocrinol., 1999. 13: 307-319.

(92) Lamming GE, Mann GE. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F2α production in cows by progesterone and oestradiol. J. Reprod. Fert, 1995. 103: 69-73.

(93) Lewis GS. Steroidal regulation of immune defenses. Anim. Reprod. Sci., 2004. 82: 281-294.