

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

MÁRCIO SÉRGIO BISSOLI VARGAS

**INDUÇÃO DA LUTEÓLISE EM VACAS SUPEROVULADAS:
ASPECTOS ENDÓCRINOS E ULTRASSONOGRÁFICOS**

ALEGRE – ES

2010

MÁRCIO SÉRGIO BISSOLI VARGAS

**INDUÇÃO DA LUTEÓLISE EM VACAS SUPEROVULADAS:
ASPECTOS ENDÓCRINOS E ULTRASSONOGRÁFICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Biotécnicas e Fisiopatologia da Reprodução.

Orientador: Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana

ALEGRE – ES

2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

V297i Vargas, Márcio Sérgio Bissoli, 1980-
Indução da luteólise em vacas superovuladas : aspectos endócrinos e ultrassonográficos / Márcio Sérgio Bissoli Vargas. – 2010.
88 f. : il.

Orientador: João Henrique Moreira Viana.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo,
Centro de Ciências Agrárias.

1. Progesterona. 2. Prostaglandina. 3. Corpo lúteo – Aspectos endócrinos. 4. Corpo lúteo – Ultrassonografia. 4. Vaca – Reprodução. 5. Bovino. I. Viana, João Henrique Moreira. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 619

MÁRCIO SÉRGIO BISSOLI VARGAS

INDUÇÃO DA LUTEÓLISE EM VACAS SUPEROVULADAS:
ASPECTOS ENDÓCRINOS E ULTRASSONOGRÁFICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Biotécnicas e Fisiopatologia da Reprodução.

Aprovada em 16 de agosto de 2010.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Marcelo Rezende Luz
Universidade Federal do Espírito Santo

Dr. Miller Pereira Palhão
Embrapa Gado de Leite

À minha esposa Cíntya e minha filha Amanda, por me apoiarem incondicionalmente, suportarem a distância e o pouco tempo para dedicar o amor e a atenção que vocês merecem.

Aos meus pais, Lhilton e Maria José, pelo amor e carinho, pelos ensinamentos, pela total confiança nas minhas escolhas.

Ao meu irmão Júnior, que foi fundamental para a realização deste trabalho.

Obrigado pelo companheirismo, dedicação e apoio.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar A DEUS, O Grande Arquiteto do Universo, pois sem ELE nenhuma vitória em minha vida seria possível.

Ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de realizar o Programa de Pós-Graduação.

À Prefeitura Municipal de Venda Nova do Imigrante - ES por ter me permitido conciliar o trabalho com a realização deste curso.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (EMBRAPA Gado de Leite), por fornecer toda estrutura necessária para realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana, por ter acreditado no meu potencial, pela dedicação e profissionalismo com que executou o papel de orientador, contribuindo de forma imprescindível para a qualidade final desta dissertação.

Ao Professor Dr. Marcelo Rezende Luz, por participar da banca examinadora, por ter me apoiado e incentivado durante o mestrado.

Ao Dr. Miller Pereira Palhão, por participar da banca examinadora, e contribuir com a qualidade final deste trabalho, com seus conselhos, dicas e palavras de incentivo.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do CCA – UFES pelos ensinamentos transmitidos.

Aos técnicos do INCAPER, Romeu (In Memoriam) e Bevaldo pelos ensinamentos durante os anos de trabalho juntos e pelo incentivo a buscar mais conhecimentos sobre o universo da pecuária.

Ao técnico da Embrapa Gado de Leite Gilmar Pereira Alvim (Del), pelos conselhos, amizade, dedicação e ajuda imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao Médico Veterinário Dr. André Penido de Oliveira, pelos ensinamentos, contribuição com os experimentos e acima de tudo pela amizade, incentivo e companheirismo durante a realização deste trabalho.

A todos os funcionários e estagiários da Embrapa Gado de Leite, que não mediram esforços para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos Médicos Veterinários Dr. José Maurício Franklin Amaral e Dr^a Ana Katyucha Moreira Viana, por terem possibilitado a avaliação das doadoras fora da Embrapa e pela confiança depositada em meu trabalho.

A uma pessoa que sempre me tratou como um filho. Luzia, esta vitória também é sua...

Ao meu irmão Ney e minha cunhada Ana, pelos incentivos, sempre importantes para mim.

A todos os companheiros de trabalho da Cooperativa de Laticínios Selita, que muito contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

À Fabiana (sempre uma voz amiga, mesmo distante), pelos conselhos, dicas e ajuda fundamental na formatação desta dissertação.

Ao senhor Marcos Henrique Pereira Alves (Brahman Transmontana), que cedeu seus animais para realização de parte dos experimentos, e seu gerente o Senhor Luis Roberto (Betinho), que auxiliou no manejo dos animais.

Aos animais que participaram deste estudo, o meu profundo respeito e admiração.

A meu sogro José Pedro e minha sogra Sônia, pelo apoio e por suas orações.

A todos os meus familiares, avós, tios, primos e primas e a todos os amigos que sempre estiveram presentes na minha vida.

A todos que, em algum momento e de alguma forma, tenham contribuído com esta empreitada.

MUITO OBRIGADO!!!!!!

"O futuro tem muitos nomes. Para os fracos, é o inatingível. Para os temerosos, o desconhecido. Para os valentes, a oportunidade."

Victor Hugo

RESUMO

Vargas, Márcio Sérgio Bissoli. **Indução da luteólise em vacas superovuladas: Aspectos endócrinos e ultrassonográficos.** Orientador: João Henrique Moreira Viana. Alegre – ES, Universidade Federal do Espírito Santo, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias - linha de pesquisa em Biotécnicas e Fisiopatologia da Reprodução).

Palavras Chave: Superovulação, prostaglandina, progesterona, corpo lúteo, bovinos

Objetivou-se neste trabalho comparar a eficiência da indução da luteólise em diferentes momentos após a coleta de embriões, e avaliar a regressão morfológica e funcional em animais superovulados e não superovulados. No primeiro estudo, foi avaliado o momento de aplicação do luteolítico (dia da coleta dos embriões – D7 ou três dias após – D10). Vacas da raça Holandesa (N=40) foram superovuladas pela aplicação de 400 UI de FSH (Pluset[®]) em doses decrescentes e, após a coleta dos embriões, distribuídas aleatoriamente em dois grupos, que receberam uma aplicação IM de 0,5mg de análogo de PGF_{2α} (Ciosin[®]) no D7 ou no D10, respectivamente. A luteólise foi monitorada pela concentração plasmática de progesterona analisada por radioimunoensaio em fase sólida, e os valores obtidos comparados por análise de variância. Nas vacas tratadas no D10, ocorreu redução da concentração de progesterona (P<0,05). No grupo tratado no D7, uma parcela dos animais não apresentou redução na concentração plasmática de progesterona a valores abaixo de 1ng/mL (P<0,05). No experimento 2 foi avaliada a luteólise morfológica e funcional em doadoras superovuladas. Vacas da raça Holandesa (N=03) e da raça Brahman (N=03) (Grupo Tratadas – GT) foram superovuladas pela aplicação de 400 UI de FSH (Pluset[®]) em doses decrescentes e, três dias após a coleta dos embriões (D10), receberam uma aplicação de 0,5mg de cloprostenol sódico (Ciosin[®]). Vacas mestiças (Grupo Controle – GC) (N=8) foram sincronizadas e receberam a aplicação de luteolítico no momento do ciclo semelhante (D10). A luteólise foi monitorada pela concentração plasmática de progesterona e LH e pelo acompanhamento ultrassonográfico da regressão luteal com aparelho de ultrassonografia (Águila Vet[®]) equipado com probe de 8,0 MHz. Os valores de concentração de P4, LH, tamanho

médio dos corpos lúteos e área luteal total foram avaliados por análise de variância e diferenças entre médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A concentração de progesterona em ambos os grupos regrediu a valores abaixo de 1ng/mL ($P < 0,05$). A concentração de LH apresentou elevação de seus valores séricos em ambos os grupos. O tamanho médio luteal e a área luteal total apresentaram redução em ambos os grupos. Conclui-se que: a indução da luteólise é mais eficiente com a aplicação de luteolítico no D10; o padrão de regressão morfológica e funcional na luteólise induzida em animais superovulados é semelhante a animais não superovulados; o maior volume de tecido luteal e as conseqüentes elevadas concentrações de progesterona podem retardar o restabelecimento do padrão de liberação de LH e manifestações de estro.

ABSTRACT

Vargas, Márcio Sérgio Bissoli. **Induction of luteolysis in superovulated cows: Endocrine and ultrasonographic aspects** . Advisor: João Henrique Moreira Viana. Alegre - ES, Universidade Federal do Espírito Santo, 2010. Thesis (Master Of Science – Biotécnicas e Fisiopatologia da Reprodução).

Keywords: Superovulation, prostaglandin, progesterone, corpus luteum, bovine.

The objectives of this study were to compare the efficiency of luteolysis induction at different times after embryo flushing and to evaluate corpora lutea morphological and functional regression in superovulated and non-superovulated animals. In the first study, we evaluated the moment of luteolysis induction (day embryo flushing – D7 or three days later – 10). Holstein cows (N = 40) were superovulated with 400 IU of FSH (Pluset®) in decreasing doses, and after embryo flushing were randomly allocated into two groups which received 0.5 mg IM cloprostenol of PGF_{2α} analogous (Ciosin®) on D7 or D10, respectively. The luteolysis was monitored by plasmatic progesterone, measured by solid phase radioimmunoassay, and the values were compared by analysis of variance. In cows treated at D10 was reduction in the concentration of Progesterone (P<0.05). In the group treated at D7, a portion of the animals showed no reduction in plasma concentration of progesterone to values below 1 ng/mL (P<0.05). In experiment 2 we assessed the morphological and functional luteolysis in superovulated donors. Holstein cows (n = 03) and Brahman (n = 03) (Treated Group - GT) were superovulated by application of 400 IU of FSH (Pluset®) in decreasing doses, and three days after collection of embryos (D10) received an application of 0.5 mg cloprostenol IM (Ciosin®). Crossbred cows (control group - CG) (N = 8) were synchronized and received the luteolytic agent at the same moment of the cycle (D10). The luteolysis was monitored in samples of plasma progesterone and LH, and ultrasound for monitoring of luteal regression with ultrasonography equipment (Aquila Vet®) using a 8.0 MHz probe. The values obtained from progesterone and LH concentration, average size of CLs and total luteal area were evaluated by analysis of variance and differences between means compared by Tukey test (P<0.05). The concentration of progesterone in both groups decreased to values below 1ng/mL (P<0.05). LH concentrations showed elevated values in

plasmatic concentration in both groups. The medium luteal size and luteal total area were reduced indicating morphological luteolysis. We conclude that: the induction of luteolysis is most effective when luteolytic application is performed on D10; the pattern of morphological and functional regression in induced luteolysis in superovulated animals is similar to animals non-superovulated; the higher volume of luteal tissue and the resulting high concentrations of P4 may delay the resumption of the pattern of LH release and expression of estrus.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 02:		Página
Figuras 01 a 05	Seqüência de imagens ultrassonográficas de ovário de animal superovulado após luteólise induzida no D10.....	59
Figuras 06 a 10	Seqüência de imagens ultrassonográficas de ovário de animal não superovulado após luteólise induzida no D10.....	59
Figura 3 (a-d)	Resposta à indução da luteólise (hora 0) no 10 ^o dia após a manifestação de estro em animais superovulados (GT) e não superovulados (GC). a: área luteal total; b: área média da sessão transversal do(s) corpo(s) lúteo(s); c: concentração de progesterona plasmática; d: concentração de LH plasmático.....	63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 01:		Página
Tabela 1	Concentração plasmática de progesterona, em ng/mL, após a indução (hora 0) da luteólise no 7º (D7) ou no 10º (D10) dia após o estro em animais superovulados.....	44
CAPÍTULO 02:		
Tabela 1	Concentração plasmática de P4, em ng/mL, após a indução da luteólise (hora 0) no 10º dia após o estro em animais superovulados (GT) ou não superovulados (GC).....	61
Tabela 2	Concentração plasmática de LH, em ng/mL, após a indução da luteólise (hora 0) no 10º dia após o estro em animais superovulados (GT) ou não superovulados (GC).....	61
Tabela 3	Tamanho médio do(s) corpo(s) lúteo(s), em cm ² , após a indução da luteólise (hora 0) no 10º dia após o estro em animais superovulados (GT) ou não superovulados (GC).....	62
Tabela 4	Área luteal total, em cm ² , após a indução da luteólise (hora 0) no 10º dia após o estro em animais superovulados (GT) ou não superovulados (GC).....	62

BIOGRAFIA DO AUTOR

MÁRCIO SÉRGIO BISSOLI VARGAS, filho de Lhilton Vargas Ferreira e Maria José Bissoli Vargas, nasceu em Vila Velha, Espírito Santo, em 06 de janeiro de 1980.

Em Fevereiro de 1999 iniciou o curso de graduação em medicina veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se em janeiro de 2004.

Trabalhou como supervisor de distrito leiteiro na Dairy Partners Americas Manufacturing Brasil no período de janeiro de 2004 a fevereiro de 2005.

Em março de 2005 ingressou como médico veterinário na Cooperativa de Laticínios Selita em Cachoeiro de Itapemirim – ES, onde trabalhou até 2008.

Desde 2008 é médico veterinário da Prefeitura Municipal de Venda Nova do Imigrante – ES.

Em março de 2008, iniciou o curso de mestrado em Ciências Veterinárias, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, submetendo-se à defesa em 16 de agosto de 2010.

LISTA DE SIGLAS e/ou ABREVIATURAS

SOV – superovulação.

TE – transferência de embriões.

CL – corpo lúteo.

P4 – progesterona.

UI – unidades internacionais.

FSH – hormônio folículo estimulante.

IM – intramuscular.

G – força gravitacional.

mL – mililitro.

ng – nanograma.

LH – hormônio luteinizante.

PGF_{2α} – prostaglandina F_{2α}.

PMSG – gonadotrofina sérica de égua prenhe.

HD – Hard Disk.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Desenvolvimento folicular ovariano e formação do corpo lúteo	19
2.2. Prostaglandinas	23
2.3. Luteólise.....	24
2.4. Superovulação em bovinos	26
2.5. Referências	28
CAPÍTULO 1	37
3. Cap. 1 – Efeito do momento da aplicação de prostaglandina sobre a eficiência da luteólise em vacas superovuladas.....	38
3.1. RESUMO	38
3.2. ABSTRACT	39
3.3. INTRODUÇÃO	40
3.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.4.1. Localidade	42
3.4.2. Delineamento Experimental	42
3.4.3. Dosagem de progesterona plasmática	42
3.4.4. Análises Estatísticas	43
3.5. RESULTADOS	44
3.6. DISCUSSÃO	45
3.7. CONCLUSÕES	48
3.8. REFERÊNCIAS	49
CAPÍTULO 2	52
4. Cap. 2 – Luteólise morfológica e funcional em vacas superovuladas e não superovuladas	53
4.1. RESUMO	53
4.2. ABSTRACT	54

4.3. INTRODUÇÃO	55
4.4. MATERIAL E MÉTODOS	56
4.4.1. Localidade	56
4.4.2. Delineamento Experimental	56
4.4.3. Dosagem de progesterona plasmática	57
4.4.4. Dosagem do LH endógeno	58
4.4.5. Avaliação ultrassonográfica CL	58
4.4.6. Análises Estatísticas	60
4.5. RESULTADOS	61
4.6. DISCUSSÃO	64
4.7. CONCLUSÕES	67
4.8. REFERÊNCIAS	68
5. CONCLUSÕES GERAIS	71
6. REFERÊNCIAS	72
APÊNDICES	84

1 – INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é o maior rebanho comercial do mundo com aproximadamente 170 milhões de cabeças (IBGE, 2006), formado por uma diversidade de raças e seus cruzamentos. Apesar de ocupar posição de destaque no cenário mundial, o cenário futuro da pecuária nacional aponta para uma demanda crescente de animais de elevado mérito genético, para atender a maior escala de produção e a competitividade dos mercados de carne e leite.

Na última década ocorreu uma intensa corrida pela disseminação de genética animal superior. Em 2005, o Brasil tornou-se importante produtor de embriões bovinos, produzidos pelas técnicas de superovulação (SOV) e pela fecundação in vitro (VIANA, 2006). A transferência de embriões (TE) em bovinos surgiu como ferramenta para possibilitar a produção de um maior número de descendentes de uma mesma fêmea, permitindo selecionar os animais de elevado padrão zootécnico (RUMPF, 2007), encurtar o intervalo de gerações (CALLESEN et al., 1996) e melhor aproveitar a genética das doadoras (LEAL et al., 2009). Os resultados em termos de número de crias geradas por ano estão diretamente relacionados ao número de embriões viáveis produzidos, o que comprova o potencial de cada doadora (JONES e LAMB, 2008).

Apesar das vantagens advindas com a utilização da TE, o processo de superovulação apresenta algumas limitações que restringem sua aplicabilidade. A variabilidade da resposta das doadoras ao tratamento com gonadotrofinas constitui um dos maiores entraves para programas de disseminação comercial da TE (BARROS e NOGUEIRA, 2004). Além dos problemas inerentes a doadora, o programa de transferências de embriões necessita de um número significativo de receptoras para receber os embriões produzidos pelas doadoras (SIQUEIRA et al., 2009). O custo de manutenção destes animais constitui fator importante para viabilizar a técnica (LOONEY et al., 2006).

O melhor aproveitamento da doadora em um programa de SOV e TE passa pelos cuidados com o estado nutricional e seleção daqueles animais que respondem bem ao protocolo de SOV. Assim, além das características genéticas e de manejo dos animais, as particularidades fisiológicas e reprodutivas constituem fatores importantes para o melhor aproveitamento da técnica.

Após a superovulação, o animal passa por um período de recuperação visando o retorno à atividade ovariana cíclica normal. O retorno a atividade reprodutiva normal limita um uso mais intensivo das doadoras em regime de coleta de embriões e pode influenciar a resposta a protocolos seguintes. A regressão da massa de tecido luteal (mais volumosa do que a observada durante o ciclo estral normal) e o restabelecimento do equilíbrio endócrino, contribuem para o atraso na restituição do ciclo ovariano normal. São observadas alterações na função reprodutiva das doadoras, com a produção de concentrações supra-fisiológicas de progesterona, resultando em desequilíbrios endócrinos no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (VIANA et al., 1997).

A indução da regressão luteal realizada após a coleta dos embriões permite o restabelecimento da atividade luteal cíclica e evita possíveis gestações das doadoras (SIQUEIRA et al., 2007). Neste sentido, o estudo foi desenhado com os objetivos de estabelecer o melhor momento da aplicação de luteolítico e comparar a influência das elevadas concentrações de progesterona nos animais superovulados sobre o processo de luteólise.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desenvolvimento folicular ovariano e formação do corpo lúteo

As vacas são animais poliéstricos que manifestam estro em intervalos médios de 21 dias (DELAZARI et al., 2000). A manifestação cíclica de estros é controlada pelas funções ovarianas de secreção hormonal e desenvolvimento folicular, formação e regressão do corpo lúteo (CL) (SCHAMS e BERISHA, 2004).

A etapa inicial da foliculogênese tem início com a formação dos folículos durante a vida fetal (MORAES et al., 2008). Os folículos aparecem no ovário do feto bovino entre 220 e 240 dias de gestação. Ao nascer, a bezerra possui de 75.000 a 300.000 oócitos já possuindo o número definitivo de folículos primordiais nas suas gônadas, e apesar de nenhum folículo ser visível macroscopicamente ao nascimento, aos cinco dias de vida já há folículos de 5,0 milímetros (SNEL-OLIVEIRA et al., 2003).

Podemos considerar os oócitos como sendo as células mais raras existentes no organismo bovino, pois além de seu estoque reduzido e não renovável, menos de 0,1 % dos folículos chegam a ovular (CUSHMAN et al., 1999). Para que um folículo primordial ativado atinja o tamanho ovulatório é necessário um mínimo de 60 dias. As etapas da foliculogênese podem ser divididas de acordo com as características fisiológicas de cada grupo de folículos, nas seguintes categorias: folículos primordiais; folículos transitórios (folículos que iniciaram seu desenvolvimento); folículos ativados; folículos sensíveis a gonadotrofinas; folículos dependentes de gonadotrofinas e folículos ovulatórios. Durante as fases de crescimento e maturação, a maioria dos folículos degenera (fenômeno denominado atresia folicular) (PETER et al., 2009) e apenas uma minoria completa sua maturação e ovula (MORAES et al., 2008).

O desenvolvimento folicular ovariano é um processo dinâmico caracterizado pela emergência de ondas sucessivas, que consistem em um grupo de folículos recrutados de um “pool” de folículos antrais que iniciaram seu desenvolvimento e são dependentes de gonadotrofinas (FIGUEIREDO et al., 2000). Cada onda de

desenvolvimento folicular envolve o recrutamento de um conjunto de folículos e a seleção de um ou mais folículos dominantes (PETER et al., 2009).

A maioria dos ciclos estrais de bovinos apresenta de uma a três ondas de crescimento folicular (BARROS e NOGUEIRA, 2001). Cada onda de desenvolvimento folicular é precedida por um aumento na concentração plasmática de hormônio folículo estimulante (FSH) e o número de ondas em cada ciclo estral depende da duração da fase luteal (MORAES et al., 2008). A seleção do folículo dominante coincide com o declínio nas concentrações de FSH, e a expressão de receptores para hormônio luteinizante (LH) nas células da granulosa dos folículos dominantes, que continuam seu desenvolvimento enquanto os demais folículos entram em atresia. Este processo é denominado divergência folicular e sugere efetiva participação do LH na fase final de desenvolvimento e maturação folicular (BODENSTEINER, et al., 1996; SCHAMS e BERISHA, 2004).

O folículo de bovinos apresenta variações quanto à relação tamanho e capacidade ovulatória, entre as diversas raças. Em animais zebuínos, os folículos adquirem a capacidade em torno de 9 mm (VIANA et al., 2010). Na raça holandesa, a capacidade ovulatória é adquirida quando o folículo é maior ou igual a 10 mm (SARTORI et al., 2004). Assim, no momento em que a capacidade ovulatória é atingida ocorre a transição da dependência de FSH para LH (divergência) (KULICK et al., 1999), e este estágio é o ponto crítico para continuar o crescimento do folículo dominante (PETER et al., 2009).

Nos folículos ovarianos em crescimento e nos folículos aptos à ovulação a síntese do estradiol resulta de um trabalho coordenado entre as células da teca e da granulosa (BERTAN et al., 2006). Quando a concentração de estradiol circulante atinge determinado nível estimula o pico pré-ovulatório de LH e a ovulação. O estradiol sensibiliza áreas superiores do Sistema Nervoso Central, fazendo com que a fêmea manifeste também os sinais de aceitação do macho (estro) e age também nos centros controladores do pico pré-ovulatório de GnRH, fazendo com que uma grande quantidade deste hormônio seja liberada na circulação (CROWE, 2008; COLAZO et al., 2009). O estro é um evento de receptividade sexual que dura entre 30 minutos e 36 horas em vacas leiteiras (HAFEZ, 1995). O início do estro coincide com o pico pré-ovulatório de GnRH/LH, seguido de ovulação 28 a 32 horas após (SARTORI, 2007).

A ovulação é o evento terminal do desenvolvimento folicular, sendo caracterizada pela ruptura de um folículo dominante, com eliminação do fluido folicular, das células do cumulus e oócito (BERTAN et al., 2006) e desenvolvimento inicial do CL (PETER et al., 2009).

O processo de luteogênese envolve a transformação de um folículo pré-ovulatório em uma estrutura com grande vascularização ativa (KOBAYASHI et al., 2002) e sucessivas mitoses das células esteroideogênicas (ROBINSON et al., 2006). A parede do folículo ovulado é colapsada e a cavidade invadida por linfa e sangue provenientes dos capilares presentes em grande quantidade no folículo ovulatório. Esse conjunto de componentes promove a formação de uma estrutura denominada de corpo hemorrágico (BERTAN et al., 2006).

O corpo hemorrágico reorganiza-se para formar o CL sob influência de vários fatores angiogênicos e mitogênicos (BERISCHA e SCHAMS, 2005) como o fator de crescimento dos fibroblastos (bFGF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF – I), fator de crescimento semelhante à heparina (HGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), Angiopoietina-1 e -2 (ANPT-1 e -2), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), Endotelina-1 (ET-1), a angiotensina II (Ang II) e óxido nítrico (NO) (NISWENDER et al., 2000; NISWENDER, 2002; WEBB et al., 2002). Tais fatores agem diretamente na regulação da secreção de P4 ou de forma indireta na regulação do fluxo sanguíneo até o CL (MIAMOTO et al., 2009).

Grande parte do parênquima do CL é constituída de células de suporte que correspondem a 20 % do seu volume (SCHAMS e BERISHA, 2004) e incluem elementos vasculares (células endoteliais), macrófagos, células musculares lisas e fibroblastos, que estabelecem contato com as células esteroideogênicas (OKUDA e SAKUMOTO, 2003; SKARZYNSKI et al., 2008). As células de suporte demonstram importante papel na função do CL, sendo fibroblastos associados aos componentes estruturais dos tecidos e produzem glicosaminoglicanas, colágeno e algumas citocinas que influenciam a função de células lúteas (CHRISTENSON e DEVOTO, 2003). Os macrófagos têm uma importante função na remodelagem do tecido e participa da resposta imune que leva a lise do CL (TANIGUCHI et al., 2002). No sistema capilar do CL a pressão sanguínea e a quantidade de oxigênio são controladas pela ET-1 (NISWENDER et al., 2000). As células endoteliais vasculares (CEV) respondem por até 50% do CL bovino (MIAMOTO et al., 2009). As CEV

liberam peptídeos vasoativos que regulam a função do CL e o tônus vascular. Um exemplo de peptídeo vasoativo é a Angiotensina II (Ang II), que é convertida de Angiotensina I (Ang I), pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) (KOBAYASHI et al., 2001), tendo importante papel na indução da neovascularização e no estímulo da esteroidogênese (KOBAYASHI et al., 2002).

As células luteais pequenas originam-se das células da teca (MURPHY, 2000) e respondem ao LH (WILTBANK, 1994) com aumento na secreção de P4 (ROBINSON et al., 2006), via ativação das proteínas quinase A (WILTBANK, 1994; BERISHA e SCHAMS, 2005). Já as células luteais grandes são originadas das células da granulosa (NISWENDER et al., 2000) e pouco responsivas à ação do LH (BERTAN et al., 2006), contém receptores para PGF_{2α} (DIAZ et al., 2002) e fazem a mediação das ações luteolíticas deste hormônio (FERNANDES e FIGUEIREDO, 2007), além de serem responsáveis por aproximadamente 80 % da P4 secretada in vivo, também via proteína quinase A (BERISHA e SCHAMS, 2005).

Após a ovulação, as células remanescentes da teca e da granulosa do folículo ovulatório, que até então sintetizavam estradiol (E2), são reorganizadas e passam a sintetizar P4 (NISWENDER et al., 2000), utilizando como substrato o colesterol (STOCCO et al., 2007). Para tal mudança da especialidade destas células, ocorre uma diminuição na expressão da enzima P450aromatase (P - 450scc), que converte a androstenediona em E2 (BERTAN et al., 2006). Esta mudança determina o início da luteinização das células da teca e da granulosa. Entretanto, para que a P4 seja sintetizada em grande quantidade, além da diferenciação celular, necessariamente deverá ocorrer um aumento na expressão das enzimas necessárias para a conversão do colesterol em P4 e das proteínas transportadoras de colesterol para o interior da membrana mitocondrial (BAKER et al., 2007). A cadeia de colesterol transportada para membrana mitocondrial interna é quebrada pela ação da enzima P450aromatase, sendo transformando em pregnenolona (NISHIMURA et al., 2006). Este precursor é transportado para o retículo endoplasmático liso e, por ação da enzima β -hidroxiesteróide-deidrogenase/ Δ 5, Δ 4-isomerase-3 β -HSD (3 β -HSD) é convertido em P4 (STOCCO et al., 2007). Assim, a produção de P4 no CL é caracterizada por um aumento na expressão das enzimas que convertem o colesterol em P4 (P - 450scc e 3 β -HSD) (ROBINSON et al., 2006) e por um

decréscimo na expressão das enzimas que convertem P4 em estrógeno (enzima P450 17 α -hidroxilase e P450 aromatase) (NISHIMURA et al., 2006).

Vacas em lactação apresentam uma relação direta positiva entre o diâmetro do folículo ovulatório e o diâmetro do CL resultante deste folículo (VASCONCELOS et al., 2001). A maioria das células esteroidogênicas do CL maduro possuem como função principal a secreção de progesterona (P4) durante o ciclo estral e gestação (SCHAMS e BERISCHA, 2004). A produção de P4 pelo CL alcança seu ápice por volta de dez dias após a formação do CL, e enquanto permanecer em níveis elevados na circulação é responsável por bloquear a liberação de GnRH e das gonadotrofinas hipofisárias, inibindo a manifestação de novo estro (COLAZO et al., 2009).

2.2. Prostaglandinas

As prostaglandinas são substâncias orgânicas extremamente potentes que aparecem numa grande variedade de tecidos e situações biológicas (CEMBRANELLI, 2005). Elas constituem parte de uma grande classe de produtos naturais, os eicosanóides, biossintetizados nos mamíferos, principalmente a partir do ácido araquidônico livre, em reação catalisada por uma das isoformas cicloxigenase (COX ou PGH2-sintase) COX-1 ou COX-2 (MARGALIT et al., 1998). São divididas de acordo com sua estrutura e função, produzindo efeitos biológicos diferenciados, de acordo com o sítio de ação (MAROTTA et al., 2000). Possuem quatro grandes grupos: A, B, E, F (FERNANDES e FIGUEIREDO, 2007).

A descoberta deste grupo de substâncias ocorreu em 1937 por Von Euler (COLLINS e DJURIC, 1993) quando identificou no sêmen uma substância solúvel em lipídios, que estimula a contração da musculatura lisa uterina. Nomeou-a de prostaglandina (MAROTTA et al., 2000), supondo que estas substâncias possuíam sua origem na próstata (CEMBRANELLI, 2005). Após estudos Eliasson demonstrou que quase todas as prostaglandinas seminais eram originadas nas vesículas seminais e não na próstata, porém o nome permaneceu (FERNANDES e FIGUEIREDO, 2007).

As prostaglandinas no organismo dos mamíferos possuem uma vasta gama de atividades e ações específicas (MAROTTA et al., 2000). O efeito fisiológico predominante destas substâncias é promover contrações ou relaxamento das células musculares lisas em diversos órgãos (FERNANDES e FIGUEIREDO, 2007). Em Medicina Veterinária a mais antiga propriedade terapêutica descrita é a capacidade de algumas prostaglandinas da série F provocar a luteólise (TSAI e WILTBANK, 1997). Segundo STOCCO et al. (2007) a $PGF_{2\alpha}$ é responsável pelo tempo de vida do CL, uma vez que sua ação se dá promovendo a lise do CL (COLAZO et al., 2002; SKARZYNSKI et al., 2005; GIOMETTI et al., 2009) causando sua regressão morfológica e funcional (STOCCO et al., 2007), sendo que a regressão funcional precede a morfológica (VIANA et al., 1999).

Comercialmente a introdução de produtos análogos de $PGF_{2\alpha}$ se deu em 1979, e estes produtos, pelo seu efeito terapêutico tornaram-se largamente utilizados (STEVENSON e PHATAK, 2010). Os dois tipos de análogos de $PGF_{2\alpha}$ mais utilizados são o dinoprost e o cloprostenol (RÉPÁSI et al., 2005). Sendo que o dinoprost possui meia vida no sangue de apenas alguns minutos, e o cloprostenol possui meia vida de 3 horas. Mesmo com as diferenças de meia vida, STEVENSON e PHATAK (2010) não observaram diferenças nas respostas de luteólise e taxas de gestação com o uso de dinoprost ou cloprostenol em vacas em lactação, sendo assim, mesmo estes dois produtos sendo constituído de estruturas químicas distintas, no referido experimento não apresentaram alterações de ação.

Os análogos sintéticos de $PGF_{2\alpha}$ possuem função semelhante à de $PGF_{2\alpha}$ naturais, porém, apresentam efeito luteolítico muitas vezes maior, com efeitos colaterais mínimos (ALCANTARA et al., 2005).

2.3. Luteólise

Durante o ciclo estral normal o CL começa a regredir após o 17º dia após ovulação. O processo de regressão luteal é iniciado pela ocitocina produzida pelo próprio CL, que estimula a produção uterina de $PGF_{2\alpha}$. A concentração de receptores uterinos de ocitocina é baixa durante o período inicial do ciclo, aumentando com o progresso do ciclo (BALL e PETERS, 2006).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ é produzida pelo endométrio durante todo o ciclo estral, mas sua concentração máxima é atingida no momento da luteólise. O momento de regressão do CL é determinado pelo momento de secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no útero (não prenhe) ou placentoma (parto) (WILTBANK et al., 2002). A $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretada pelo útero atinge o CL através de um sistema contracorrente entre veia uterina e artérias ovarianas (BERISHA e SCHAMS, 2005). Atualmente, acredita-se que a produção luteal e liberação de peptídeos vasoconstritores (ET-1 e Ang – II) e citocinas inflamatórias (OKUDA e SAKUMOTO, 2003) somam-se as ações da $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida tanto pelo útero quanto pelo CL e auxiliam na lise do CL (SKARZYNSKI et al., 2005).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ se liga a receptores específicos na membrana das células luteais esteroidogênicas interrompendo a produção de P4 (MARTIN e FERREIRA, 2009) pela redução na captação e no transporte de colesterol para o citoplasma e para a mitocôndria (NISWENDER et al., 2000).

Nas células endoteliais que constituem o sistema vascular do CL, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ ainda estimula a síntese de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) e a secreção de ET-1 (MIAMOTO et al., 2009). Em vacas, esta característica é mais evidente entre os dias 17 e 21 do ciclo estral, período em que a síntese de ET-1 é aumentada cerca de 30 vezes quando comparada aos dias 5 e 6 do ciclo (SKARZYNSKI et al., 2005). A ET-1 secretada pelas células endoteliais é uma das mais potentes substâncias vasoconstritoras do organismo (BERISHA e SCHAMS, 2005).

Durante a fase de regressão do CL, a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é pulsátil na razão de três a quatro pulsos por dia e, são necessários cerca de cinco pulsos para que ocorra a luteólise completa (MORAES et al., 2008).

A presença de um CL funcional aumenta consideravelmente a irrigação sanguínea do ovário (BERISHA e SCHAMS, 2005). Durante a regressão, o fluxo sanguíneo para o ovário luteinizado declina bruscamente (JORDAN et al., 2009). Após a luteólise, as concentrações sanguíneas de P4 diminuem e as concentrações de E2 aumentam em consequência do crescimento do folículo pré-ovulatório (BUTLER, 2005). A queda na concentração de P4 e o aumento do E2 são responsáveis pelo comportamento estral (MORAES et al., 2008).

2.4. Superovulação em bovinos

As primeiras descrições de superovulação foram feitas por Smith e Engle em 1927, que utilizaram preparações contendo fragmentos de adenohipófise e observaram um incremento de quatro vezes na taxa de ovulação de ratos e camundongos. Mais tarde, outros estudos demonstraram que o uso de soro sanguíneo de éguas prenhes era capaz de induzir múltiplas ovulações em ratos (GORDON, 2005). Porém, desde a descrição do processo uma grande variabilidade da resposta superovulatória vem sendo reportada. Estas diferenças podem estar relacionadas com diferenças de concentrações nas preparações a base de gonadotrofinas (SQUIRES, 2003).

O grande emprego da superovulação em bovinos está relacionado à sua importância econômica como grande produtor de carne e leite em todo o mundo. Normalmente em bovinos, há a produção de apenas um óvulo por ciclo estral (HAFEZ, 1995). Considerando-se o período médio de gestação de 40 semanas (BALL e PETERS, 2006), uma fêmea pode produzir um número limitado de descendentes durante toda sua vida produtiva (CALLESEN et al., 1996). Assim, técnicas foram desenvolvidas para possibilitar o uso racional de animais superiores geneticamente e possibilitaram a geração de um grande número de descendentes num curto espaço de tempo (LEAL et al., 2009).

Normalmente, em bovinos é comum ocorrer uma única ovulação enquanto vários folículos que são recrutados durante a onda de crescimento folicular sofrem atresia (ROMERO et al., 1991). A superovulação é o resultado de um tratamento hormonal de estimulação do desenvolvimento de diversos folículos terciários até o estágio de pré-ovulação, com conseqüentes ovulações múltiplas (REICHENBACH et al., 2008). O objetivo é induzir um número supra-fisiológico de ovulações, e uma taxa de fertilização satisfatória dos oócitos ovulados (KAFI e MCGOWAN, 1997).

No bovino, se considera que houve resposta ao tratamento quando se produzem mais de duas ovulações (OLIVEIRA et al., 2007). No processo de superovulação, há um estímulo para que estes folículos que normalmente irão sofrer atresia possam vir a amadurecer e ovular (STROUD e HASLER, 2006). Para induzir a superovulação, FSH ou gonadotrofina sérica de égua prenhe (PMSG) são administrados no meio do ciclo estral (dias 8-14 em bovinos) para aumentar o

número de folículos que amadurecem até o estágio de folículos dominantes (SQUIRES, 2003).

O tratamento superovulatório tem por mecanismo a prevenção da redução da concentração endógena de FSH induzida pela dominância folicular (MORAES et al., 2008). Desse modo, o estabelecimento de um único folículo dominante é evitado, a divergência inibida e o desenvolvimento simultâneo de vários folículos com potencial ovulatório tornam-se possível. (SANTIAGO et al., 2002). A presença do folículo dominante previamente ao início do tratamento hormonal, contudo, afeta a magnitude da resposta superovulatória subsequente, pela indução da atresia do pool de folículos subordinados (HAFEZ, 1995).

2.5. Referências

ALCANTARA, B.; BOETA, M.; PORRAS, A. Luteolysis, estrus induction, and clinical side effects in mares treated with a PGF₂ α analog, cloprostenol (Sinocrel 11-21). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 25, p. 384 – 386, 2005.

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. Reprodução em bovinos. São Paulo – SP, **Editora Roca**, 3ª Edição, 232 p., 2006.

BAKER, B. Y.; EPAND, R. F.; EPAND, R. M.; MILLER, W. L. Cholesterol binding does not predict activity of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 14, p. 10223 – 10232, 2007.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1483 – 1496, 2001.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Superovulação em zebuínos de corte. IN: **1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina, p. 212 – 222, 2004.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, P. 305 – 317, 2005.

BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H.; TRALDI, A. S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 824 – 840, 2006.

BODENSTEINER, K. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER O. J. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 45, p. 1115 – 1126, 1996.

BUTLER, W. R. Inhibition of ovulation in the postpartum cow and the lactating sow. **Livestock Production Science**, v. 98, p. 5 – 12, 2005.

CALLESEN, H.; LIBORIUSSEN, T. ;GREVE, T. Pratical aspects of multiple ovulation-embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 215 –226, 1996.

CEMBRANELLI, M. A. R. Eficiência de duas doses de D-Cloprostenol para sincronização de estro em bovinos nas diferentes fases do ciclo estral. 2005. 34p. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade José do Rosário Velano**, Alfenas – MG, 2005.

CHRISTENSON, L. K.; DEVOTO, L. Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 01, p.1 – 9, 2003.

COLAZO, M. G.; MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 72, p. 47 – 62, 2002.

COLAZO, M. G.; REE, T. O.; EMMANUEL D. G. V.; AMBROSE, D. J. Plasma luteinizing hormone concentrations in cows given repeated treatments or three different doses of gonadotropin releasing hormone. **Theriogenology**, v. 71, p. 984 – 992, 2009.

COLLINS, P. W.; DJURIC, S. W. Synthesis of therapeutically useful prostaglandin and prostacyclin analogs. **Chemical Reviews**, v. 93, p. 1533 – 1564, 1993.

CROWE, M. A. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows, **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43 (suppl. 5), p. 20 – 28, 2008.

CUSHMAN, R. A.; DESOUZA, J. C.; HEDGPETH, V. S.; BRITT, J. H. Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 349 – 354, 1999.

DELAZARI, J. A.; FONSECA, F. A.; QUEIROZ, A. C.; PEREIRA, J. C.; CECON, J. C. Desempenho reprodutivo, concentrações de progesterona e metabólitos lipídicos no pós-parto de vacas mestiças H/Z, submetidas a uma dieta hiperlipidêmica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 413 – 420, 2000.

DIAZ, F. J.; ANDERSON, L. E.; WU, Y. L.; RABOT, A.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Regulation of progesterone and prostaglandin F_{2α} production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, p. 65 – 80, 2002.

FERNANDES, C. A. C.; FIGUEIREDO, A. C. S. Avanços na utilização de prostaglandinas na reprodução de bovinos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.31, p.406 – 414, 2007.

FIGUEIREDO, M. M. N.; FONSECA, F. A.; TORRES, C. A. A.; GALIMBERT, A. M.; ALMEIDA, C. A. Dinâmica folicular ovariana de vacas leiteiras nos pós-partos após o tratamentos com busarelina (GnRH) e cloprostenol (PGF_{2α}). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.725 – 731, 2000.

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, p. 34 – 52, 2009.

GORDON, I. R. Reproductive Technologies in Farm Animals. Trowbridge Reino Unido, **CABI Publishing** – 1ª Edição, 332 p., 2005.

HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal, São Paulo – SP, **Editora Manole**, 6ª Edição, 582 p., 1995.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006 – Dados Preliminares**, Rio de Janeiro, 146p., 2006

JONES, A. L.; LAMB, G. C. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v.69, p. 107 – 115, 2008.

JORDAN, A.; HERZOG, K.; ULBRICH, S., E.; BEINDORFF, N.; HONNENS, Ä.; KRÜGER, L.; MIYAMOTO, A.; BOLLWEIN, H. Genital blood flow and endometrial gene expression during the preovulatory period after PGF₂α- induced luteolysis in different luteal phases in cows. **Journal of Reproduction and Development**, v.1, p.1 – 29, 2009.

KAFI, M.; MCGOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 137 – 157, 1997.

KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W. M.; SCHAMS D.; MIYAMOTO, A. Production and localization of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F₂α. **Journal of Endocrinology**, v. 170, p. 369 – 380, 2001.

KOBAYASHI, S.; ACOSTA, T. J.; OZAWA, T.; HAYASHI, K.; BERISHA, B.; OHTANI, M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Intraluteal release of angiotensin II and progesterone in vivo during corpora lutea development in the cow: effect of vasoactive peptides. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 174 – 179, 2002.

KULICK, L. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GUINTER, O. J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, v. 52, p. 913 – 951, 1999.

LEAL, L. S.; OBA, E.; FERNANDES, C. A. C.; SÁ FILHO, O. G. Avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 174 – 183, 2009.

LOONEY, C.R.; NELSON, J.S.; SCHNEIDER, H. J.; FORREST, D. W. Improving fertility in beef cow recipients. **Theriogenology**, v. 65, p. 201 – 209, 2006.

MARGALIT, A.; HAUSER, S. D.; ZWEIFEL, B. S.; ANDERSON, M. A.; ISAKSON, P.C. Regulation of prostaglandin biosynthesis in vivo by glutathione. *American*

Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 274, p. 294 – 302, 1998.

MAROTTA, E.; RIGHI, P.; ROSINI, G. A bicyclo [3.2.0] hept-3-en-6-one approach to prostaglandin intermediates. **Organic Letters**, v. 2, p. 4145 – 4148, 2000.

MARTIN, I.; FERREIRA, J. C. P. Fisiologia da ovulação e da formação do corpo lúteo bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p. 270 – 279, 2009.

MORAES, J. C.; SOUZA, C. J. H.; GONÇALVES, P. B. D.; FREITAS, V. J. F.; JÚNIOR, E. S. L. Controle do estro e da ovulação em Ruminantes. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. São Paulo, Roca, p.33 – 56, 2008.

MIAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; SASAHANA, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 159 – 169, 2009.

MURPHY, B. D. Models of luteinization. **Biology of reproduction**, v. 63, p. 2 – 11, 2000.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; MCINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 1 – 29, 2000.

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

NISHIMURA, R.; SAKUMOTO, R.; TATSUKAWA, Y.; ACOSTA, T. J.; OKUDA, K. Oxygen concentration is an important factor for modulating progesterone synthesis in bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v. 147, p. 4273 – 4280, 2006.

OKUDA, K.; SAKUMOTO, R. Multiple roles of TNF super family members in corpus luteum function. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 1-7, 2003.

OLIVEIRA, J. L. S.; SOARES, R. D.; ROCHA, F. A.; ROMERO, V. L.; PRADO, F. R. A. Superovulação em bovinos. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v.08, p. 1– 6, 2007.

PETER, A. T.; LEVINE, H.; DROST, M.; BERGFELT, D. R. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 71, p. 1343 – 1357, 2009.

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; ANDRADE, J. C. O.; TEÓFILO FILHO, F.; SANTOS, M. H. B.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; MEIRINHOS, M. L. G.; SANTOS FILHO, A. S. S. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. São Paulo, Roca, p.201 – 239, 2008.

RÉPÁSI, A.; BECKERS, J. F.; SULLON, KAREN, A; REICZIGEL, J.; SZENCI, O. Effect of the type and number of prostaglandin treatments on corpus luteum, the largest follicle and progesterone concentration in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 436 – 442, 2005.

ROBINSON, R. S.; HAMMOND, A. J.; NICKLIN, L. T.; SCHAMS, D.; MANN; G. E.; HUNTER, M. G. Endocrine and cellular characteristics of corpora lutea from cows with a delayed post-ovulatory progesterone rise. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 31, p.154 – 172, 2006.

ROMERO, A.; ALBERT, J.; BRINK, Z.; SEIDEL JR., G. E. Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 265, 1991.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 229 – 233, 2007.

SANTIAGO, L. L.; TORRES, C. A. A.; NOGUEIRA, E. T.; COSTA, E. P.; GUIMARÃES, J. D. Folículo dominante e resposta superovulatória em novilhas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p. 363 – 368, 2002.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 905 – 920, 2004.

SARTORI, R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira, **Brazilian Journal of Animal Reproduction**, v.31, p.153 – 159, 2007.

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

SIQUEIRA, L. G. B.; VIANA, J. H. M.; SOUZA, E. D.; ARASHIRO, E. K. N.; CAMARGO, L. S. A.; FONSECA, J. F.; FERNANDES, C. A. C. Eficiência na indução da luteólise em diferentes dias após a coleta de embriões em bovinos (Resultados parciais). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, Supl. 3, p. 1230, 2007.

SIQUEIRA, L. G. B.; TORRES, C. A. A.; SOUZA, E. D.; MONTEIRO Jr., P. L. J.; ARASHIRO, E. K. N.; CAMARGO, L. S. A.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. **Theriogenology**, v. 72, p. 949 – 958, 2009.

SKARZYNSKI, D. J.; JAROSZEWSKI, J. J.; OKUDA, K. Role of tumor necrosis factor- α and nitric oxide in luteolysis in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 340 – 346, 2005.

SKARZYNSKI, D. J.; FERREIRA-DIAS, G.; OKUDA, K. Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: Hormonal control, immune

mechanisms and intercellular communication. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 57 – 65, 2008.

SNEL-OLIVEIRA, M.V.; PEREIRA, D. C.; JUNIOR, D. M.; RUMPF, R. Estimulação hormonal, punção folicular transvaginal e avaliação ovocitária em bezerras pré-puberes da raça nelore (*Bos taurus indicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 106– 114, 2003.

SQUIRES, J. E. Applied animal endocrinology. Trowbridge Reino Unido, **CABI Publishing** – 1ª Edição, 234 p., 2003.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, v. 28, p. 117 – 149, 2007.

STEVENSON, J. S.; PHATAK, A. P. Rates of luteolysis and pregnancy in dairy cows after treatment with cloprostenol or dinoprost. **Theriogenology**, article in press, 2010.

STROUD, B.; HASLER, J. F. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. **Theriogenology**, v. 65, p. 65-76, 2006.

TANIGUCHI, H.; YOKOMIZO, Y.; OKUDA, K. Fas-Fas ligand system mediates luteal cell death in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 754 – 759, 2002.

TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F_{2α} induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: A potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of reproduction**, v. 57, p. 1016 – 1022, 1997.

VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, p. 307 – 314, 2001.

VIANA, J. H. M.; VIANA, A. K. M.; BITENCOURT, F. J. L. ; LOPES, E. O. . Efeito da resposta superovulatória sobre o restabelecimento da atividade ovariana cíclica em doadoras de embrião da raça Holandesa . **Ciência Animal**, v. 7, p. 124 – 124, 1997.

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

VIANA, J. H. M. Cenário atual da transferência de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* no Brasil e no Mundo. **O Embrião**. Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, n. 29, p. 2, 2006.

VIANA, J. H. M.; PALHAO, M. P.; SIQUEIRA, L. G. B.; FONSECA, J. F.; CAMARGO, L. S. A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 73, p. 966 – 972, 2010.

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

WILTBANK, M. C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1873-1883, 1994.

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

CAPITULO 1
EFEITO DO MOMENTO DA APLICAÇÃO DE PROSTAGLANDINA
SOBRE A EFICIÊNCIA DA LUTEÓLISE EM VACAS
SUPEROVULADAS

Artigo submetido à publicação na Revista Ciência Rural, sob o protocolo nº CR-3980

3. CAPÍTULO 1 – Efeito do momento da aplicação de prostaglandina sobre a eficiência da luteólise em vacas superovuladas

3.1. Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o momento mais adequado para indução da luteólise em vacas superovuladas. Vacas da raça Holandesa (N=40) foram superovuladas pela aplicação de 400 UI de FSH (Pluset[®]) em doses decrescentes e, após a coleta dos embriões, distribuídas aleatoriamente em dois grupos, que receberam uma aplicação IM de 0,5mg de análogo de PGF_{2α} (Ciosin[®]) no dia da coleta (D7) ou três dias após (D10), respectivamente. A luteólise foi monitorada pela concentração plasmática de progesterona, avaliada em amostras de sangue colhidas a cada 48h durante 10 dias. As dosagens de P4 foram realizadas por radioimunoensaio em fase sólida, e os valores obtidos comparados por análise de variância. No grupo tratado no D7, metade dos animais não apresentou redução da concentração plasmática de progesterona a valores abaixo de 1ng/mL (P<0,05), já no grupo D10, os animais apresentaram queda da concentração de progesterona, a valores abaixo de 1 ng/mL (P<0,05). Assim, a aplicação do luteolítico no D10 se mostrou mais eficiente na indução da luteólise em vacas superovuladas.

Palavras-chave: Superovulação, luteólise, progesterona, transferência de embriões, bovinos

3.2. Abstract

The objective of this study was to evaluate the most appropriate time to induce luteolysis in superovulated cows. Holstein cows (N = 40) were superovulated by the application of 400 IU of FSH (Pluset ®) in decreasing doses, and after collection of the embryos were randomly divided into two groups that received application of 0,5 mg IM analogous of PGF2 α (Ciosin ®) on the collection day (D7) or three days after (D10), respectively. The luteolysis was monitored by plasmatic progesterone concentration, measured in blood samples taken every 48 hours for 10 days. The dosage of plasmatic progesterone was performed by solid phase radioimmunoassay, and compared the values obtained by analysis of variance. In the treated group on D7, half the animals showed no reduction in progesterone concentrations to values below 1 nan / mL (P <0.05), now in the group D10, the animals showed a decrease in concentration of progesterone the values below 1 ng/mL (P <0.05). Thus, the application of luteolytic in D10 was more efficient in inducing luteolysis in superovulated cows.

Key works: Superovulation, Luteolysis, Progesterone, Embryo Transfer, Bovine

3.3. Introdução

O uso de técnicas reprodutivas em animais de produção, tais como a superovulação (SOV) e a transferência de embriões (TE) vem sendo difundido no Brasil. A SOV associada a TE apresenta como fator positivo ganhos significativos nos índices reprodutivos de fêmeas bovinas (RUMPF, 2007). Pela transferência de embriões é possível melhorar as taxas de reprodução e encurtar o intervalo de gerações (LEAL et al, 2009), criando a possibilidade de maximizar o uso de animais de alto mérito genético (CALLESEN et al., 1996). Assim o número de crias geradas por ano por doadora está diretamente relacionado ao número de embriões produzidos (JONES e LAMB, 2008).

Como consequência da superovulação, o número de corpos lúteos (CLs) formados após as ovulações é maior que o normal, resultando em concentrações plasmáticas de P4 supra fisiológicas (SIQUEIRA et al., 2007). A superovulação provoca o aparecimento de vários CLs, e a sua presença retarda o retorno ao estro em animais superovulados (DESAULNIERS et al., 1990; MISRA e PANT, 2003).

Durante o ciclo estral regular, o CL começa a regredir após o 17º dia após ovulação. Esta regressão ocorre pela influência da PGF_{2α} uterina, cuja liberação é iniciada pela ocitocina produzida pelo próprio CL. No caso de animais superovulados, a indução da luteólise é necessária para permitir o restabelecimento da atividade ovariana cíclica (VIANA et al., 1997) e também para evitar a possível gestação de embriões remanescentes da coleta (SIQUEIRA et al., 2007). Contudo, a superovulação pode determinar alterações na função reprodutiva dos animais, em função da massa de tecido luteal formada e de desequilíbrios endócrinos no eixo hipotalâmico - hipofisário - gonadal. Estas alterações retardam o retorno das doadoras ao regime de coleta de embriões (VIANA et al., 1997).

A luteólise e o subsequente retorno à atividade ovariana cíclica podem ser monitorados por vários parâmetros, dentre eles o tamanho e aspecto ultrassonográfico do tecido luteal (SIQUEIRA et al., 2009) e a concentração plasmática de P4 (COLAZO et al., 2002; BICALHO et al., 2008; MARTIN e FERREIRA, 2009).

É sabido que a eficiência na indução exógena da luteólise pela administração de análogos da prostaglandina varia ao longo do ciclo estral, em função da variação no estágio de desenvolvimento e maturação funcional do CL. Em animais

superovulados, contudo, é comum a aplicação do luteolítico no momento da coleta, por questões de manejo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da indução da luteólise no dia da coleta dos embriões (D7) ou três dias após a coleta (D10) em animais superovulados.

Neste primeiro estudo somente as concentrações plasmáticas de P4 foram avaliadas, visando detectar possível variabilidade da resposta luteolítica.

3.4. Material e Métodos

3.4.1. Localidade

O experimento foi realizado no Campo Experimental de Coronel Pacheco – MG, unidade experimental do Centro Nacional de Pesquisas de Gado de Leite da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA – Gado de Leite). Localizada no município de Coronel Pacheco – MG. O período de coleta de dados (sincronização, superovulação, coleta de embriões e coleta de sangue das doadoras) foi de 13 de março a 20 maio de 2009.

3.4.2. Delineamento Experimental

Quarenta vacas da raça holandesa (N=40) foram superestimuladas pela aplicação de 400 UI de FSH¹ (Pluset[®]) durante quatro dias, a cada 12 horas, iniciando com 4 mL no primeiro dia decrescendo até 1 ml no último dia e induzidas a ovulação pela administração de PGF_{2α} juntamente com a 6^a e 7^a dose de FSH. Os animais foram inseminados 12 e 24 horas após a observação do estro e a coleta dos embriões foi realizada sete dias após primeira observação dos animais em estro. Após a coleta os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos de acordo com o momento da administração de 0,5 mg de cloprostenol sódico² (Ciosin[®]) intramuscular (IM): no D7 (imediatamente após a coleta dos embriões) ou três dias mais tarde.

A luteólise foi monitorada pela concentração plasmática de progesterona, avaliada em amostras de plasma colhidas a cada 48h durante 10 dias.

3.4.3. Dosagem de progesterona plasmática

Amostras de sangue foram coletadas por punção da artéria ou veia coccígea utilizando-se tubos de 4,5 mL com vácuo, contendo K₃EDTA³ (Labor Import[®]), e

¹ Hertape Calier Saúde Animal[®] S.A., Brasil.

² Schering Plough Coopers[®], Brasil

³ Labor import[®], Osasco, SP, Brasil

armazenadas em recipiente isotérmico contendo gelo (4-5°C). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 480 G durante 15 minutos para a separação do plasma, e o sobrenadante foi pipetado, dividido em duas alíquotas, acondicionado em criotubos de 1,5 mL devidamente identificados com o número do animal e data da coleta, e congelados e estocados a -20°C até o momento de realização das análises.

As amostras foram coletadas a partir do dia aplicação do luteolítico, sendo a primeira coleta realizada imediatamente antes do tratamento e as demais a cada 48 horas, perfazendo um total de cinco amostras por (D0, D2, D4, D6, D8). As análises da concentração plasmática de progesterona foram realizadas com auxílio de um contador gama⁴ (Gammatec 600), utilizando-se kits comerciais⁵ para radioimunoensaio em fase sólida e progesterona marcada com I¹²⁵. O procedimento seguiu a recomendação do fabricante, onde os controles padrões (0 – 40 ng/ml de P4) e as amostras coletadas durante o experimento foram pipetadas (100µl) em tubos revestidos com anticorpo, sendo posteriormente adicionado marcador de P4 (1mL) em cada tubo e os mesmos foram homogeneizados e incubados por 3 horas em temperatura ambiente. Em seguida os tubos foram vertidos para eliminação de seu conteúdo, aspirados com bomba de vácuo e submetidos à leitura em um contador gama por um minuto, conforme descrito por GINTHER et al. (2005). O coeficiente de variação intra ensaio foi de 5,57% e o coeficiente de variação inter ensaios foi de 2,75% e a sensibilidade do teste foi de 0,02 ng/mL.

3.4.4. Análises Estatísticas

Os dados foram tabulados em planilhas eletrônicas e posteriormente submetidos à análise estatística usando-se o programa SAEG – Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (EUCLIDES, 2007). Os valores médios de progesterona plasmática foram comparados em função do dia, para cada tratamento, pelo teste de Tukey, e diferenças entre tratamentos para cada dia pelo teste F ao nível de 5% de significância.

⁴ Gammatec model 600, The Nucleus, Inc., Oak Ridge, TN, USA.

⁵ Kit de Progesterona, Coat-a-Count, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Los Angeles, CA, USA.

3.5. Resultados

A aplicação de luteolítico no D7 acarretou uma redução parcial da concentração de P4, ($P < 0,05$), ao passo que a aplicação do luteolítico no D10 acarretou uma queda da P4 em 48h, com valores abaixo de 1 ng/mL a partir de 96h após a aplicação do luteolítico. (Tabela 01).

Tabela 01 – Concentração plasmática de progesterona, em ng/mL, após a indução (hora 0) da luteólise no 7^o (D7) ou no 10^o (D10) dia após o estro em animais superovulados.

	Horas após indução da luteólise				
	0h	48h	96h	144h	192h
D7	28,6±5,2 aA	1,8±0,3 aC	2,0±0,5 aBC	3,0±0,8 aB	4,2 ±1,01 aB
D10	36,4±7,4 aA	1,6±0,4 aB	0,5±0,1 bB	0,4 ±0,2 bB	0,1±0,0 bB

a,b Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($P < 0,05$)

A,B Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem ($P < 0,05$)

Dentro do tratamento D7, o efeito significativo de dia (horas) foi devido à queda nas concentrações de P4 em 48 horas após o tratamento e posterior recuperação as 144 h. No entanto, dentro do tratamento D10, somente a queda 48h após o tratamento foi observada. Os níveis de P4 caíram para valores inferiores a 1 ng/mL no tratamento D10 o que não ocorreu no tratamento D7.

No grupo de animais tratados no D7, houve uma redução parcial e transitória da concentração plasmática de P4, onde parte dos animais apresentou regressão nas concentrações plasmáticas de P4 a valores abaixo de 1ng/mL (50% dos animais) e outra parte dos animais apresentou redução apenas parcial nas concentrações de P4, e a partir de 96 h após o início do tratamento houve novo acréscimo nas concentrações de P4, sendo que estes animais encerraram o período experimental com valores acima de 1ng/mL.

Nos animais tratados no D10, as concentrações plasmáticas de P4 apresentaram no início da observação (0h) valores médios superiores aos

encontrados nos animais tratados no D7, sendo observada ao final do período experimental regressão da concentração média de P4 para $0,1 \pm 0,0$ ng/mL.

3.6. Discussão

A aplicação de luteolítico no dia da coleta de embriões (D7) imediatamente após a coleta dos embriões é uma prática comum em protocolos de transferência de embriões, porém o acompanhamento posterior destes animais nem sempre é feito e a eficácia do processo não é sempre avaliada. Neste experimento, observou-se que 50% dos animais tratados com luteolítico no D7 apresentaram redução apenas parcial nas concentrações plasmáticas de P4, demonstrando assim, a menor eficiência do processo realizado no D7, quanto comparado à sua realização no D10, onde 100% dos animais apresentaram redução da concentração plasmática de P4 a valores abaixo de 1ng/mL.

Ovários de animais superovulados apresentam diferenças significativas em relação aos ovários de animais não superovulados, sendo a mais marcante a grande massa de tecido luteal formado, acarretando alterações na função reprodutiva nas fêmeas. Tais alterações promovem desequilíbrios endócrinos, que retardam o retorno destes animais ao seu ciclo reprodutivo normal, e posterior retorno ao regime de coleta de embriões (VIANA et al., 1997). Aliado ao fato da menor responsividade do CL ao luteolítico no D7 tem-se também a grande massa de tecido luteal formada, resultando em luteólise em apenas um grupo de animais, com o restante (50%) apresentando ao final do período experimental valores acima de 1 ng/mL de P4.

Em animais não superovulados, estudos demonstram que há o aumento da resposta ao luteolítico na indução do CL ao longo do ciclo estral, e o período compreendido entre o D10 a D16 apresenta melhores resultados na indução da luteólise (BORGES et al., 2003; GIOSO et al., 2005), havendo neste período maior sensibilidade e responsividade do CL ao luteolítico, aumentando a afinidade de adesão deste aos receptores das células luteínicas. No presente experimento os animais superovulados que receberam a aplicação do luteolítico no D10, demonstraram que o momento do ciclo favoreceu a ação do luteolítico, conforme descrito na literatura em animais não superovulados.

A menor indução da luteólise nos animais D7 pode ser relacionada à menor afinidade dos receptores celulares ao luteolítico, levando à indução da apoptose apenas num grupo de células luteais esteroidogênicas e a ação de mecanismos anti-apoptóticos. A diminuição do suprimento sanguíneo causa redução da concentração de oxigênio celular, induzindo alterações celulares dentre elas a apoptose (NISHIMURA et al. 2008). Assim, com a redução em apenas um grupo de células, a apoptose se manifesta apenas restrita a este grupo celular, ao passo que as células que não foram estimuladas, ou não sofreram a queda de oxigênio necessária para desencadear a apoptose, voltaram a produzir P4, explicando assim a queda parcial e posterior incremento nas concentrações de P4 nos animais tratados no D7.

A luteólise é iniciada por uma ação direta do luteolítico nas células luteais grandes e a diminuição das concentrações circulantes de P4 refletem uma combinação da redução da esteroidogênese e do fluxo sanguíneo luteal (NISWENDER et al. 1990). A luteólise é caracterizada por diminuição da produção de P4 seguida por diminuição no tamanho luteal (NISHIMURA et al., 2008). O estímulo primário para a apoptose nas células parenquimais, fibroblastos e células endoteliais é a hipóxia, devido à isquemia provocada por uma vasoconstrição e oclusão vascular, seguido de liberação de células endoteliais para o interior do lúmen dos pequenos vasos sanguíneos (NISWENDER et al. 1990). E a condição de baixa oxigenação (hipóxia) causada pela diminuição da oferta de sangue é um elemento característico do ambiente luteal durante a luteólise (NISHIMURA et al., 2008).

Neste estudo, a possível apoptose ocorrida apenas num grupo de células luteais esteroidogênicas está relacionada à ligação pouco eficiente do luteolítico (cloprostenol) a receptores específicos na membrana das células luteais esteroidogênicas, promovendo assim a interrupção apenas parcial de produção de P4, e acarretando concentrações acima de 1 ng/mL em 50% dos animais ao final do período experimental no grupo de animais tratados no D7. A presença de elevadas concentrações de P4, promove o bloqueio da cascata luteolítica, pois grandes concentrações de P4 apresentam atividade anti-apoptótica (RUEDA et al., 2000).

A ação de mecanismos anti-apoptóticos dificultando o desencadeamento de fatores que promovem a lise do CL, contribuem para fatores como a produção lútea de peptídeos vasoconstritores (ET-1 e Ang – II) e citocinas inflamatórias e durante

sua liberação, diminuem a chegada de sangue às células esteroidogênicas, reduzindo assim a concentração de luteolítico no CL bovino e auxiliam na inibição luteólise (GIOMETTI et al. 2009), ou que o luteolítico alcance um número menor de células, não consigam se expressar de maneira eficiente, levando à lise de um número reduzido de células do CL ou mesmo à não ocorrência de luteólise. Tal resultado é expresso no presente estudo pela luteólise de apenas um grupo de células no grupo de animais tratados no D7.

Assim, a luteólise induzida no D10 demonstrou ser mais eficiente que a luteólise induzida no D7 ($P < 0,05$), fato este relacionado à maior responsividade dos CLs à ação do luteolítico, sendo que o grupo de animais D10 apresentou redução das concentrações de P4 a valores abaixo de 1 ng/mL em 100% dos animais tratados, demonstrando assim, a ocorrência de luteólise funcional.

3.7. Conclusões

A administração de uma dose do luteolítico (0,5 mg cloprostenol) IM no D10 se mostrou mais eficiente para indução da regressão luteal em vacas superovuladas que o protocolo usualmente empregado de aplicação de uma dose no D7 imediatamente após a coleta dos embriões.

3.8. Referências

BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M.; JÚNIOR, V. R. R.; CARVALHO, G. R.; FONSECA, J. F.; NETO, A. M.; ASSIS, A. J. Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.85-92, 2003.

BICALHO, R. C.; GALVÃO, K. N.; GUARD., C. L.; SANTOS, J. E. P. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, p.199-207, 2008.

CALLESEN, H.; LIBORIUSSEN, T.; GREVE, T. Practical aspects of multiple ovulation-embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 215-226, 1996.

COLAZO, M. G.; MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 72, p. 47-62, 2002.

DESAULNIERS, D. M.; GUAY, P.; VAILLANCOURT, D. Estrus induction with prostaglandin F_{2α}, cloprostenol or fenprostalene during the normal estrous cycle, superovulation and after embryo collection. **Theriogenology**, v. 34, p.667-682, 1990.

EUCLIDES, R. F. SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BAERWALD, A. R.; PIERSON, R. A. Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. **Reproduction**, v. 130, p. 379–388, 2005.

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

GIOSO, M. M.; COSTA, E. P.; FERNANDES, C. A. C.; TORRES, C. A. A., CARVALHO, G. R. Perfil de progesterona e intervalo ao estro de receptoras bovinas sincronizadas com doses reduzidas de cloprostenol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1181-1187, 2005.

JONES, A. L.; LAMB, G. C. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v.69, p. 107–115, 2008.

LEAL, L. S.; OBA, E.; FERNANDES, C. A. C.; FILHO, O. G. S. Avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 174-183, 2009.

MARTIN, I.; FERREIRA, J. C. P. Fisiologia da ovulação e da formação do corpo lúteo bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p. 270-279, 2009.

MISRA, A. K.; PANT, H. C. Estrus induction following PGF₂ α treatment in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 59, p. 1203-1207, 2003.

NISHIMURA, R.; KOMIYAMA, J.; TASAKI, Y.; ACOSTA, T., J.; OKUDA, K. Hipoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 529-536, 2008.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 229 – 233, 2007.

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

SIQUEIRA, L. G. B.; VIANA, J. H. M.; SOUZA, E. D.; ARASHIRO, E. K. N.; CAMARGO, L. S. A.; FONSECA, J. F.; FERNANDES, C. A. C. Eficiência na indução da luteólise em diferentes dias após a coleta de embriões em bovinos (Resultados parciais). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, Supl. 3, p. 1230, 2007.

SIQUEIRA, L. G. B.; TORRES, C. A. A.; SOUZA, E. D.; MONTEIRO Jr., P. L. J.; ARASHIRO, E. K. N.; CAMARGO, L. S. A.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. **Theriogenology**, v. 72, p. 949-958, 2009.

VIANA, J. H. M.; VIANA, A. K. M.; BITENCOURT, F. J. L.; LOPES, E. O. Efeito da resposta superovulatória sobre o restabelecimento da atividade ovariana cíclica em doadoras de embrião da raça Holandesa. **Ciência Animal**, v. 7, p. 124-124, 1997.

VIANA, A. K. M.; VIANA, J. H. M.; BITENCOURT, F. J. L.; LOPES, E. O. Fatores que afetam o restabelecimento da atividade ovariana cíclica após a superovulação em doadoras de embrião da raça holandesa. **Ciência Animal**, v. 7, p. 125-125, 1997.

CAPITULO 2
LUTEÓLISE MORFOLÓGICA E FUNCIONAL EM VACAS
SUPEROVULADAS E NÃO SUPEROVULADAS

4. Capítulo 02 - Luteólise morfológica e funcional em vacas superovuladas e não superovuladas

4.1. Resumo

O objetivo deste estudo foi analisar a luteólise morfológica e funcional em vacas superovuladas e não superovuladas. Vacas da raça Holandesa (N=03) e da raça Brahman (N=03) (GT) foram superovuladas pela aplicação de 400 UI de FSH (Pluset[®]) em doses decrescentes, e três dias após a coleta dos embriões (D10) receberam uma aplicação de 0,5mg de cloprostenol sódico (Ciosin[®]). Vacas mestiças (GC) (N=8) foram sincronizadas e receberam a aplicação de luteolítico no momento do ciclo semelhante (D10) ao das doadoras. A luteólise foi monitorada pela concentração plasmática de progesterona e LH e pelo acompanhamento ultrassonográfico da regressão luteal com aparelho de ultrassonografia (Águila Vet[®]) equipado com probe de 8,0 MHz. Os valores de concentração de P4, LH, tamanho médio dos corpos lúteos e área luteal total foram avaliados por análise de variância e diferenças entre médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A concentração de progesterona em ambos os grupos regrediu a valores abaixo de 1ng/mL. A concentração de LH apresentou elevação de seus valores séricos em ambos os grupos. O tamanho médio luteal e a área luteal total apresentaram redução em ambos os grupos. Conclui-se que o padrão de regressão morfológica e funcional na luteólise induzida em animais superovulados é semelhante ao observado em animais não superovulados, contudo o maior volume de tecido luteal e as conseqüentes elevadas concentrações de P4 podem retardar o restabelecimento do padrão de liberação de LH e manifestações de estro.

Palavras-chave: Superovulação, luteólise, progesterona, LH, corpo lúteo, bovino

4.2. Abstract

The objective of this study was to analyze the morphological and functional luteolysis in cows superovulated and non superovulated. Holstein cows (N = 03) and Brahman cows (n = 03) (GT) were superovulated by the application of 400 IU of FSH (Pluset®) in decreasing doses, and three days after collection of embryos (D10) received an application of 0.5 mg cloprostenol (Ciosin®) IM . Crossbred cows (GC) (N = 8) were synchronized and received the application of luteolytic at the same time of the cycle (D10) to the donors. The luteolysis was monitored in samples of plasma progesterone and LH, and ultrasound for monitoring of luteal regression with ultrasonography equipment (Aquila Vet, Esaote Piemedical) equipped with 8.0 MHz probe). The values obtained from progesterone and LH concentration, average size of CLs and total luteal area were evaluated by analysis of variance and differences between means compared by Tukey test (P <0.05). The concentration of progesterone in both groups decreased to values below 1ng/mL (P <0.05). LH concentrations showed elevated values in plasmatic concentration in both groups. The medium luteal size and luteal total area were reduced in both groups. We conclude that the pattern of morphological and functional regression in induced luteolysis in superovulated animals is similar to that observed in non-superovulated, however the bulk of luteal tissue and the resulting high concentrations of progesterone may delay the resumption of the pattern of LH release and manifestations of estrus.

Key works: Superovulation, luteolysis, progesterone, LH, corpus luteum, cows

4.3. Introdução

A transferência de embriões (TE) em bovinos surgiu como ferramenta para ampliar as taxas de reprodução de fêmeas de elevado padrão zootécnico (RUMPF, 2007), uma vez que se podem melhorar as taxas de reprodução e encurtar o intervalo de gerações (CALLESEN et al., 1996). Assim, estes animais podem ser utilizados de uma forma mais racional, fornecendo um grande número de descendentes, num curto espaço de tempo (LEAL et al., 2009). Quanto maior o número de embriões viáveis produzidos, maior será o número de crias geradas por ano (JONES e LAMB, 2008). No entanto, a técnica de transferência de embriões apresenta grandes variações na resposta superovulatória das doadoras (BARROS e NOGUEIRA, 2004).

Vários estudos foram conduzidos no intuito de melhorar a eficiência da técnica de superovulação, sendo considerado como eficaz o tratamento que produz duas ou mais ovulações. O resultado esperado da superovulação é induzir o crescimento de vários folículos produzindo um aumento do número fisiológico de ovulações próprias da espécie e obter um número correspondente de embriões viáveis, que resultem em uma elevada taxa de gestação nas receptoras (SINGH et al., 2004).

Porém, além dos problemas relacionados à técnica de superovulação, ainda há que se considerar o retorno a atividade ovariana normal das doadoras. LUCY et al. (1990) descrevem que a presença de numerosos CLs em animais superovulados cria um ambiente de feed back negativo de P4, comprometendo assim o retorno a atividade ovariana normal, promovendo alterações na função reprodutiva destes animais, em função da massa de tecido luteal formada e de desequilíbrios endócrinos no eixo hipotalâmico - hipofisário - gonadal. Estas alterações retardam o retorno das doadoras ao regime de coleta de embriões (VIANA et al., 1997).

Este trabalho teve por objetivo comparar a progressão da luteólise morfológica e funcional em vacas superovuladas e não superovuladas, e a consequência desta sobre o padrão de liberação de LH.

4.4. Material e Métodos

4.4.1. Localidade

Os experimentos foram realizados no Campo Experimental de Coronel Pacheco – MG, unidade experimental do Centro Nacional de Pesquisas de Gado de Leite da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA – Gado de Leite) e no Sítio da Liberdade (Brahman Trasmontana) em Santana do Deserto – MG. O grupo de animais pertencentes à EMBRAPA estava em lactação, recebendo como alimentação silagem de milho, concentrado e mineralização adequada. Os animais utilizados no Sítio da Liberdade eram alimentados à pasto, em pastagens de *Brachiaria decumbens* com suplementação diária, sempre na parte da manhã de silagem de milho e concentrado, além da mineralização adequada.

O período de coleta de dados (sincronização, superovulação, coleta de embriões e coleta de sangue das doadoras e grupo controle) foi de 20 de abril a 31 maio de 2009.

4.4.2. Delineamento Experimental

Animais da raça holandesa (N=03) e da raça Brahman (N=03) de elevado mérito genético, utilizados em rotina como doadoras para a produção in vivo de embriões foram utilizados como grupo animais superovulados (N=06). Sendo estes animais superestimuladas pela aplicação de 400 UI de FSH⁶ (Pluset[®]) em doses decrescentes e induzidas a ovulação pela administração de PGF_{2α} juntamente com a 6^a e 7^a dose de FSH. Os animais foram inseminados 12 e 24 horas após a observação do estro e a coleta dos embriões foi realizada sete dias após primeira observação dos animais em estro. A indução da luteólise foi realizada pela aplicação IM de 0,5mg de cloprostenol sódico (Ciosin[®], Schering Plough Coopers, Brasil) no décimo dia após inseminação (D10).

Vacas mestiças Holandês – Zebu (N=08), cíclicas, em produção, mantidas em pastagem de *Brachiaria decumbens*, seguindo o manejo nutricional adotado pela

⁶ Hertape Calier Saúde Animal S.A., Brasil.

Embrapa Gado de Leite tendo fornecimento de água e sal mineral *ad libitum*, passaram inicialmente por avaliação ultrassonográfica e os animais que apresentavam corpos lúteos nos ovários, receberam uma aplicação IM de 0,5mg de cloprostenol sódico⁷ (Ciosin[®]) para promover a sincronização do estro. Após a aplicação do luteolítico os animais foram mantidos em piquete de fácil acesso e observação, e duas vezes ao dia por 30 minutos foi observada a manifestação de estro, e os animais que manifestaram estro neste foram selecionados para fazerem parte do Grupo Controle (GC). No décimo dia (D10) após a identificação do estro, os animais foram novamente avaliados por ultrassonografia transretal para confirmação da presença de CL e receberem identificação visual. Imediatamente após a avaliação ultrassonográfica, os animais receberam uma segunda aplicação IM de 0,5mg de cloprostenol sódico⁷ (Ciosin[®]) para avaliação da progressão da luteólise. O produto luteolítico utilizado em ambos os tratamentos (GT e GC) era mesma partida, data de validade e fabricante. A luteólise foi monitorada pela concentração plasmática de progesterona, exames ultrassonográficos e dosagem de LH.

4.4.3. Dosagem de progesterona plasmática

Amostras de sangue foram coletadas por punção da artéria ou veia coccígea utilizando-se tubos de 4,5 mL com vácuo, contendo K₃EDTA⁸ (Labor Import[®]), e armazenadas em recipiente isotérmico contendo gelo (4-5°C). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 480 G durante 15 minutos para a separação do plasma, e o sobrenadante foi pipetado, dividido em duas alíquotas, acondicionado em criotubos de 1,5 mL devidamente identificados com o número do animal e data da coleta, e congelados e estocados a -20°C até o momento de realização das análises.

As amostras foram coletadas a partir do dia aplicação do luteolítico, sendo a primeira coleta realizada imediatamente antes do tratamento e as demais a cada 24 horas, perfazendo um total de cinco amostras por (D0, D1, D2, D3, D4). As análises da concentração plasmática de progesterona foram realizadas com auxílio de um

⁷ 0,25 mg/mL Cloprostenol Sódico, Ciosin[®], Schering-Plough Coopers, Brasil.

⁸ Labor import[®], Osasco, SP, Brasil

contador gama⁹ (Gammatec 600), utilizando-se kits comerciais¹⁰ para radioimunoensaio em fase sólida e progesterona marcada com I¹²⁵. O procedimento realizado para determinação de P4 plasmática foi semelhante ao utilizado no experimento 01. O coeficiente de variação intra ensaio foi de 18,6% e o coeficiente de variação inter ensaios foi de 2,75% e a sensibilidade de 0,02 ng/mL.

4.4.4. Dosagem do LH endógeno

As coletas de sangue foram realizadas de forma semelhante à coleta sangue para determinação da P4 plasmática, porém as amostras de sangue para a determinação da concentração de LH foram coletadas em intervalos de 20 minutos durante uma hora (três amostras) por cinco dias, sendo a primeira coleta foi realizada anteriormente à aplicação do luteolítico, tanto no GT quanto no GC.

Para realização dos ensaios hormonais para quantificação de LH o material foi enviado para o Laboratório de Endocrinologia Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Araçatuba, São Paulo. A metodologia de análise usada é a metodologia descrita por Bolt e Rollins (1983) e Bolt et al. (1990). Para o ensaio foram utilizados USDA-bLH-B-6 para iodinação e padrões de referência e USDA-309-684p como anticorpo. Os coeficiente de variação inter ensaios e intra ensaio foram de 10,70% e 2,95% respectivamente.

4.4.5. Avaliação ultrassonográfica dos corpos lúteos

A avaliação ultrassonográfica dos CLs formados nos ovários foi realizada uma vez ao dia a partir do décimo (D10) até o 15º dias (D15) pós estro, utilizando-se um aparelho portátil de ultrassonografia (Aquila Vet, Esaote Piemedical) equipado com uma probe retal de 8,0MHz. Imagens de vários planos ultrassonográficos foram usadas para determinar a quantidade de CLs e suas respectivas áreas de sessão transversal. As imagens obtidas foram congeladas e armazenadas em um cartão de

⁹ Gammatec model 600, The Nucleus, Inc., Oak Ridge, TN, USA.

¹⁰ Kit de Progesterona, Coat-a-Count, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Los Angeles, CA, USA.

memória (512 MB) ¹¹ acoplado ao aparelho de ultra-som e a área correspondente ao CL mensurada, no próprio ultra-som, utilizando a função específica, sendo descontada a área correspondente à cavidade central, caso houvesse. As imagens foram posteriormente transferidas por meio de um leitor de cartões de memória para o disco rígido de um computador portátil¹².

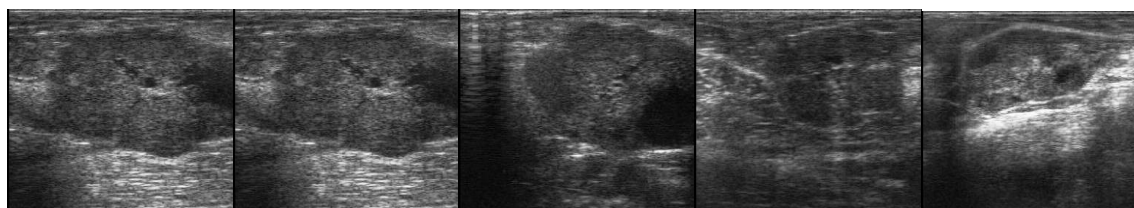


Figura 01 – D10

Figura 02 – D11

Figura 03 – D12

Figura 04 – D13

Figura 05 – D14

Figuras 01 a 05 – Seqüência de imagens ultrassonográficas de ovário de animal superovulado após luteólise induzida no D10.

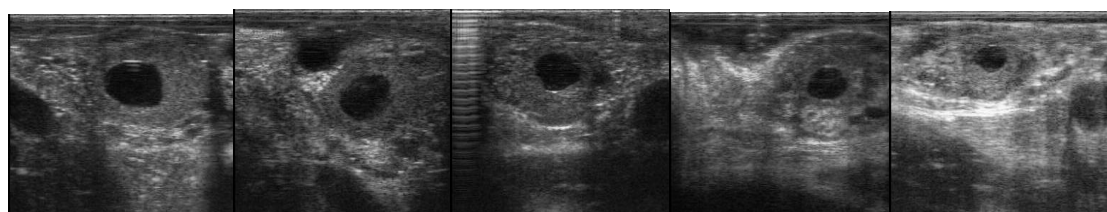


Figura 06 – D10

Figura 07 – D11

Figura 08 – D12

Figura 09 – D13

Figura 10 – D14

Figuras 06 a 10 – Seqüência de imagens ultrassonográficas de ovário de animal não superovulado após luteólise induzida no D10.

¹¹ Esaote Piemedical® - Maastricht, The Netherlands, Memory Card, 512MB

¹² SIM⁺ Positivo®, Brasil, HD 320 GB, 3GB de memória RAM, Processador Intel Pentium Dual Core® 2,70 GHz

4.4.6. Análises Estatísticas

Os parâmetros concentração plasmática de P4 e LH, tamanho médio dos CLs, e volume luteal total foram submetidos à análise de variância, e as diferenças entre médias comparadas dentro dos tratamentos pelo teste de Tukey e entre tratamentos pelo teste F ao nível de 5% de significância. Os dados experimentais foram analisados usando-se o programa SAEG – Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (EUCLIDES, 2007).

4.5. Resultados

A concentração de P4 no declinou ao longo do tratamento, tanto em GT ($P<0,05$), quanto em GC ($P<0,05$), conforme descrita na tabela 1:

Tabela 1 – Concentração plasmática de P4, em ng/mL, após a indução da luteólise (hora 0) no 10º dia após o estro em animais superovulados (GT) ou não superovulados (GC).

Horas após a indução	GT(N=06)	GC(N=08)
0	51,12±12,96 aA	5,95±0,58 aB
24	5,10±0,92 bA	1,14±0,09 bB
48	2,77±0,61 bA	0,68±0,16 bB
72	1,81±0,59 bA	0,36±0,24 bB
96	0,96±0,32 bA	0,37±0,24 bA

a,b Valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($P<0,05$)

A,B Valores seguidos de letras diferentes, na mesma linha, diferem ($P<0,05$)

Os valores de concentração plasmática de LH sofreram elevação ($P<0,05$) em GT, porém tal aumento se deu em maior intensidade ($P<0,05$) em GC, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2 – Concentração plasmática de LH, em ng/mL, após a indução da luteólise (hora 0) no 10º dia após o estro em animais superovulados (GT) ou não superovulados (GC).

Horas após a PGF	GT(n=06)	GC(n=08)
0	1,55±0,13 aA	1,55±0,13 aA
24	1,81±0,14 aA	2,35±0,16 aB
48	1,70±0,13 aA	2,17±0,22 aA
72	1,78±0,12 aA	2,48±0,30 aA
96	1,92±0,09 aA	5,02±1,92 aA

a,b Valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($P<0,05$)

A,B Valores seguidos de letras diferentes, na mesma linha, diferem ($P<0,05$)

O tamanho médio dos corpos lúteos declinou tanto em GT ($P<0,05$) quanto em GC ($P<0,05$) conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 – Tamanho médio do(s) corpo(s) lúteo(s), em cm^2 , após a indução da luteólise (hora 0) no 10º dia após o estro em animais superovulados (GT) ou não superovulados (GC).

Horas após a PGF	GT(n=06)	GC(n=08)
0	1,83±0,11 aA	3,53±0,35 aB
24	1,29±0,11 bA	2,34±0,18 bB
48	0,98±0,07 bcA	2,07±0,15 bB
72	0,74±0,07 cA	1,53±0,07 bcB
96	0,68±0,07 cA	1,05±0,06 cB

a,b Valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($P<0,05$)

A,B Valores seguidos de letras diferentes, na mesma linha, diferem ($P<0,05$)

A Área luteal total, que representa a somatória de todas as áreas de todos os CLs mensurados por animal, sofreu uma redução tanto em GT ($P<0,05$) quanto em GC ($P<0,05$). Os dados da tabela 4 descrevem a variação da área ao longo do tratamento.

Tabela 4 – Área luteal total, em cm^2 , após a indução da luteólise (hora 0) no 10º dia após o estro em animais superovulados (GT) ou não superovulados (GC).

Horas após a PGF	GT(N=06)	GC(N=08)
0	29,83±7,01 aA	3,53±0,35 aB
24	19,07±3,73 abA	2,34±0,18 bB
48	13,49±1,99 bA	2,07±0,15 bB
72	9,61±1,68 bA	1,53±0,07 bcB
96	7,57±0,95 bA	1,05±0,06 cB

a,b Valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($P<0,05$)

A,B Valores seguidos de letras diferentes, na mesma linha, diferem ($P<0,05$)



Figura 11 (a-d) – Resposta à indução da luteólise (hora 0) no 10^o dia após a manifestação de estro em animais superovulados (GT) e não superovulados (GC). a: área luteal total; b: área média da sessão transversal do(s) corpo(s) lúteo(s); c: concentração de progesterona plasmática; d: concentração de LH plasmático.

4.6. Discussão

Estudos descrevem que o uso da dosagem de P4 em fluidos biológicos (plasma, leite, soro sanguíneo, soro de leite) como uma medida confiável e de grande sensibilidade para determinar a ação de agentes luteolíticos em ruminantes (VERONESI et al., 2002), e a associação da dosagem de P4 em fluidos com a análise de imagens ultrassonográficas (SIQUEIRA et al., 2009), pode demonstrar não só a luteólise funcional (queda de produção de P4) mas também a luteólise morfológica (redução tecido luteal).

Assim no presente estudo a utilização do plasma sanguíneo para determinação da dosagem de P4 e de LH associada à análise de imagens ultrassonográficas foram empregadas para identificar diferenças na progressão da luteólise morfológica e funcional em vacas superovuladas e não superovuladas.

Observou-se a redução do tamanho médio e área luteal total em ambos os tratamentos ($P < 0,05$), sendo que as induções das modificações morfofisiológicas nos CLs possam ter ocorrido por meio da redução na vascularização tecidual e morte celular por apoptose, lembrando que a ação principal do luteolítico na regressão luteal se dá sob os receptores das células luteais grandes.

A luteólise estrutural desencadeou processo de degradação tecidual, levando a diminuição da área luteal total no grupo GT e no GC. Resultados demonstrando redução da área luteal total após a aplicação de luteolítico também foram observados em estudos com animais não superovulados (STOCCO et al., 2007), porém, no presente estudo há uma observação conjunta da queda da área luteal total tanto em animais superovulados quanto em animais não superovulados, indicando que mesmo em condições de maior área luteal total (animais superovulados – GT) o comportamento de redução após indução da luteólise não se diferencia de animais com menor área luteal inicial (animais não superovulados – GC).

Os valores iniciais de tamanho médio dos corpos lúteos são maiores no GC que nos animais do GT. Tal diferença tem relação com a limitação física de espaço para crescimento dos CLs dos animais superovulados, onde há o desenvolvimento de grande número de estruturas, e tal fator gera uma limitação física para o

desenvolvimento da massa do tecido luteal, ao passo que os animais não superovulados não apresentam tal limitação para o desenvolvimento da área luteal.

Houve redução dos valores médios de tamanho do CL e também das concentrações plasmáticas de P4 após a indução de luteólise no GT e no GC. A associação da redução do tamanho médio do CL, por meio do acompanhamento de imagens ultrassonográficas, com a queda da produção de P4 é possível, sendo que há relação entre a concentração de P4 e o volume do CL (CHALHOUB et al., 2007; RIBEIRO FILHO et al., 2007), e durante o ciclo estral os níveis de P4 refletem o crescimento, manutenção funcional e regressão do CL (LEAL et al., 2009), e a avaliação permite a associação das características morfológicas do CL ao ultrassom com o seu estado funcional. No presente estudo, notou-se redução da área luteal total, redução da área médio luteal em associação com redução de dosagem de progesterona, demonstrando assim, associação entre queda de P4 e redução tamanho CL.

As concentrações de P4 após a indução da luteólise apresentaram redução significativa nas primeiras 24 horas, sendo o comportamento do GT semelhante ao do GC. O cloprostenol apresenta ação anti-esteroidogênica direta, aumentando o catabolismo e reduzindo a síntese de P4, onde a queda da concentração de P4 se deve à ação do luteolítico em receptores específicos na membrana das células luteais interrompendo a produção de P4 (NISWENDER et al., 2000; MARTIN e FERREIRA, 2009) e esta ação independe da ação luteolítica que envolve a apoptose das células luteais e o remodelamento tecidual.

As concentrações plasmáticas de P4 apresentadas tanto no GT quanto no GC demonstraram valores de abaixo de 1ng / mL, confirmando eficiência da luteólise, sendo nos animais do GT 96 horas após aplicação de luteolítico ($0,96 \pm 0,32$ ng / mL), e nos animais do GC 48 horas após aplicação do luteolítico ($0,68 \pm 0,16$ ng / mL). O parâmetro indicativo de presença de CL funcional descrito por COLAZO et al. (2002) e BICALHO et al. (2008) é a identificação de concentrações séricas de P4 ≥ 1 ng / mL. O fato de o GC apresentar indicativos de luteólise (valores de P4 ≤ 1 ng/mL) num momento anterior ao GT está associado ao volume luteal total, que inicialmente é maior no GT ($29,83 \pm 7,01$ cm²), em função da presença de vários CLs em decorrência do tratamento superovulatório.

Os dados de mensuração de área luteal total, concentração de P4 e de tamanho médio apresentam resultado semelhante ao encontrado por LEAL et al (2009) em animais não superovulados, com redução da atividade luteal (queda de P4), acompanhada de redução de volume total e de tamanho médio, tanto no GT quanto no GC.

A concentração plasmática de LH apresentou valores semelhantes no momento anterior à indução da luteólise tanto em GC quanto em GT ($1,55 \pm 0,13 \text{ ng/mL}$) sendo que em GT os valores se mantiveram constantes, ao passo que em GC ocorreu elevação ($P < 0,05$). Desta forma, houve influencia da concentração de P4 sobre o restabelecimento do padrão de liberação de LH. De forma coerente com outros trabalhos, que relatam que a superexposição a altas concentrações circulantes de progesterona pode afetar o padrão de pulsatilidade de LH (CARVALHO et al., 2008). Assim, no GT os valores elevados de P4 resultaram em um prolongamento do efeito de feedback negativo no hipotálamo, retardando os pulsos de LH, que resulta em retardo do retorno da atividade do LH no organismo.

4.7. Conclusões

O padrão de regressão morfológica e funcional na luteólise induzida em animais superovulados é semelhante ao observado em animais não superovulados, contudo o maior volume de tecido luteal e as conseqüentes elevadas concentrações de P4 retardam o restabelecimento do padrão de liberação de LH e manifestações de estro.

4.8. Referências

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Superovulação em zebuínos de corte. IN: **1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina, p. 212-222, 2004.

BICALHO, R. C.; GALVÃO, K. N.; GUARD., C. L.; SANTOS, J. E. P. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, p.199-207, 2008.

BOLT, D. J.; ROLLINS, R. Development and application of a radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone. **Journal of Animal Science**, v. 56, p. 146-154, 1983.

BOLT, D. J.; SCOTT, V.; KIRACOFÉ, G. H. Plasma LH and FSH after estradiol, norgestomet and GnRH treatment in ovariectomized beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, p. 263-271, 1990.

CALLESEN, H.; LIBORIUSSEN, T. ;GREVE, T. Practical aspects of multiple ovulation-embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 215-226, 1996.

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; A.H. SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.

CHALHOUB, M. C.; RIBEIRO FILHO, A. L.; VASCONCELOS, L. V.; PEREIRA, D. F. C.; SANTANA, R. C. M.; CARVALHO, P. M.; GUSMÃO, A. L. Influência da qualidade do corpo lúteo de receptoras de embrião bovino sobre a taxa de prenhez. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, Supl. 3, p.1251, 2007.

COLAZO, M. G.; MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 72, p. 47-62, 2002.

EUCLIDES, R, F. SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

JONES, A. L.; LAMB, G. C. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v.69, p. 107–115, 2008.

LEAL, L. S.; OBA, E.; FERNANDES, C. A. C.; SÁ FILHO, O. G. Avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 174-183, 2009.

LUCY, M. C.; MACMILLAN, K. L.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; TAN, H. S. Effect of timing of prostaglandin PGF₂α injection subsequent to embryo collection on the resumption of normal follicular development following superovulatory treatment in cattle. **Theriogenology**, v. 34, p. 7-19, 1990.

MARTIN, I.; FERREIRA, J. C. P. Fisiologia da ovulação e da formação do corpo lúteo bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p. 270-279, 2009.

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

RIBEIRO FILHO, A. L.; CHALHOUB, M. C.; SANTANA, R. C. M.; PEREIRA, D. F. C.; VASCONCELOS, L. V.; PORTELA, A. P. M.; GUSMÃO, A. L. Avaliação do lado da ovulação em relação à qualidade do corpo lúteo e influência do lado da inovulação sobre a taxa de prenhez em receptoras de embriões bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, Supl. 3, p. 1253, 2007.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 229 – 233, 2007.

SINGH, J.; DOMÍNGUEZ, M.; JAISWAL, R.; ADAMS, G. P. A simple ultrasound test to predict the super stimulatory response in cattle. **Theriogenology**, v. 62, p. 227-243, 2004.

SIQUEIRA, L. G. B.; TORRES, C. A. A.; SOUZA, E. D.; MONTEIRO Jr., P. L. J.; ARASHIRO, E. K. N.; CAMARGO, L. S. A.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. **Theriogenology**, v. 72, p. 949-958, 2009.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, v. 28, p. 117–149, 2007.

VERONESI, M. C.; GABAI, G.; BATTOCHIO, M.; MOLLO, A.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Ultrasonographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows. **Theriogenology**, v. 58, p. 61-68, 2002.

VIANA, A. K. M. ; VIANA, J. H. M. ; BITENCOURT, F. J. L. ; LOPES, E. O. Fatores que afetam o restabelecimento da atividade ovariana cíclica após a superovulação em doadoras de embrião da raça holandesa. **Ciência Animal**, v. 7, p. 125-125, 1997.

5. CONCLUSÕES GERAIS

O efeito do luteolítico na indução da luteólise em animais superovulados no D10 ($P < 0,05$), se mostrou mais eficiente para indução da regressão luteal em vacas superovuladas para coleta de embriões, que o tratamento no D7, por permitir uma luteólise completa morfológica e funcional, resultando em concentrações de P4 plasmáticas abaixo de 1 ng / mL.

O tratamento superovulatório, mesmo levando a formação de vários CLs, e de grande massa de tecido luteal, não influenciou na taxa de luteólise apresentada em doadoras, uma vez que, a indução da luteólise nestes animais apresentou as mesmas características de redução de níveis plasmáticos de progesterona (que são indicativos de luteólise funcional, quando atinge valores abaixo de 1 ng/mL) que animais cíclicos não superovulados com luteólise induzida no mesmo momento (D10 do ciclo).

Os valores de área média do CL e volume luteal total também apresentaram regressão, tanto em GT quanto em GC, demonstrando a regressão de massa luteal (luteólise morfológica).

Desta maneira, animais superovulados apresentaram padrões de regressão de concentrações de P4 e de área e volume luteal que são indicativos de luteólise funcional e morfológica semelhantes a animais não superovulados. Porém, o maior volume de tecido luteal e as conseqüentes elevadas concentrações de P4 podem retardar o restabelecimento do padrão de liberação de LH e manifestações de estro.

6. REFERÊNCIAS

ALCANTARA, B.; BOETA, M.; PORRAS, A. Luteolysis, estrus induction, and clinical side effects in mares treated with a PGF₂ α analog, cloprostenol (Sinocrel 11-21). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 25, p. 384-386, 2005.

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. Reprodução em bovinos. São Paulo – SP, **Editora Roca**, 3ª Edição, 232 p., 2006.

BAKER, B. Y.; EPAND, R. F.; EPAND, R. M.; MILLER, W. L. Cholesterol binding does not predict activity of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 14, p. 10223–10232, 2007.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1483 – 1496, 2001.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Superovulação em zebuínos de corte. IN: **1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina, p. 212-222, 2004.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, P. 305–317, 2005.

BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H.; TRALDI, A. S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 824-840, 2006.

BICALHO, R. C.; GALVÃO, K. N.; GUARD., C. L.; SANTOS, J. E. P. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, p.199-207, 2008.

BODENSTEINER, K. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER O. J. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 45, p. 1115 - 1126, 1996.

BOLT, D. J.; ROLLINS, R. Development and application of a radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone. **Journal of Animal Science**, v. 56, p. 146-154, 1983.

BOLT, D. J.; SCOTT, V.; KIRACOFÉ, G. H. Plasma LH and FSH after estradiol, norgestomet and GnRH treatment in ovariectomized beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, p. 263-271, 1990.

BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M.; JÚNIOR, V. R. R.; CARVALHO, G. R.; FONSECA, J. F.; NETO, A. M.; ASSIS, A. J. Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.85-92, 2003.

BUTLER, W. R. Inhibition of ovulation in the postpartum cow and the lactating sow. **Livestock Production Science**, v. 98, p. 5-12, 2005.

CALLESEN, H.; LIBORIUSSEN, T. ;GREVE, T. Practical aspects of multiple ovulation-embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 215-226, 1996.

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; A.H. SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.

CEMBRANELLI, M. A. R. Eficiência de duas doses de D-Cloprostenol para sincronização de estro em bovinos nas diferentes fases do ciclo estral. 2005. 34p.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade José do Rosário Velano, Alfenas – MG, 2005.

CHALHOUB, M. C.; RIBEIRO FILHO, A. L.; VASCONCELOS, L. V.; PEREIRA, D. F. C.; SANTANA, R. C. M.; CARVALHO, P. M.; GUSMÃO, A. L. Influência da qualidade do corpo lúteo de receptoras de embrião bovino sobre a taxa de prenhez. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, Supl. 3, p.1251, 2007.

CHRISTENSON, L. K.; DEVOTO, L. Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 01, p.1-9, 2003.

COLAZO, M. G.; MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 72, p. 47-62, 2002.

COLAZO, M. G.; REE, T. O.; EMMANUEL D. G. V.; AMBROSE, D. J. Plasma luteinizing hormone concentrations in cows given repeated treatments or three different doses of gonadotropin releasing hormone. **Theriogenology**, v. 71, p. 984-992, 2009.

COLLINS, P. W.; DJURIC, S. W. Synthesis of therapeutically useful prostaglandin and prostacyclin analogs. **Chemical Reviews**, v. 93, p. 1533-1564, 1993.

CROWE, M. A. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows, **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43 (suppl. 5), p. 20-28, 2008.

CUSHMAN, R. A.; DESOUZA, J. C.; HEDGPETH, V. S.; BRITT, J. H. Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 349-354, 1999.

DELAZARI, J. A.; FONSECA, F. A.; QUEIROZ, A. C.; PEREIRA, J. C.; CECON, J. C. Desempenho reprodutivo, concentrações de progesterona e metabólitos lipídicos no

pós-parto de vacas mestiças H/Z, submetidas a uma dieta hiperlipidêmica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 413-420, 2000.

DESAULNIERS, D. M.; GUAY, P.; VAILLANCOURT, D. Estrus induction with prostaglandin F_{2α}, cloprostenol or fenprostalene during the normal estrous cycle, superovulation and after embryo collection. **Theriogenology**, v. 34, p.667-682, 1990.

DIAZ, F. J.; ANDERSON, L. E.; WU, Y. L.; RABOT, A.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Regulation of progesterone and prostaglandin F_{2α} production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, p. 65-80, 2002.

EUCLIDES, R, F. SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

FERNANDES, C. A. C.; FIGUEIREDO, A. C. S. Avanços na utilização de prostaglandinas na reprodução de bovinos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.31, p.406-414, 2007.

FIGUEIREDO, M. M. N.; FONSECA, F. A; TORRES, C. A. A.; GALIMBERT, A. M.; ALMEIDA, C. A. Dinâmica folicular ovariana de vacas leiteiras nos pós-partos após o tratamentos com buserelina (GnRH) e cloprostenol (PGF_{2α}). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.725-731, 2000.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BAERWALD, A. R.; PIERSON, R. A. Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. **Reproduction**, v. 130, p. 379–388, 2005.

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

GIOSO, M. M.; COSTA, E. P.; FERNANDES, C. A. C.; TORRES, C. A. A., CARVALHO, G. R. Perfil de progesterona e intervalo ao estro de receptoras bovinas sincronizadas com doses reduzidas de cloprostenol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1181-1187, 2005.

GORDON, I. R. Reproductive Technologies in Farm Animals. Trowbridge Reino Unido, **CABI Publishing** – 1ª Edição, 332 p., 2005.

HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal, São Paulo – SP, **Editora Manole**, 6ª Edição, 582 p., 1995.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006 – Dados Preliminares**, Rio de Janeiro, p.1-146, 2006

JONES, A. L.; LAMB, G. C. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v.69, p. 107–115, 2008.

JORDAN, A.; HERZOG, K.; ULBRICH, S., E.; BEINDORFF, N.; HONNENS, Ä.; KRÜGER, L.; MIYAMOTO, A.; BOLLWEIN, H. Genital blood flow and endometrial gene expression during the preovulatory period after PGF2 α - induced luteolysis in different luteal phases in cows. **Journal of Reproduction and Development**, v.1, p.1-29, 2009.

KAFI, M.; MCGOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 137- 157, 1997.

KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W. M.; SCHAMS D.; MIYAMOTO, A. Production and localization of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 α . **Journal of Endocrinology**, v. 170, p. 369–380, 2001.

KOBAYASHI, S.; ACOSTA, T. J.; OZAWA, T.; HAYASHI, K.; BERISHA, B.; OHTANI, M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Intraluteal release of angiotensin II and

progesterone in vivo during corpora lutea development in the cow: effect of vasoactive peptides. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 174–179, 2002.

KULICK, L. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GUINTER, O. J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, v. 52, p. 913 – 951, 1999.

LEAL, L. S.; OBA, E.; FERNANDES, C. A. C.; SÁ FILHO, O. G. Avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 174-183, 2009.

LOONEY, C.R.; NELSON, J.S.; SCHNEIDER, H. J.; FORREST, D. W. Improving fertility in beef cow recipients. **Theriogenology**, v. 65, p. 201–209, 2006.

LUCY, M. C.; MACMILLAN, K. L.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; TAN, H. S. Effect of timing of prostaglandin PGF₂α injection subsequent to embryo collection on the resumption of normal follicular development following superovulatory treatment in cattle. **Theriogenology**, v. 34, p. 7-19, 1990.

MARGALIT, A.; HAUSER, S. D.; ZWEIFEL, B. S.; ANDERSON, M. A.; ISAKSON, P.C. Regulation of prostaglandin biosynthesis in vivo by glutathione. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 274, p. 294-302, 1998.

MAROTTA, E.; RIGHI, P.; ROSINI, G. A bicyclo [3.2.0] hept-3-en-6-one approach to prostaglandin intermediates. **Organic Letters**, v. 2, p. 4145-4148, 2000.

MARTIN, I.; FERREIRA, J. C. P. Fisiologia da ovulação e da formação do corpo lúteo bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p. 270-279, 2009.

MIAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; SASAHANA, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 159–169, 2009.

MISRA, A. K.; PANT, H. C. Estrus induction following PGF₂ α treatment in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 59, p. 1203-1207, 2003.

MORAES, J. C.; SOUZA, C. J. H.; GONÇALVES, P. B. D.; FREITAS, V. J. F.; JÚNIOR, E. S. L. Controle do estro e da ovulação em Ruminantes. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. São Paulo, Roca, p.33-56, 2008.

MURPHY, B. D. Models of luteinization. **Biology of reproduction**, v. 63, p. 2–11, 2000.

NISHIMURA, R.; SAKUMOTO, R.; TATSUKAWA, Y.; ACOSTA, T. J.; OKUDA, K. Oxygen concentration is an important factor for modulating progesterone synthesis in bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v. 147, p. 4273–4280, 2006.

NISHIMURA, R.; KOMIYAMA, J.; TASAKI, Y.; ACOSTA, T., J.; OKUDA, K. Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 529-536, 2008.

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

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

OKUDA, K.; SAKUMOTO, R. Multiple roles of TNF super family members in corpus luteum function. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 1-7, 2003.

OLIVEIRA, J. L. S.; SOARES, R. D.; ROCHA, F. A.; ROMERO, V. L.; PRADO, F. R. A. Superovulação em bovinos. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v.08, p. 1-6, 2007.

PETER, A. T.; LEVINE, H.; DROST, M.; BERGFELT, D. R. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 71, p. 1343-1357, 2009.

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; ANDRADE, J. C. O.; TEÓFILO FILHO, F.; SANTOS, M. H. B.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; MEIRINHOS, M. L. G.; SANTOS FILHO, A. S. S. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. São Paulo, Roca, p.201-239, 2008.

RÉPÁSI, A.; BECKERS, J. F.; SULLON, KAREN, A; REICZIGEL, J.; SZENCI, O. Effect of the type and number of prostaglandin treatments on corpus luteum, the largest follicle and progesterone concentration in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 436-442, 2005.

RIBEIRO FILHO, A. L.; CHALHOUB, M. C.; SANTANA, R. C. M.; PEREIRA, D. F. C.; VASCONCELOS, L. V.; PORTELA, A. P. M.; GUSMÃO, A. L. Avaliação do lado da ovulação em relação à qualidade do corpo lúteo e influência do lado da inovulação sobre a taxa de prenhez em receptoras de embriões bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, Supl. 3, p. 1253, 2007.

ROBINSON, R. S.; HAMMOND, A. J.; NICKLIN, L. T.; SCHAMS, D.; MANN; G. E.; HUNTER, M. G. Endocrine and cellular characteristics of corpora lutea from cows with a delayed post-ovulatory progesterone rise. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 31, p.154–172, 2006.

ROMERO, A.; ALBERT, J.; BRINK, Z.; SEIDEL JR., G. E. Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 265, 1991.

RUEDA, B. R.; HENDRY, I. R.; HENDRY III, W. J.; STORMSHAK, F.; SLAYDEN, O. D.; DAVIS, J. S. Decreased progesterone levels and progesterone receptor

antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**, vol. 62, p. 269 – 276, 2000.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 229 – 233, 2007.

SANTIAGO, L. L.; TORRES, C. A. A.; NOGUEIRA, E. T.; COSTA, E. P.; GUIMARÃES, J. D. Folículo dominante e resposta superovulatória em novilhas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p. 363-368, 2002.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 905-920, 2004.

SARTORI, R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira, **Brazilian Journal of Animal Reproduction**, v.31, p.153-159, 2007.

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

SINGH, J.; DOMÍNGUEZ, M.; JAISWAL, R.; ADAMS, G. P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, v. 62, p. 227-243, 2004.

SIQUEIRA, L. G. B.; VIANA, J. H. M.; SOUZA, E. D.; ARASHIRO, E. K. N.; CAMARGO, L. S. A.; FONSECA, J. F.; FERNANDES, C. A. C. Eficiência na indução da luteólise em diferentes dias após a coleta de embriões em bovinos (Resultados parciais). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, Supl. 3, p. 1230, 2007.

SIQUEIRA, L. G. B.; TORRES, C. A. A.; SOUZA, E. D.; MONTEIRO Jr., P. L. J.; ARASHIRO, E. K. N.; CAMARGO, L. S. A.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy

establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. **Theriogenology**, v. 72, p. 949-958, 2009.

SKARZYNSKI, D. J.; JAROSZEWSKI, J. J.; OKUDA, K. Role of tumor necrosis factor- α and nitric oxide in luteolysis in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 340–346, 2005.

SKARZYNSKI, D. J.; G FERREIRA-DIAS, G.; OKUDA, K. Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: Hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 57 – 65, 2008.

SNEL-OLIVEIRA, M.V.; PEREIRA, D.C.; JUNIOR, D. M.; RUMPF, R. Estimulação hormonal, punção folicular transvaginal e avaliação ovocitária em bezerras pré-puberes da raça nelore (*Bos taurus indicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 106 – 114, 2003.

SQUIRES, J. E. Applied animal endocrinology. Trowbridge Reino Unido, **CABI Publishing** – 1ª Edição, 234 p., 2003.

STEVENSON, J. S.; PHATAK, A. P. Rates of luteolysis and pregnancy in dairy cows after treatment with cloprostenol or dinoprost. **Theriogenology**, article in press, 2010.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, v. 28, p. 117–149, 2007.

STROUD, B.; HASLER, J. F. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. **Theriogenology**, v. 65, p. 65-76, 2006.

TANIGUCHI, H.; YOKOMIZO, Y.; OKUDA, K. Fas-Fas ligand system mediates luteal cell death in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 754-759, 2002.

TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F₂ induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: A potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of reproduction**, v. 57, p. 1016-1022, 1997.

VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, p. 307-314, 2001.

VERONESI, M. C.; GABAI, G.; BATTOCHIO, M.; MOLLO, A.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Ultrasonographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows. **Theriogenology**, v. 58, p. 61-68, 2002.

VIANA, A. K. M. ; VIANA, J. H. M. ; BITENCOURT, F. J. L. ; LOPES, E. O. Fatores que afetam o restabelecimento da atividade ovariana cíclica após a superovulação em doadoras de embrião da raça holandesa. **Ciência Animal**, v. 7, p. 125-125, 1997.

VIANA, J. H. M.; VIANA, A. K. M.; BITENCOURT, F. J. L.; LOPES, E. O. Efeito da resposta superovulatória sobre o restabelecimento da atividade ovariana cíclica em doadoras de embrião da raça Holandesa. **Ciência Animal**, v. 7, p. 124-124, 1997.

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

VIANA, J. H. M. Cenário atual da transferência de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* no Brasil e no Mundo. **O Embrião**. Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, n. 29, p.2, 2006.

VIANA, J. H. M.; PALHAO, M. P.; SIQUEIRA, L. G. B.; FONSECA, J. F.; CAMARGO, L. S. A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 73, p. 966–972, 2010.

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

WILTBANK, M. C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1873-1883, 1994.

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

APÊNDICES

Concentração plasmática de progesterona, em ng/mL, de animais tratados no D7, referentes ao Experimento 01

Animal / horas	Progesterona				
	0h	48h	96h	144h	192h
3457	13,71	0,61	0,11	0,00	0,07
3471	33,50	1,24	0,81	0,99	1,38
432	9,43	5,61	7,16	10,39	15,80
475	14,75	3,82	6,75	12,93	11,68
236	11,36	2,20	4,20	4,89	5,21
1493	84,14	1,84	0,81	0,35	0,15
2457	63,72	2,83	1,93	2,71	3,09
3103	45,63	1,00	1,21	1,20	1,49
3221	45,73	2,27	1,59	2,34	
3224	5,65	0,19	0,15		
3252	55,36	1,46	0,44		
3264	7,55	0,35	0,22	0,38	
4219	55,70	1,30	0,14	0,46	0,24
4226	16,30	1,68	3,76	5,12	4,94
4227	11,74	0,15	0,34	0,07	0,04
4237	15,03	0,63	0,37	0,08	
4416	14,21	1,25	0,41	0,25	0,27
6331	15,20	2,92	5,55	6,72	9,29
7216	8,94	2,05	3,80	4,80	7,36
8479	44,73	2,83	0,71	0,86	1,29

Concentração plasmática de progesterona, em ng/mL, de animais tratados no D10, referentes ao Experimento 01

Animal / horas	Progesterona				
	0h	48h	96h	144h	192h
1525	82,62	4,51	0,61	0,03	
2436	84,83	6,89	1,25	0,70	
3446	16,15	1,22	0,40	0,08	0,01
8950	16,93	1,97	0,60	0,17	
6274	10,59	0,72	0,32	0,08	
8954	9,84	0,93	1,89	3,55	
8219	16,00	1,81	0,31	0,03	
816	9,59	0,31	0,12	0,15	
2248	10,67	0,44	0,11	0,13	0,03
2249	100,13	3,08		0,25	
3003	52,77	1,06	0,18	0,03	0,04
3121	65,93	0,74	0,21	0,04	0,04
3223	7,22	0,38	0,05	0,07	
3251	43,58	0,69	0,44		
3351	104,15	1,54	0,48	0,26	0,13
3429	20,98	0,54	0,10	0,09	0,06
5127	26,32	0,91	0,49	0,14	
5230	26,79	0,82	0,14	0,08	
6106	10,42	3,30	1,98	2,02	
7215	11,54	0,58	0,35	0,22	0,22

Concentração plasmática de LH, em ng/mL, de animais superovulados, referentes ao Experimento 02

Animal / horas	LH				
	0h	24h	48h	72h	96h
06	1,87	2,04	2,26	1,90	2,03
17	1,32	1,42	1,28	1,36	1,60
NOV	1,05	1,39	1,56	1,54	2,03
1143	1,74	1,99	1,63	2,20	2,17
5139	1,51	2,24	1,69	1,80	1,75
6149	1,80	1,79	1,80	1,85	1,93

Concentração plasmática de LH, em ng/mL, de animais não superovulados, referentes ao Experimento 02

Animal / horas	LH				
	0h	24h	48h	72h	96h
477	1,76	2,03	1,69	1,86	2,49
1436	2,03	2,53	3,56	4,28	
1556	2,06	3,32	2,38	2,34	13,53
3429	1,05	2,03	2,24	3,11	0,97
4487	1,35	2,21	1,93	1,85	1,41
5471	1,43	2,00	2,00	1,89	2,42
5476	1,19	2,54	1,70	1,98	1,98
5513	1,54	2,18	1,88	2,53	12,32

Tamanho médio do CL, em cm², de animais superovulados, referentes ao Experimento 02

Animal / horas	TAMANHO EM cm ²				
	0h	24h	48h	72h	96h
17	1,76	1,32	0,94	0,92	0,68
06	1,43	1,26	1,21	0,88	0,49
NOV	1,74	1,08	0,78	0,71	0,54
6149	1,64	0,97	0,98	0,41	0,91
5139	1,97	1,39	1,18	0,8	0,8
1143	2,15	1,66	0,85	0,75	0,66

Área luteal total, em cm², de animais superovulados, referentes ao experimento 02

Animal / horas	TAMANHO EM cm ²				
	0h	24h	48h	72h	96h
17	16,95	13,07	8,45	7,01	5,26
06	16,38	13,54	12,59	9,82	5,54
NOV	54,59	31,23	21,77	15,46	8,14
6149	14,63	8,57	8,91	3,91	7,54
5139	29,76	19,26	14,34	8,65	7,23
1143	46,68	28,72	14,86	12,78	11,71

Tamanho médio do CL, em cm², de animais não superovulados, referentes ao experimento 02

Animal / horas	Volume Luteal				
	0h	48h	96h	144h	192h
477	5,16	1,87	2,87	1,32	1,23
1436	2,94	2,11	1,99	1,87	0,79
1556	3,32	2,88	2,13	1,54	1,27
3429	4,47	1,9	1,88	1,4	0,91
4487	3,52	2,71	2,56	1,56	0,95
5471	2,41	2,26	1,61	1,28	1,09
5476	2,36	1,87	1,69	0,98	0,98
5513	4,07	1,83	1,83	1,68	1,14

Concentração plasmática de progesterona, em ng/mL, de animais superovulados, referentes ao Experimento 02

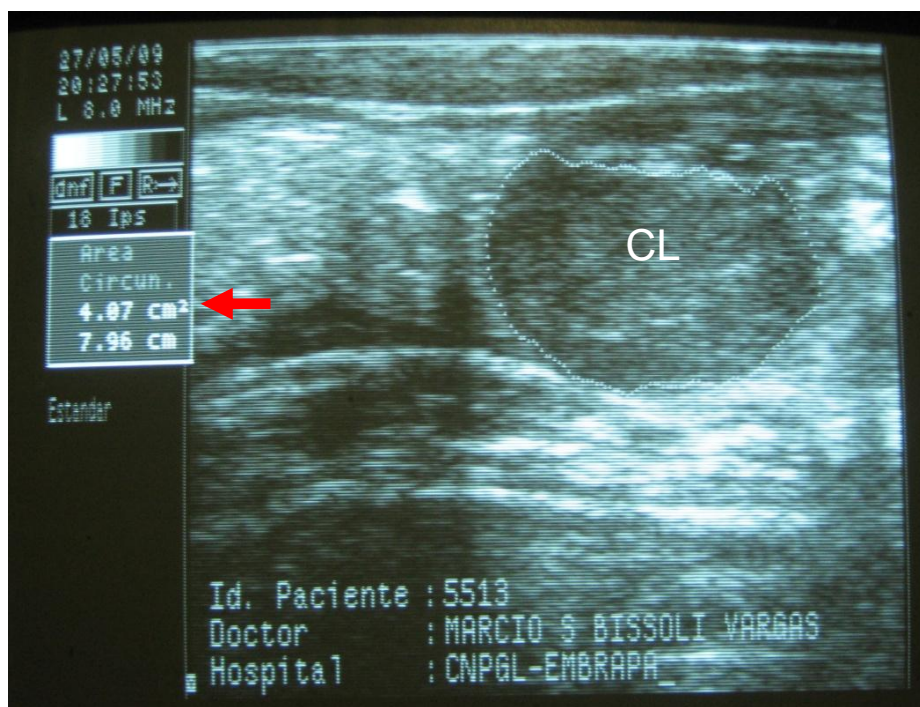
Animal / horas	Progesterona				
	0h	24h	48h	72h	96h
06	49,47	4,76	3,94	2,53	1,32
17	83,51	7,18	4,38	4,14	1,92
NOV	91,80	7,73	3,80	1,91	1,62
1143	29,16	3,59	2,22	1,46	0,80
5139	44,04	5,65	1,69	0,80	0,11
6149	8,74	1,69	0,59	0,01	0,00

Concentração plasmática de progesterona, em ng/mL, de animais não superovulados, referentes ao Experimento 02

Animal / horas	Progesterona				
	0h	24h	48h	72h	96h
477	4,72	1,24	0,63		0,19
1436	2,87	0,68	0,39	0,18	0,88
1556	6,68	0,89	0,73	0,03	0,00
3429	5,07	1,11	0,08	0,00	0,00
4487	6,94	1,36	1,63	1,88	1,86
5471	7,45	1,51	0,49	0,23	0,00
5476	7,73	1,29	0,49	0,03	0,00
5513	6,10	1,04	0,99	0,19	0,00



Prancha 01 – Aparelho de ultra-som (Aquila Vet, Esaote Piemedical)



Prancha 02 – Imagem de ultra-som da mensuração de área do CL de um animal do Grupo Controle (GC), delimitado por linhas pontilhadas (·····). O valor mensurado da área do CL está indicado pela seta vermelha (→).